

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTREAL

ÉTUDE DES MÉCANISMES DE TOXICITÉ INDUITE PAR L'ADRIAMYCINE ET
SENSIBILISATION DES CELLULES CANCÉREUSES
PAR LE CHOC THERMIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
CATHERINE LAUZON

JANVIER 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

L'achèvement de ce travail laborieux n'aurait pu se faire sans la présence et la collaboration de plusieurs personnes. Chacune d'elles ayant été pour moi d'une grande importance tout le long de ce périple. Je tiens aujourd'hui à remercier tous les gens qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Toute cette aventure n'aurait pas eu lieu si ma directrice de laboratoire, Dre Averill ne m'avait pas offert une place dans son laboratoire. Merci Dre Averill d'avoir vu mon potentiel pour les études supérieures, mais également merci pour votre confiance et vos encouragements qui m'ont permis d'avancer durant ma maîtrise.

Dans le laboratoire, j'ai bénéficié de plusieurs techniques déjà établies et maintes fois testées par les gens qui ont été présents avant moi. J'aimerais les remercier ainsi que tous ceux qui ont croisé mon chemin durant ces deux années, entre autres : Pragathi Pallepatti, Olivier Didur, André Tanel, Kamini Barot, Zhenghui Wang et Paulina Wrzal.

Un merci particulier va à mes collègues de laboratoire, Ahmed Bettaieb, Yulia Zilber et Julie Roy. Au-delà de leur précieux conseils professionnels et de leur soutien technique, leur simple présence a rempli ces deux dernières années de fou rire, de taquineries, d'entraide et de confidences qui font qu'aujourd'hui je les considère comme de véritables amis. Puisque chaque personne rencontrée a une influence sur nous, je suis convaincue que leur contact a fait de moi une personne meilleure.

J'aimerais également remercier les gens du laboratoire du Dre Paquin : Philippe Ducharme, Josianne Gagné et Frédéric Bouchard, pour avoir partagé plusieurs repas et plusieurs idées dans l'humour et la bonne humeur. Ces dîners ont aussi fait place à des discussions qui m'ont permis d'aiguiser mon sens critique.

Ma maîtrise a donné lieu à plusieurs rencontres mais la plus extraordinaire fut celle de mon amoureux, Frédéric, qui me fait vivre depuis ce jour, un bonheur précieux. Je l'en remercie

profondément puisque le chemin aurait été beaucoup plus ardu sans sa présence, ses petites attentions, sa patience, son soutien, ses conseils judicieux et surtout son amour.

J'aimerais remercier spécialement tous les membres de ma famille qui occupent chacun une grande place dans mon coeur. Merci à mes parents, Benoit et Linda qui par leurs encouragements, leur confiance et leurs efforts m'ont permis de pouvoir me réaliser à la hauteur de mes ambitions. Leur générosité, leur fierté et leur amour sont pour moi des sources d'inspiration. Ils nous ont inculqué, à moi ainsi qu'à mon frère et mes soeurs : Vivianne, Martine et Jérémie, qu'il n'y a rien de plus important dans la vie que la famille. Une famille où règne l'entraide, la joie de vivre, le respect et l'amour.

Finalement, je remercie les IRSC, CRSNG et la fondation UQAM pour leur soutien financier, sans lequel cette étude n'aurait pu être réalisée.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
RÉSUMÉ.....	xiii
INTRODUCTION	1
1.1 Le cancer	1
1.1.1 Statistiques.....	1
1.1.2 Historique	1
1.1.3 Définition.....	1
1.2 Cancer du col de l'utérus.....	3
1.2.1 Description et localisation	3
1.2.2 Statistiques.....	4
1.2.3 Principales causes	5
1.3 Méthodes conventionnelles de traitement contre tous les cancers.....	7
1.3.1 Chirurgie.....	7
1.3.2 Radiothérapie.....	8
1.3.3 Chimiothérapie	8
1.4 Doxorubicine (Adriamycine (ADR)).....	10
1.4.1 Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine.....	12
1.4.1.1 Cardiotoxicité	12
1.5 La résistance pléiotropique aux médicaments.....	13
1.5.1 Généralités	13
1.5.2 Mécanismes généraux.....	14
1.5.3 Protéines de résistance pléiotropique aux médicaments (MRP et P-gp)	14
1.5.3.1 Les transporteurs ABC	14
1.5.3.1.1 Structure.....	15
1.5.4 Protéine de résistance pléiotropique aux médicaments : glycoprotéine-P (P-gp)..	15
1.5.4.1 Généralités.....	15
1.5.4.2 Structure, localisation et mécanisme de la P-gp.....	16

1.5.5 Protéine de résistance pléiotropique aux médicaments 1 (MRP1)	16
1.5.5.1 Généralités.....	16
1.5.5.2 Structure et rôle de MRP1	17
1.5.5.3 Localisation et mécanisme de résistance pléiotropique lié à MRP1.....	18
1.6 Traitements alternatifs aux thérapies classiques contre le cancer	18
1.6.1 Chronothérapie.....	18
1.6.2 Thérapie antiangiogénique.....	19
1.6.3 Immunothérapie	20
1.6.4 Electrochimiothérapie.....	20
1.7 Hyperthermie	21
1.7.1 Historique	21
1.7.2 Définition.....	21
1.7.3 Traitement par HT au niveau clinique	22
1.7.4 Techniques d'application de la chaleur.....	22
1.7.5 Biochimie de HT.....	23
1.7.6 Combinaison de HT et de la chimiothérapie.....	23
1.8 La mort cellulaire	24
1.8.1 Son implication dans les thérapies anticancéreuses.....	24
1.8.2 Généralités	24
1.9 L'apoptose.....	25
1.9.1 Morphologie	25
1.9.2 Protéines de régulation.....	26
1.9.2.1 Les caspases	26
1.9.2.2 La famille Bcl-2.....	26
1.9.3 Principales voies de signalisation	26
1.9.3.1 La voie des récepteurs de mort.....	27
1.9.3.2 La voie mitochondriale.....	27
1.9.3.3 La voie du réticulum endoplasmique.....	30
1.9.4 Mécanismes de résistance à l'apoptose.....	31
1.10 Contexte actuel du projet	33
1.11 Hypothèse et objectifs du projet.....	34

CHAPITRE II.....	37
2.1 Préface	37
2.2 Résumé de l'article	38
2.3 Manuscrit de l'article.....	39
CONCLUSION	82
3.1 Implication d'ADR dans le signalement de l'apoptose chez les cellules HeLa.....	82
3.2 Effets de l'ADR sur les cellules résistantes HeLa MRP+.....	84
3.3 Hyperthermie comme thérapie adjuvante à la chimiothérapie.....	85
3.4 Perspectives futures	88
RÉFÉRENCES	91

LISTE DES FIGURES

Figure	
1.1 Développement de cancer par mutations successives	2
1.2 Localisation et histologie du cancer du col de l'utérus.....	3
1.3 Incidence et nombre de décès reliés au cancer du col de l'utérus, chez les canadiennes	5
1.4 Structure du HPV	6
1.5 Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine.....	11
1.6 Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine	12
1.8 Structure de MRP1	17
1.9 Principales voies d'apoptose	29
1.10 Voie apoptotique du réticulum endoplasmique	31
Manuscript	
2.1 ADR induced cell cycle perturbation in native and resistant HeLa cells at 37 and 42°C..	61
2.2 Induction of apoptosis by Adriamycin and thermal stress.....	63
2.3 Activation of caspases 8, 9 and 3 after 18h of treatment by ADR	65
2.4 Kinetics of caspase activation during 8h of treatment with ADR : activation of caspases 8 and 3 by ADR in HeLa cells (MRP-).....	66
2.5 Lack of early activation of the mitochondrial pathway in non-resistant cells (MRP-) and resistant (MRP+) HeLa cells after 8 h of exposure to ADR and HT	67
2.6 ADR induces translocation of death receptor pathway protein FADD from the cytosol to membranes	68
2.7 ADR causes induction of FasL expression in native (MRP-) and resistant (MRP+) HeLa cells	69
2.8 Kinetics of ROS formation following treatment with ADR in non-resistant HeLa cells (MRP-).....	70
2.9 Generation of O ₂ ⁻ in native (MRP-) and resistant (MRP+) HeLa cells by ADR at 37 and 42°C	72
2.10 Induction of FasL expression and caspase 8 activity by ADR is inhibited by the antioxidant MnTBAP.....	73

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	
1.1 : Facteurs de risques importants du cancer du col utérin.....	5
1.2 : Médicaments les plus utilisés pour la chimiothérapie.....	10

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABC	ATP-binding cassette (boîte de liaison de l'ATP)
Ac	Acétyl-L
Ac-AEVD-AFC	Ac-Ala-Glu-Val-Asp-AFC
Ac-DEVD-AMC	Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC
Ac-LEHD-AFC	Ac-Leu-Glu-His-Asp-AFC
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADR	Adriamycine
AEBSF	[4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride]
AFC	7-amino-4-trifluorométhyl coumarine
AIF	Facteur inducteur de l'apoptose
AMC	7-amino-4-méthyl coumarine
Apaf-1	Facteur d'activation des protéases apoptotiques
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASK	Protéine kinase régulatrice du signal apoptotique
ATP	Adénosine triphosphate
BAGE	Antigène tumoral de la vessie
Bcl	Cellule de lymphome B
BH	Domaine d'homologie avec Bcl-2
Bid (t-Bid)	Agoniste du domaine de mort interagissant avec BH3 (tronqué)
BSA	Albumine de sérum bovin
CAD	Caspase activatrice de DNase
CARD	Domaine de recrutement des caspases
Caspase	Protéase riche en cystéine coupant au niveau de résidus aspartate
CDCFDA	Carboxy-2',7'dichlorofluorescéine diacétate
CHAPS	Acide 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonique
CH ^R C5	Cellules résistantes d'ovaires de hamsters chinois surexprimant la P-gp
CHO	Cellules d'ovaires de hamsters chinois

CHX	Cycloheximide
CT	Chimiothérapie
DD	Domaine de mort
DED	Domaine effecteur de mort
DHE	Dihydroéthidium
Diablo	Facteur de liaison directe aux protéines IAP à faible pI
DISC	Complex inducteur de signal de mort
DMEM	Milieu eagle modifié Dulbecco
DR	Récepteur de mort
DTT	DL-dithiothréitol
E-64	<i>N</i> -(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine-4-guanidinobutylamide
EDA-R	Récepteur de dysplasie ectodermique
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)- <i>N,N,N',N'</i> -tétracétique
Endo-G	Endonucléase G
FADD	Domaine de mort associé à la protéine Fas
Fas	Surface cellulaire associée aux fibroblastes
FasL	Ligand de Fas
FasR	Récepteur Fas
FBS	Serum de bovin foetal
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
GAGE	Antigène tumoral de l'estomac
GRP	Protéine régulée par le glucose
GSH	Glutathion
GST	Glutathion S-transférase
H ₂ DCFDA	5-(et 6)carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate
HeLa MRP+	Cellules HeLa surexprimant la protéine MRP1, conférant un phénotype de résistance pléiotropique aux médicaments
4HNE	Aldéhyde α,β -insaturé 4-hydroxynonéal
HPV	Papillomavirus humain
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène

HSP	Protéines de choc thermique
HT	Hyperthermie, choc thermique
HtrA2	Protéine A2 requérant de haute température
IAP	Protéines inhibitrices de l'apoptose
ICAD	Inhibiteur de la caspase activatrice de DNase
IRE-1	« inositol-requiring gene-1 »
JNK	Kinase c-Jun amino terminale
KB-3-1	Cellules humaines de carcinome épidermoïde
MDR	Résistance pléiotropique
MMP	Métalloprotéase
Mn TBAP	Mn(III)tétrakis(4-acide benzoïque) porphyrine
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -Morpholino)propanosulfonique
MRP	Protéine de résistance pléiotropique
MSD	Grand domaine membranaire
MV522	Cellules humaines de carcinome métastatique du poumon
NBD	Domaine de liaison nucléotidique
NGF	Facteur de croissance neuronale
NGFR	Récepteur du facteur de croissance neuronale
NO	Oxyde nitrique
Omi	Facteur de maturation des oocytes
O ₂ ^{·-}	Anion superoxyde
p53	Gène suppresseur de tumeur
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction en chaîne de la polymérase
P-gp	Glycoprotéine-P
PI	Iodure de propidium
PIPES	Piperazine- <i>N, N'</i> -bis(acide 2-éthane sulfonique)
PRIMA-1	Réactivateur dépendant de p53 et induction massive de l'apoptose
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RAGE	Antigène tumoral du rein
RE	Réticulum endoplasmique

ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RT	Radiothérapie
SDS-PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate
Smac	Facteur mitochondrial d'activation secondaire des caspases
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TRAF 2	Deuxième facteur associé au récepteur TNF
TRAIL	Ligand inducteur d'apoptose relatif à TNF
UPR	« unfolded protein response »
UV	Rayon ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VP-16	Étoposide
Z-IETD-AFC	Z-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC

RÉSUMÉ

Les méthodes classiques de traitement contre le cancer, telle que la chimiothérapie (CT), sont utilisées dans le but d'enrayer la tumeur. L'Adriamycine (ADR ou doxorubicine), un agent anticancéreux, agirait entre autres en s'intercalant entre les bases d'ADN, en inhibant la topoisomérase II et en causant la production de stress oxydatif. Plusieurs effets secondaires indésirables seraient reliés à l'utilisation de ADR comme par exemple la cardiotoxicité à des doses cumulatives de 500 mg/m². Une autre limite importante du traitement de CT est la résistance pléiotropique aux médicaments (MDR), qui peut être causée entre autres par la surexpression de protéines de résistance aux médicaments tel que la MRP. Les protéines MRP, comme la MRP 1, expulseraient ADR hors des cellules tumorales ce qui diminuerait son efficacité et nécessiterait l'élévation de la dose optimale de traitement, causant ainsi une augmentation de la toxicité aux tissus sains. L'hyperthermie (HT) qui consiste à élever artificiellement la température tumorale (40 à 45°C), permettrait de contourner ce phénomène MDR et ciblerait les cellules tumorales sans affecter les cellules saines. HT sensibiliserait les cellules résistantes et non résistantes aux agents anticancéreux, en augmentant la perméabilité membranaire, l'accumulation intracellulaire des agents de CT, et en inhibant la réparation de l'ADN. CT et HT mèneraient à la mort des cellules cancéreuses par activation de l'apoptose.

Cependant, les mécanismes apoptotiques spécifiquement impliqués dans la mort des cellules cancéreuses lors de traitement par ADR et/ou HT ne sont pas entièrement connus et ont tenté d'être éclaircis dans le cadre de ce projet tant chez les cellules d'adénocarcinomes cervicaux non résistants (HeLa) que résistants (HeLa MRP+). Dans cette étude, la voie du récepteur de mort Fas a été la voie apoptotique d'intérêt. C'est pourquoi l'implication des différentes protéines apoptotiques de cette voie ont été étudiées comme le récepteur Fas ainsi que son ligand (FasL), la protéine adaptatrice de domaine de mort associée à Fas (FADD), les caspases 8 et 3. De plus, la recherche des causes d'activation de la voie du récepteur Fas a mené à l'investigation des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Lors de la présente étude, une augmentation de l'expression membranaire de FasL, de FADD ainsi que de l'activité de la caspase 8 ont été observées suite au traitement par ADR (après 1, 2 et 8 h respectivement). Les résultats obtenus montrent une activation précoce de la voie des récepteurs de mort après 1 à 2 h, contrairement à celle de la voie mitochondriale qui serait plus tardive après 18 h. La phase d'exécution de l'apoptose se produit après 18 h d'exposition. La quantification des ROS chez les HeLa exposées à ADR a montré que l'anion superoxyde (O₂⁻) serait le ROS principalement produit. Cette production pourrait activer la voie des récepteurs de mort puisqu'elle serait la cause de l'augmentation de l'expression de FasL. En effet, l'ajout d'un antioxydant (Mn TBAP) mène à l'inhibition de la production d'O₂⁻, de l'expression de FasL et diminue l'activité de la caspase 8. Les résultats démontrent également que l'utilisation de HT favoriserait l'apoptose des cellules HeLa et HeLa MRP+ exposées à ADR, via un mécanisme apoptotique induit par l'augmentation de la production d'O₂⁻.

Les résultats obtenus ont permis de mieux comprendre les mécanismes apoptotiques impliqués par l'exposition à l'ADR et/ou HT. La compréhension de ces mécanismes est

critique dans le développement de nouvelles stratégies, visant à augmenter l'efficacité des traitements contre le cancer. De plus, cette étude démontre également que HT peut augmenter l'efficacité du traitement par l'ADR en sensibilisant les cellules cancéreuses résistantes et non résistantes. Ce qui fait de HT, un traitement adjuvant prometteur qui permettrait de contrer le phénotype MDR et d'augmenter l'efficacité du traitement de CT, tout en diminuant les doses optimales, la toxicité aux tissus sains et les effets secondaires indésirables qui compromettent sérieusement la qualité de vie du patient.

Mots clés : Chimiothérapie, Adriamycine, Résistance pléiotropique aux médicaments, MRP1, Hyperthermie, Apoptose

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le cancer

1.1.1 Statistiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS en 2006), plus de 6 millions de gens meurent du cancer chaque année et ce nombre devrait augmenter de 50 %, d'ici 2020. Statistique Canada estimait que 153 100 nouveaux cas de cancers seraient dénombrés en 2006 et de ce nombre 70 400 canadiens en mourraient (Société canadienne du cancer, 2006).

1.1.2 Historique

Loin d'être une maladie récente, les premiers écrits sur le cancer remontent à l'Égypte ancienne, dans lesquelles les cancers les plus faciles à déceler soit celui du sein, des lèvres et de la langue ont été décrits. Par la suite, Hippocrate (460-370 av. J-C) utilisa le terme *carcinoma* pour décrire le cancer. *Carcinoma* provient du mot grec *karkinos*, qui signifie crabe et dont le mot cancer est la forme latinisée. Cette image représente bien la façon qu'ont les cellules cancéreuses à adhérer et à se répandre (ex : métastases). De plus, certains cancers ont tendance à développer des prolongements qui ressemblent aux pattes des crabes (ASPC, 1997).

1.1.3 Définition

Le terme médical utilisé pour décrire le cancer est néoplasie qui provient du grec et qui signifie nouvelle formation. Le cancer peut donc se définir comme la croissance de nouveaux tissus dans notre corps. Ces nouveaux tissus étant le résultat d'une prolifération excessive et anarchique d'une seule cellule mutée, qui a subi une modification permanente de son ADN transmissible aux cellules filles. Les mutations susceptibles de causer un cancer peuvent être *spontanées* et survenir à une fréquence de 10^{-6} /cellule/génération suite à des erreurs lors de la réplication, mais elles peuvent également être *induites* par des substances chimiques ou physiques (Alberts, 2002). En effet, l'exposition à certains virus, à des radiations, à des stress environnementaux engendrant la formation de radicaux libres ou

même à des médicaments anticancéreux lors de traitements intensifs (à de fortes doses) peuvent être la cause de mutations *induites*. En fait, dans toute une vie, chaque gène d'un même individu est susceptible de subir 10^{10} mutations (Alberts, 2002). Heureusement, une mutation ne mène pas toujours à la formation d'un cancer. En effet, il existe des mécanismes cellulaires de réparation permettant de corriger les torts engendrés par un agent mutagène ou autre. C'est pourquoi, l'apparition d'un cancer se ferait suite à une accumulation successive de plusieurs mutations (Figure 1.1) (Alberts, 2002; Griffiths et Suzuki, 2002; Lodish, 2000). En effet, il est évalué que 5 à 10 mutations seraient suffisantes pour transformer une cellule normale en cellule cancéreuse (Alberts, 2002; Griffiths et Suzuki, 2002). Les possibilités de réparation de l'ADN suite à la mutation dépendent de l'importance des gènes cellulaires affectés et des dommages engendrés par la mutation. Deux catégories de gènes sont particulièrement critiques dans la formation d'un cancer, soit les gènes codant pour des protéines jouant un rôle dans le cycle cellulaire (oncogènes) ou les gènes suppresseurs de tumeur, impliqués dans la réparation de l'ADN. Il y a un risque de développer un cancer lorsqu'il y a surexpression d'oncogènes et que les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés (Griffiths et Suzuki, 2002).

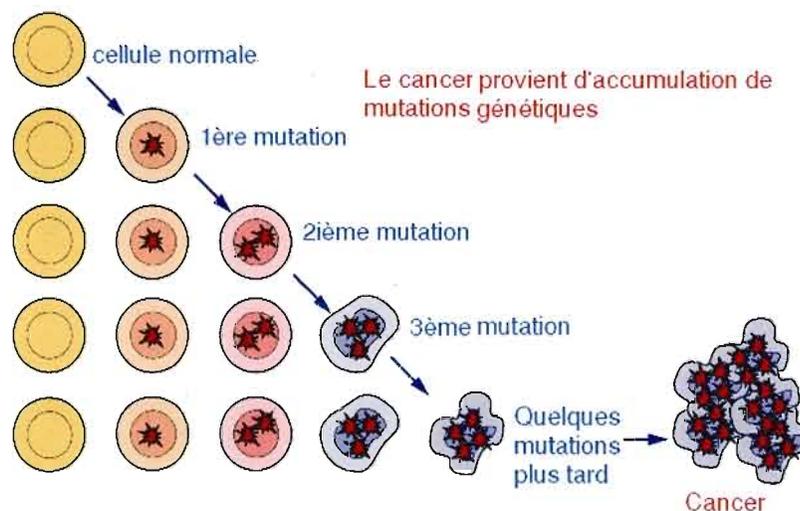


Figure 1.1 Développement de cancer par mutations successives : Le cancer se développe suite à l'accumulation de plusieurs mutations, au fil du temps, dans une même cellule. À chaque stade, les cellules mutées continuent de se diviser, pour former une masse appelée tumeur cancéreuse. (Fond de la recherche en santé du Québec (2005): http://www.frsq.gouv.qc.ca/fr/publications/recherche_en_sante/pdf/no35/integral.pdf)

1.2 Cancer du col de l'utérus

1.2.1 Description et localisation

Le col de l'utérus relie l'utérus au vagin et il est composé de deux parties : l'endocol et l'exocol (Figure 1.2). Tout d'abord, l'endocol est la partie interne du col contenant le canal cervical. Il est tapissé d'un épithélium glandulaire formé d'une seule couche de cellules cylindriques sécrétant la glaire cervicale qui détermine l'accessibilité de l'utérus aux spermatozoïdes. En effet, elle est perméable aux spermatozoïdes lors de l'ovulation, et devient très épaisse lorsque cette étape prend fin, ce qui empêche les spermatozoïdes ainsi que les bactéries d'accéder à l'utérus. La partie externe du col soumise à un environnement plus hostile est nommée exocol et est tapissée d'une muqueuse malpighienne épaisse composée de plusieurs couches se poursuivant dans le vagin. La jonction entre ces deux épithéliums est brutale et porte le nom de zone de transformation ou épithélium pavimentocylindrique (Figure 1.2). Cette zone de renouvellement cellulaire rapide est souvent susceptible de subir des modifications pathologiques menant à l'apparition d'un cancer du col de l'utérus (ASPC, 1998; Morin *et al.*, 2000; Wheeler *et al.*, 2001).

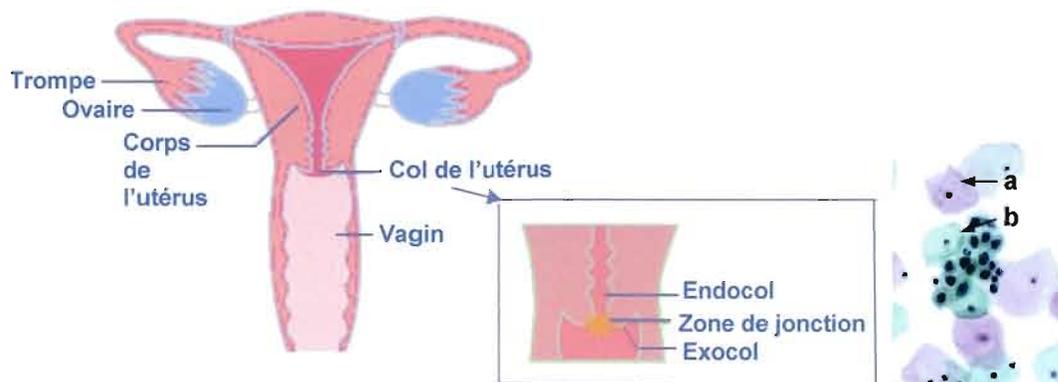


Figure 1.2 Localisation et histologie du cancer du col de l'utérus: 1) Le col de l'utérus est composé de l'endocol et de l'exocol. La zone de jonction (ou zone de transformation) est souvent propice à la formation de cancer. 2) Photos de cellules du col de l'utérus normales (a) et cancéreuses (b) colorées selon le test de Papanicolaou (Steinbrook, 2006).

1.2.2 Statistiques

Pour sa part, le cancer du col de l'utérus serait la 3^{ième} cause de décès par cancer chez la femme à l'échelle mondiale ce qui représenterait 10 % de tous les cancers. Cependant, dans les pays en voie de développement, il atteint le 2^{ième} rang et représente 15 % de tous les cancers (OMS, 2006). L'Amérique du Sud, l'Est et le Sud de l'Afrique et l'Inde seraient les pays les plus à risques; les taux y seraient de 5 à 8 fois plus élevés qu'au Canada (ASPC, 1998). Ce cancer serait également la 12^{ième} cause de mortalité chez les femmes canadiennes, ce qui représenterait pour l'année 2006, 1 350 nouveaux cas et 390 décès (Société canadienne du cancer, 2006).

De tous les cas de cancers du col utérin, 80 % seraient des épithéliomas spinocellulaires de l'exocol attribuables à des cellules malpighiennes malignes et 15 % seraient des adénocarcinomes de l'endocol composés de cellules glandulaires malignes. Cependant, les épithéliomas spinocellulaires seraient aisément détectables à l'aide du test de Papanicolaou et seraient en baisse de 3,2 % par année. Ce n'est pas le cas des adénocarcinomes qui seraient en hausse de 4%, probablement car ils sont difficilement détectables par frotti endocervical (ASPC, 1998; Rapport de surveillance de la santé des femmes, Santé Canada, 2003).

Le nombre de décès causé par le cancer de l'utérus a tout de même baissé de 50 à 60 % au Canada et ce grâce au test de Papanicolaou, ou frotti endocervical, instauré comme méthode de dépistage dans les années 1970 (Figure 1.3). Ce test préventif renouvelé une fois par année permet la détection de lésions précancéreuses facilement traitables à ce stade (ASPC, 1998; Rapport de surveillance de la santé des femmes, Santé Canada, 2003).

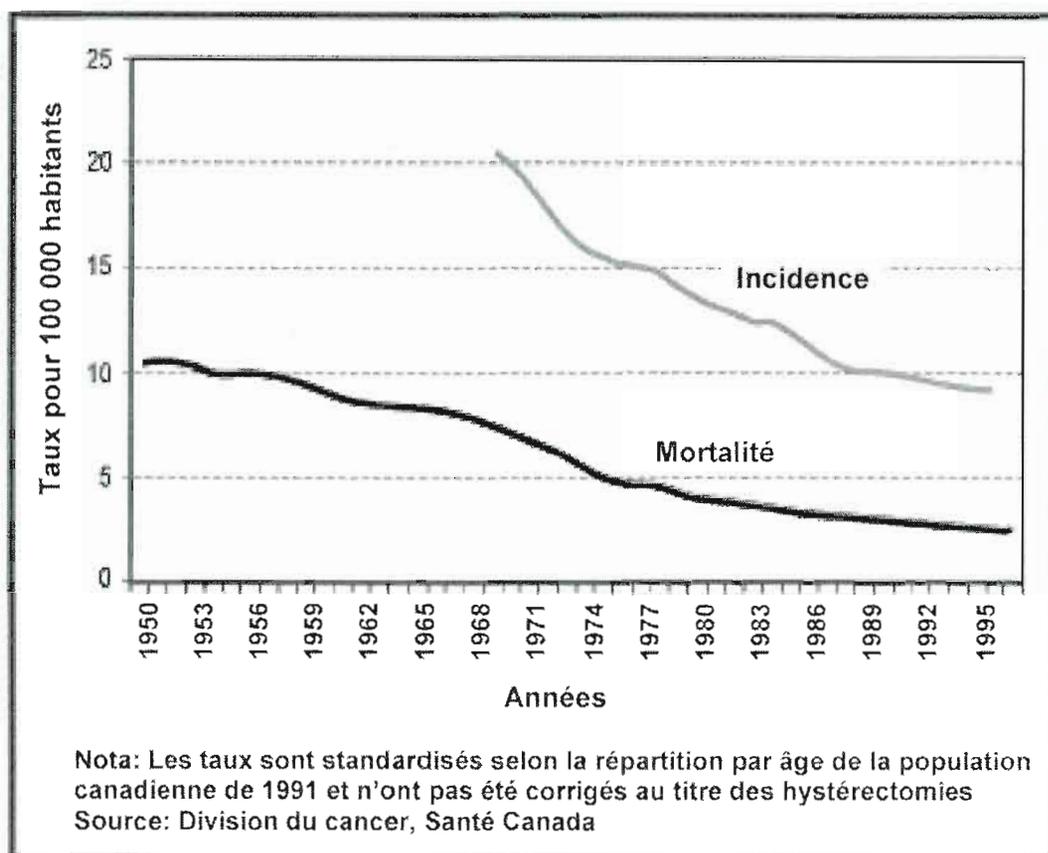


Figure 1.3 Incidence et nombre de décès reliés au cancer du col de l'utérus, chez les canadiennes (1950-1998) (ASPC, 1998). Selon les statistiques de Santé Canada, de 1950 à 1998, le taux d'incidence et le taux de mortalité reliés au cancer du col utérin auraient diminué de moitié. Cette diminution est attribuée à l'instauration du test de Papanicolaou en 1970.

1.2.3 Principales causes

Comme dans tous les cancers, les facteurs causals du cancer du col utérin semblent multiples. Ces derniers sont énumérés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 1.1 : Facteurs de risques importants du cancer du col utérin (ASPC, 1998; Société canadienne du cancer, 2006)

Papillomavirus humain (HPV)	Milieu défavorisé
Partenaires sexuels multiples	Vieillessement
Rapports sexuels précoces	Dépistage inadéquat
Tabagisme	Prise de médicament immunosuppresseur

Le Papillomavirus humain (HPV) est le facteur de risque le plus important relié au cancer du col utérin. Il a été identifié, par Harald zur Hausen, il y a déjà près de 30 ans (Durst *et al.*, 1983). Ce dernier est un virus non enveloppé à ADN double brin de 8000 pb (Figure 1.4) (Lancet, 2006).

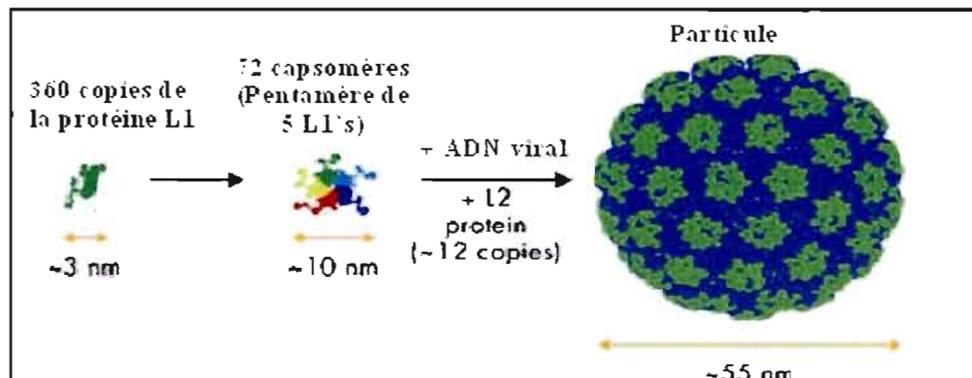


Figure 1.4 Structure du HPV : 5 copies de la protéine L1 sont assemblées pour former un capsomère, qui est l'unité structurale de base du virus. Le HPV est formé de 72 capsomères de la protéine L1, de 12 copies de la protéine L2 et d'une copie d'ADN viral double brin (Mandell *et al.*, 2004).

Il existerait une centaine de souches différentes de ce virus, dont la séquence a été vérifiée par Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR). Cependant, seulement quelques-unes de ces souches (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 et 82) représentent de hauts risques de cancer du col utérin (Partridge et Koutsky, 2006). Les souches 16 et 18 seraient, toutefois celles rencontrées dans près de 70% des cas (Harper *et al.*, 2004; Partridge et Koutsky, 2006; Steinbrook, 2006).

À titre préventif, deux vaccins contre le HPV, soit le Gardasil® de Merck et le Cervarix™ de GlaxoSmithKline, ont récemment été produits à partir des protéines L1 des souches 16 et 18 du virus (Harper *et al.*, 2004; Lancet, 2006; Steinbrook, 2006). Plusieurs pensent qu'une vaccination massive chez les jeunes personnes, autant chez les garçons que chez les filles, empêcherait la propagation du virus et diminuerait les risques de cancer du col utérin chez les femmes, en leur conférant une immunité active avant les premiers rapports sexuels et ce pendant environ 4 à 5 ans (Harper *et al.*, 2006; Simon et Dupond, 2006; Steinbrook, 2006).

Les différents facteurs de risques énumérés précédemment semblent interalliés puisque plusieurs études démontrent que le cancer du col utérin ne serait pas dû à un facteur seul, mais à une multitude de facteurs, puisque différents facteurs se retrouvent chez des femmes atteintes ou non du cancer du col utérin (Haverkos *et al.*, 2000; Haverkos, 2005). Par exemple, le tabagisme serait mis en cause par le fait que des composés relatifs au tabac, chez des fumeuses de longue date, se retrouveraient au niveau du col de l'utérus et pourraient créer un environnement favorable au développement d'infection par HPV ou de cancer chez certaines femmes (Franco *et al.*, 2003; Wiley *et al.*, 2006).

1.3 Méthodes conventionnelles de traitement contre tous les cancers

Le choix d'une avenue de traitement contre le cancer par un oncologue repose obligatoirement sur le diagnostic posé suite à un examen histologique de la tumeur prélevée par biopsie. Suite à cet examen préliminaire, les traitements peuvent être envisagés selon la localisation, la nature, la taille et plusieurs autres caractéristiques de la tumeur. Le médecin devient alors responsable de la prise de conscience du patient, des avantages et désavantages des différentes méthodes de traitements. En effet, certaines méthodes peuvent comporter plus d'effets secondaires en ayant, toutefois, de meilleures chances de réussite.

1.3.1 Chirurgie

La chirurgie est la méthode la plus ancienne de traitement contre le cancer et elle est utilisée lors de tumeurs superficielles ou localisées. Ce n'est bien sûr qu'après avoir effectué une biopsie permettant de déterminer la nature et l'importance de la tumeur, qu'ils peuvent procéder à son ablation. Lorsque la tumeur est importante, les spécialistes peuvent avoir recours à la microchirurgie afin de camoufler les dommages esthétiques (Morin *et al.*, 2000).

Auparavant, la seule méthode possible de traitement pour le cancer du col de l'utérus, était l'hystérectomie, qui comprend l'ablation de l'utérus, du col utérin, la partie supérieure du vagin et les tissus environnants. Depuis peu, chez les femmes étant affectées par un cancer du col de l'utérus, localisé et à un stade précoce, on préconise la conisation (prélèvement de tissus cancéreux de moins de 3 mm) et la trachélectomie par laquelle seulement la partie du col utérin et les tissus affectés, sont retirés. En effet, plusieurs études ont démontré que ces

techniques minimalistes éliminent le cancer tout en permettant à ces femmes de préserver leur fertilité (Holland *et al.*, 2003; Kesic, 2006; Schlaerth et Abu-Rustum, 2006).

1.3.2 Radiothérapie

Les rayons X furent découverts en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen, au profit de la radiographie occidentale. Par la suite, ce fût la découverte des radioéléments, définis comme étant des substances chimiques produisant de la radioactivité. Le premier à avoir été découvert en 1896 par Henri Becquerel est l'uranium naturel et le deuxième, le radium naturel, fût découvert par Pierre et Marie Curie en 1898. Le recours au radium dans un but thérapeutique, débuta en 1901. Cependant, les effets secondaires entraînés par ce traitement, tels que les brûlures de la peau, limitèrent son utilisation. Depuis 1950, les radioéléments naturels ont été remplacés par des radioéléments artificiels (Morin *et al.*, 2000).

Le principe de la radiothérapie repose sur des rayons ionisants qui agissent en détruisant les structures chromosomiques nécessaires à la division cellulaire, ce qui cause la mort des cellules cancéreuses. L'objectif étant de fournir une dose suffisante de rayonnement pour éliminer la tumeur, sans affecter les organes voisins. Cependant, l'effet indésirable majeur de cette méthode, c'est qu'il peut arriver que des cellules saines soient affectées entraînant ainsi, l'apparition de nouveaux cancers (Morin *et al.*, 2000).

La radiothérapie peut être couplée à la chirurgie ou à la chimiothérapie afin d'obtenir de meilleurs résultats, pour certains types de cancer. Dans des cas de cancers de col utérin localisés, suite à une chirurgie, il est courant d'utiliser la radiothérapie afin d'être certain d'avoir totalement enrayé la tumeur (Holland *et al.*, 2003; Kesic, 2006).

1.3.3 Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en l'administration de molécules anticancéreuses afin d'éliminer les tumeurs invasives qui ont tendance à se propager dans l'ensemble des tissus, pour former des métastases. Pour ce qui est du cancer du col de l'utérus, la chimiothérapie est généralement utilisée à des stades avancés, seule ou en combinaison avec la radiothérapie (Kesic, 2006).

Ce n'est que vers les années 1950 que l'on peut parler de chimiothérapie telle qu'on la connaît aujourd'hui. Il n'y a pas si longtemps, les traitements thérapeutiques étaient basés uniquement sur les vertus des produits naturels et des métaux. La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 fut un moment marquant de l'histoire thérapeutique. Pendant la première guerre mondiale, on découvrit aussi un effet thérapeutique à la moutarde azotée, un gaz asphyxiant. En effet, elle diminuait considérablement les taux de globules blancs dans le sang et fût alors utilisée dans le traitement des leucémies (Hajdu, 2005).

De nos jours, une spécificité du traitement de chimiothérapie est davantage recherchée et implique la destruction des cellules cancéreuses, tout en épargnant le plus possible les cellules saines environnantes (Hajdu, 2005). Environ une cinquantaine de médicaments sont disponibles (Tableau 2), la plupart agissant sur les cellules qui ont commencé un cycle cellulaire et qui s'apprêtent à se diviser. Ces médicaments sont distribués en plusieurs catégories selon leur mode d'action (Tannock et Hill, 1998).

- Les agents alkylants: interagissent avec l'ADN par l'extrémité de leurs chaînes déficientes en électrons.
- Les antimétabolites: entrent en compétition avec un substrat nécessaire à l'activité d'une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ADN.
- Plusieurs types de produits naturels et leurs dérivés, qui agissent eux aussi sur l'ADN.

Tableau 1.2 : Médicaments les plus utilisés pour la chimiothérapie (Tannock et Hill, 1998)

<p><u>Agents alkylants</u> Moutarde azotée Chlorambucil Melphalan Cyclophosphamide Mitomycine C Ifosfamide Busulfan Nitroso-urée BCNU CCNU Méthyl CCNU</p> <p><u>Antimétabolites</u> Méthotrexate 5-Fluorouracil Cytosine Arabinoside 6-Thioguanine 6-Mercaptopurine Gemcitabine</p>	<p><u>Produits naturels et leurs dérivés</u></p> <p><u>Anthracyclines</u> Doxorubicine Daunorubicine Epirubicine Mitoxantrone Actinomycine D Bleomycine</p> <p><u>Alkaloides Vinca</u> Vinblastine Vincristine Vindesine Vinorelbine Etoposide (VP-16) Camptothecins</p> <p><u>Taxanes</u> Paclitaxel Docetaxel</p> <p><u>Autres Agents</u> Cisplatine Carboplatine Dacarbazine (DTIC)</p>
---	--

1.4 Doxorubicine (Adriamycine (ADR))

La doxorubicine est un médicament anticancéreux de la famille des anthracyclines. Produite tout naturellement par des actinobactéries de genre *Streptomyces*, elle a été isolée pour la première fois en 1960 et approuvée par la Food and Drug Administration (FDA) en 1974 (Hande, 1998; Minotti *et al.*, 2004). Depuis, c'est le meilleur antinéoplasique connu et le plus utilisé, entre autres dans le traitement de cancers tels que les leucémies et les tumeurs solides (Mizutani *et al.*, 2005). Son administration se fait par voie intraveineuse afin d'atteindre rapidement la tumeur sans être trop dégradée (Hande, 1998). Les demi-vies de la doxorubicine sont : de 8 à 25 minutes, de 1h30 à 10h et de 24h à 48h. La présence de la deuxième phase de demi-vie serait due au métabolisme du médicament au niveau du foie, en doxorubicinol, et la troisième phase serait attribuable au relâchement du médicament des sites de liaison dans les tissus (Tannock et Hill, 1998). La doxorubicine ainsi que ses métabolites

seraient excrétés majoritairement par la bile. Cependant, 5% serait excrété par les voies urinaires ce qui expliquerait la coloration rouge de l'urine, soit la couleur de ce médicament, quelques jours après le traitement (Tannock et Hill, 1998).

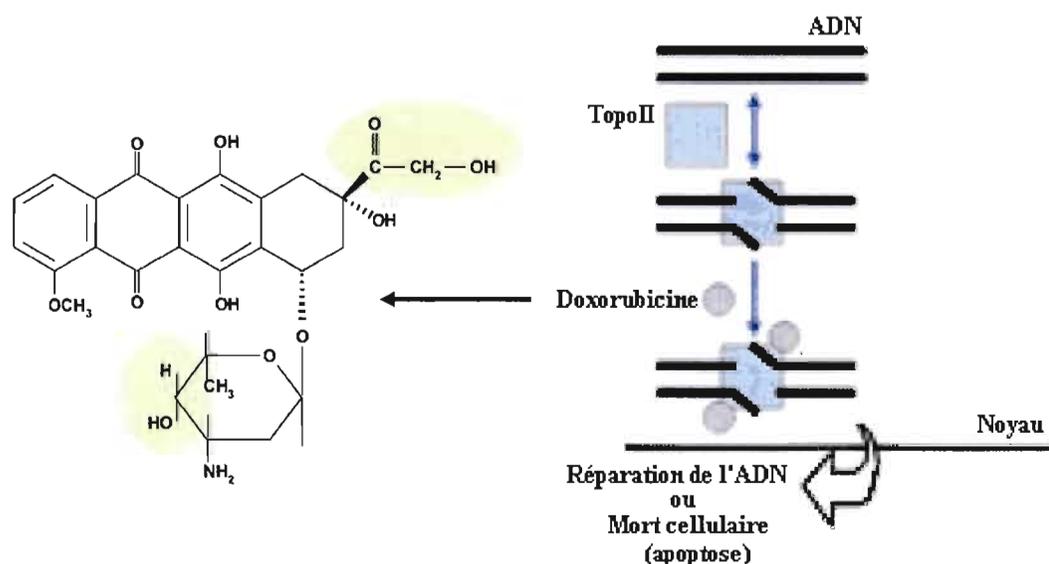


Figure 1.5 Mécanisme de toxicité cellulaire et structure moléculaire de la doxorubicine : La stabilisation et l'inhibition de l'activité de l'enzyme topoisomérase II par la doxorubicine mène à l'arrêt du cycle cellulaire qui permet l'activation de la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire par apoptose, si les dommages à l'ADN sont irréparables (Hande, 1998; Tsuruo *et al.*, 2003).

La doxorubicine agirait sur les cellules selon plusieurs modes d'action. Tout d'abord, près de 99.8% de son accumulation se ferait au niveau du noyau chez des cellules sensibles à cause de sa très grande affinité avec l'ADN (Cutts et Phillips, 1995). Sa structure plane (figure 1.5), lui permettrait de s'insérer entre deux paires de bases azotées au niveau de la guanine du côté 5' (5'-GCN) modifiant ainsi la structure de l'ADN (Cutts et Phillips, 1995; Hande, 1998; Iarussi *et al.*, 2001). Cette modification inhiberait l'action de la topoisomérase II, qui est un enzyme nucléaire chargée de modifier l'ADN lors de la transcription, la réplication et la mitose (Potter et Rabinovitch, 2005). La stabilisation de l'enzyme par l'intercalation de la doxorubicine causerait l'arrêt du cycle cellulaire par activation de « check points », responsables d'activer la réparation de l'ADN ou si les dommages sont trop importants, d'activer la mort de la cellule par apoptose (Koivusalo *et al.*, 2005; Potter et

Rabinovitch, 2005). Finalement, les composés de dégradation de la doxorubicine entraîneraient la formation de radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyl ($\cdot OH$) (Voir figure 1.6) (Singal *et al.*, 1997). Ces radicaux libres endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires (Iarussi *et al.*, 2001).

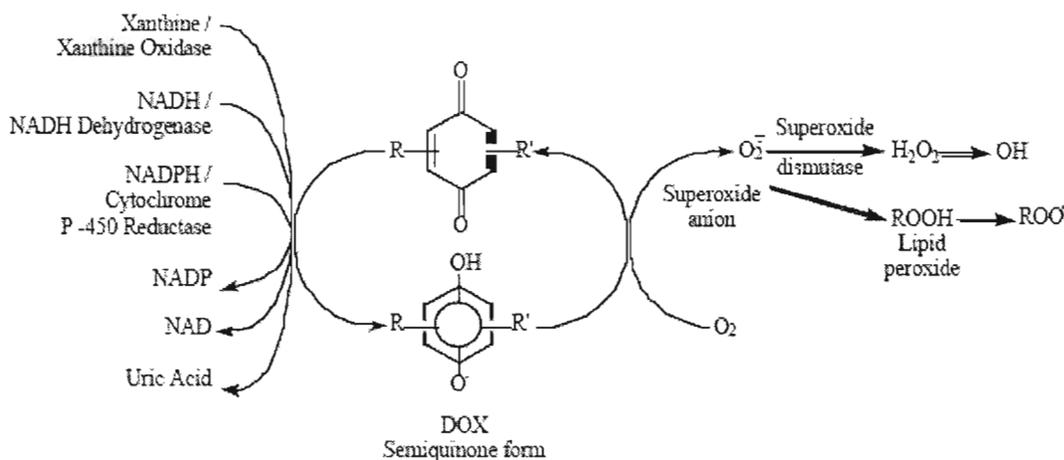


Figure 1.6 Schéma des différentes voies enzymatiques menant à la formation des radicaux libres à partir de la doxorubicine : La forme quinone est la forme initiale de la doxorubicine et peut être réduite en forme semiquinone par le gain d'un électron. Cette réduction peut être générée par des enzymes réductases telles que la xanthine oxydase, la NADH déhydrogénase et la NADPH cytochrome P-450 réductase. L'électron perdu par la semiquinone de la doxorubicine lors de son oxydation peut être transféré à une molécule d'oxygène (O_2) pour former l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) qui sera également oxydé par la superoxyde dismutase pour former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). À ce stade, le H_2O_2 peut entraîner la formation de radicaux hydroxyls ($\cdot OH$), un des radicaux libres les plus réactifs et destructifs, mais peut aussi être éliminé par la catalase et la glutathion peroxydase (Iarussi *et al.*, 2001).

1.4.1 Effets secondaires majeurs de traitement à la doxorubicine

1.4.1.1 Cardiotoxicité

Le traitement de chimiothérapie implique l'usage d'agents toxiques dans le but de tuer les cellules tumorales. Cependant, dans certains cas, le traitement peut aussi affecter les cellules saines. Par exemple, la cardiotoxicité est un des désavantages majeurs de l'utilisation de la doxorubicine comme agent anticancéreux. En effet, ce médicament anticancéreux,

administré à des doses totales cumulées de 550 mg/m² entraînerait des problèmes cardiaques chez plus de 7 % des patients traités (Hande, 1998; Iarussi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003). Le mécanisme impliqué reste irrésolu, mais certains groupes de recherches ont observé une diminution de GATA-4, un facteur de transcription cardiaque important dans la différenciation lors du développement et essentiel à la survie, et de son ARNm ce qui induirait l'apoptose des cardiomyocytes (Aries *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2003). Une autre équipe verrait aussi l'implication de Fas/FasL dans l'apoptose des cardiomyocytes (Jeremias *et al.*, 2005). Cependant d'autres auteurs ont rapporté que les radicaux libres produits par l'Adriamycine seraient majoritairement responsables de la cardiotoxicité (Hande, 1998; Iarussi *et al.*, 2001; Tannock et Hill, 1998).

1.5 La résistance pléiotropique aux médicaments

1.5.1 Généralités

Une autre limite importante de la chimiothérapie est la diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses, donc une réduction de l'efficacité du traitement. Ce problème majeur dans la chimiothérapie anticancéreuse est fréquemment dû à la résistance pléiotropique aux médicaments (MDR). Deux formes distinctes de MDR sont connues, soit le phénotype intrinsèque qui est présent dans les cellules tumorales avant l'exposition à un quelconque médicament, soit le phénotype acquis qui se développe chez les cellules cancéreuses suite à un traitement de chimiothérapie (Meschini *et al.*, 2000). La résistance acquise implique une résistance au médicament utilisé et aux médicaments ayant une structure chimique différente, d'où le caractère de résistance multiple. On sait jusqu'à maintenant que cette résistance pourrait être due à l'augmentation de la synthèse du glutathion impliqué dans la détoxification cellulaire, à l'altération d'enzymes ayant un rôle dans les mécanismes de régulation de l'ADN et à certains dysfonctionnements dans la signalisation et l'exécution du mécanisme apoptotique. De plus, la surexpression de protéines transmembranaires, comptant parmi les transporteurs ABC, pourraient également être un facteur causant le développement du phénotype MDR, puisque ces protéines auraient pour effet d'expulser les agents anticancéreux hors des cellules tumorales ce qui diminuerait leur action thérapeutique.

1.5.2 Mécanismes généraux

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (glutamyl-cysteinyl glycine) dont la synthèse est liée aux enzymes γ glutamylcystéine synthétase (γ GSH) et glutathion synthétase (GS). Le GSH joue un rôle central dans plusieurs processus biochimiques tels que la synthèse de l'ADN et des protéines, la régulation du cycle cellulaire, la protection contre les radicaux libres, la détoxification cellulaire et plusieurs autres (Renes *et al.*, 1999). Tel que mentionné, le GSH aurait un rôle important dans la détoxification de composés xénobiotiques dont l'organisme doit se débarrasser. En effet, la conjugaison du GSH et de substances toxiques électrophiles, tels que l'Adriamycine (ADR) et le melphalan, par la glutathion S-transférase (GST) réduirait leurs effets toxiques tant chez les cellules normales que chez les cellules tumorales et faciliterait leur excrétion par la bile ou l'urine (Holland *et al.*, 2003; Tannock et Hill, 1998; van Bladeren, 2000).

De plus, il semblerait que l'ADN topoisomérase II pourrait également jouer un rôle dans le phénomène MDR. Il est connu que l'ADN topoisomérase II est essentiel au bon déroulement de l'ADN lors de la réplication et de la transcription. Le mode d'action de plusieurs agents anticancéreux, comme l'étoposide et l'ADR par exemple, est de fixer et bloquer l'action de l'enzyme topoisomérase II, ce qui mène à la mort des cellules tumorales (Tsuruo *et al.*, 2003). Or, l'altération ou la dégradation de cet enzyme peut diminuer la sensibilité des cellules tumorales aux agents anticancéreux tels que les anthracyclines et les épipodophyllotoxines (Brown *et al.*, 1995; Tsuruo *et al.*, 2003).

1.5.3 Protéines de résistance pléiotropique aux médicaments (MRP et P-gp)

1.5.3.1 Les transporteurs ABC

Les transporteurs ABC pour « ATP Binding Cassette » sont la catégorie la plus importante de protéines de transport et le génome associé est très conservé parmi les espèces (Lockhart *et al.*, 2003). Chez l'humain, elle englobe une cinquantaine de protéines divisées en 7 sous-familles (ABCA à ABCG) (Stefkova *et al.*, 2004). Ces protéines transportent activement des médicaments, xénobiotiques, phospholipides, ions, peptides, stéroïdes, polysaccharides, acides aminés et anions organiques, à travers la membrane plasmique ainsi

que les membranes des compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les peroxisomes et la mitochondrie (Dean *et al.*, 2001; Depeille *et al.*, 2004; Stefkova *et al.*, 2004; Zaman *et al.*, 1994). L'énergie nécessaire au transport d'une molécule de substrat serait de 2 ATP (Stefkova *et al.*, 2004).

1.5.3.1.1 Structure

Chez les eucaryotes, la structure secondaire des membres de la famille ABC est formée d'au moins quatre domaines dont deux « membrane spanning domain » (MSD) et deux « nucleotide binding domain » (NBD) (Leslie *et al.*, 2001). Les MSDs, partie membranaire hydrophobe des protéines, comportent 4 à 6 hélices α transmembranaires (TM) et seraient d'importants déterminants dans la spécificité du substrat (Hipfner *et al.*, 1999). Les NBDs forment, pour leur part, la partie cytosolique (hydrophile) de la protéine et contiennent chacun deux séquences motifs (Walker A et Walker B) très conservées chez les transporteurs ABC (30 à 40 % d'homologie) (Hipfner *et al.*, 1999; Walker *et al.*, 1982). Entre Walker A et B serait contenue une séquence d'acides aminés (séquence C : ALSGGQ) typique de la famille ABC. La séquence C ainsi que la lysine de Walker A seraient impliquées dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP servant d'énergie au transport des substrats (Leslie *et al.*, 2005).

1.5.4 Protéine de résistance pléiotropique aux médicaments : glycoprotéine-P (P-gp)

1.5.4.1 Généralités

En 1976, Juliano et Ling furent les premiers à mettre en évidence, dans des cellules cancéreuses résistantes, la corrélation entre la diminution de l'accumulation intracellulaire des médicaments et l'augmentation de l'expression d'une protéine de 170 kDa, qu'ils nommèrent P-glycoprotéine (P-gp), codée par MDR1 (7q21.1) (Juliano et Ling, 1976). Des études de transfection du gène MDR1 ont montré que la P-gp confère aux cellules tumorales exposées à des médicaments, un phénotype MDR dit « classique », impliquant une résistance à quatre classes de médicaments couramment utilisées : les anthracyclines, les alcaloïdes vinca, les taxanes et les épipodophyllotoxines (Endicott et Ling, 1989; Gottesman et Pastan, 1993; Hipfner *et al.*, 1999).

1.5.4.2 Structure, localisation et mécanisme de la P-gp

La P-gp appartient à la catégorie des transporteurs ABC. Sa structure contient 2 MSD et 2 NBD ainsi que les caractéristiques structurales typiques reliées aux transporteurs ABC (Leslie *et al.*, 2005). Afin de définir le mécanisme d'action de la P-gp, des études de transfection du gène MDR1 ont été effectuées dans des liposomes (Shapiro et Ling, 1995). De ces études, il a été découvert que la P-gp interagirait directement avec les médicaments hydrophobes contenus dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et les transporterait vers l'extérieur de la cellule, de manière énergie dépendante nécessitant l'hydrolyse de l'ATP (Figure 1.7) (Ling, 1997). Ce mécanisme est encore envisagé de nos jours, mais il se pourrait également que la P-gp permette seulement le passage des médicaments hydrophobes du feuillet interne au feuillet externe de la bicouche lipidique de la membrane plasmique et donc l'expulsion du médicament (Hennessy et Spiers, 2007). De plus, la P-gp ne serait pas seulement présente au niveau de la membrane plasmique, mais dans plusieurs autres compartiments cellulaires comme l'appareil de Golgi et plus récemment, les mitochondries (Gong *et al.*, 2000; Solazzo *et al.*, 2006; Stride *et al.*, 1999).

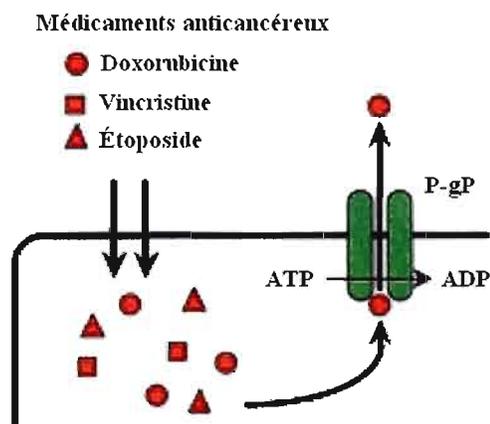


Figure 1.7 Mécanisme fonctionnel de la P-gp : La P-gp est située à la membrane plasmique et permet l'expulsion ATP-dépendante, entre autres des médicaments anticancéreux, hors de la cellule (Tsuruo *et al.*, 2003).

1.5.5 Protéine de résistance pléiotropique aux médicaments 1 (MRP1)

1.5.5.1 Généralités

Dans les années 1980, on continua d'observer le phénotype P-gp dans plusieurs lignées cellulaires et tissus cancéreux. Cependant, d'autres lignées cellulaires et tissus cancéreux, comme par exemple, les H69R (cancer du poumon), montraient encore un

phénomène de résistance aux médicaments anticancéreux qui ne semblait pas lié à la P-gp. La protéine de résistance pléiotropique aux médicaments 1 (MRP1), de 190 kDa, fut découverte en 1992 par Cole et ses collaborateurs (issue du gène MRP, 16q13.1) (Bakos et Homolya, 2006; Cole *et al.*, 1992; Hirose, 2002). La surexpression de MRP1 conduirait à la résistance de plusieurs médicaments tels que l'étoposide, la doxorubicine, la daunorubicine, l'épirubicine et la vincristine (Cole *et al.*, 1994).

1.5.5.2 Structure et rôle de MRP1

MRP1 (Figure 1.8) serait, jusqu'à maintenant, la première de 7 protéines (MRP1 à 7) et appartiendrait à ABCC1, une sous-famille des transporteurs ABC. MRP1 serait surexprimée dans plusieurs lignées cellulaires résistantes dérivées de différents tissus et tumeurs incluant les cancers du poumons, colon, sein, vessie, prostate, thyroïde, col utérin, gliome, neuroblastome et leucémie (Hipfner *et al.*, 1999). MRP1 serait aussi présente dans les cellules normales où elle aurait un rôle dans la détoxification cellulaire en transportant des composés toxiques tels que les produits de la peroxydation des lipides, herbicides, nitrosamines spécifiques du tabac, mycotoxines, métaux lourds, produits naturels et antifolate, ce qui préviendrait leur accumulation intracellulaire (Hirose, 2002; Leslie *et al.*, 2001).

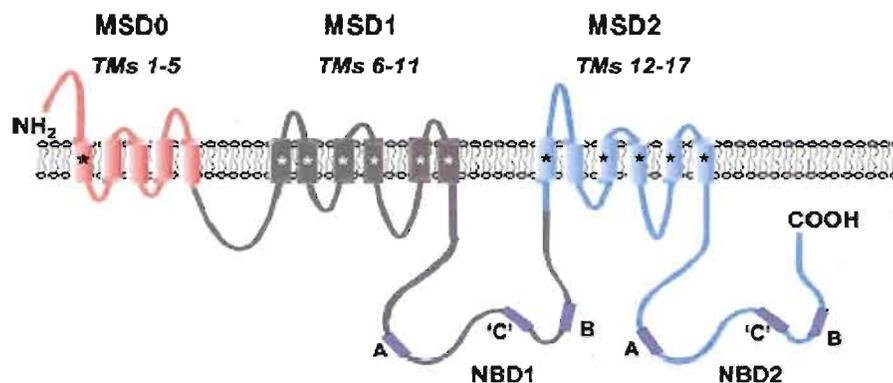


Figure 1.8 Structure de MRP1 : MRP1 est formée de 3 « membrane spanning domains » (MSD), composés de 5 ou 6 hélices transmembranaires (TM), et de 2 « nucleotide binding domains » (NBD) (contenant les séquences Walker A et B et la séquence C ('C')) (Deeley et Cole, 2006)

1.5.5.3 Localisation et mécanisme de résistance pléiotropique lié à MRP1

Dans les cellules résistantes, la surexpression de MRP1 au niveau des membranes, cause une augmentation de l'efflux ATP-dépendant du substrat hors des cellules, ce qui a pour conséquence de diminuer sa concentration intracellulaire (Lockhart *et al.*, 2003; Renes *et al.*, 2000). MRP1 serait également présente dans la membrane de vésicules intracellulaires sécrétées par l'appareil de Golgi et aiderait à la détoxification du noyau lors d'un traitement à l'ADR, par exemple, ce qui réduirait son efficacité (Aouali *et al.*, 2003; Rajagopal *et al.*, 2002; Renes *et al.*, 2000). MRP1 pourrait également agir avec un cotransporteur, le glutathion (GSH), qui se lierait aux métabolites à expulsés dans le milieu extracellulaire par MRP1 (Leslie *et al.*, 2001). Ce serait le cas de l'ADR qui, par la production de stress oxydatif permettrait la formation d'un métabolite issu de la peroxydation des lipides, l'aldéhyde α - β -insaturé 4-hydroxynonéal (4HNE) (Depeille *et al.*, 2004). La liaison du 4HNE avec le GSH (appelée phase II du métabolisme) mènerait à son élimination par MRP1 et serait un autre mécanisme de résistance engendré par MRP1 envers la cytotoxicité de l'ADR (Bakos et Homolya, 2006; Renes *et al.*, 2000).

1.6 Traitements alternatifs aux thérapies classiques contre le cancer

La résistance des cellules tumorales demeure un grave problème dans le traitement du cancer, puisqu'elle diminue l'efficacité des médicaments connus. La dose administrée aux patients doit alors être augmentée pour que l'action de l'agent anticancéreux soit optimale, causant ainsi une détérioration accrue des tissus sains environnants pouvant entraîner des effets indésirables importants. C'est pourquoi on tente de développer des traitements alternatifs employés seuls ou en combinaison avec la chimiothérapie. Les études en cours portent entre autres sur la chronothérapie, la thérapie antiangiogénique, l'hyperthermie, l'immunothérapie, l'électrothérapie, etc, dans le but de sensibiliser les cellules résistantes aux agents antinéoplasiques, ce qui augmenterait leur efficacité et permettrait de réduire ainsi les doses optimales de traitement.

1.6.1 Chronothérapie

La physiologie cellulaire est régulée sur un cycle de 24 heures, nommé rythme circadien. Ce dernier gouverne les événements quotidiens tels que le sommeil, les périodes

d'activité, la sécrétion hormonale, la prolifération cellulaire et le métabolisme. L'organisation circadienne pourrait être impliquée dans la réponse des cellules cancéreuses envers les agents antinéoplasiques (Mormont et Levi, 2003). En effet, il a été observé que le temps où un médicament est administré influencerait son efficacité ainsi que la tolérance des cellules envers cet agent. La chronothérapie est basée sur le rythme circadien et recherche le temps optimal d'administration des agents anticancéreux, permettant d'avoir une activité antitumorale et une dose maximale tout en augmentant la tolérance des patients, ce qui diminuerait les effets secondaires toxiques et augmenterait la qualité de vie des patients traités (Levi, 2006). Déjà, il a été démontré que le rythme circadien augmenterait l'efficacité d'une trentaine de médicaments chez le rat jusqu'à 50 % et permettrait ainsi d'augmenter, de façon sécuritaire, les doses prescrites de 30 à 40 % (Levi, 2001; Mormont et Levi, 2003).

1.6.2 Thérapie antiangiogénique

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'une vasculature déjà existante (Folkman, 1971; Mohan *et al.*, 2004). Elle est normalement observée lors de l'embryogénèse, la cicatrisation des plaies et la fonction reproductive adulte. L'hypoxie, la privation en nutriments et le stress oxydatif sont entre autres des conditions constitutives du microenvironnement tumoral (Longo *et al.*, 2002; Pandya *et al.*, 2006). Lorsque la tumeur atteint plus de 1 à 2 mm³, ces conditions favoriseraient la libération de facteurs proangiogéniques (par exemple, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)) et donc l'angiogénèse (Pandya *et al.*, 2006). Par conséquent, l'angiogénèse permettrait l'apport de nutriments et d'oxygène à la tumeur et contribuerait essentiellement à la croissance du cancer. De plus, les cellules endothéliales sécrèteraient des enzymes, les métalloprotéases (MMP), responsables de la destruction de la matrice extracellulaire ce qui causerait l'invasion de la tumeur, entre autre au niveau des vaisseaux sanguins et mènerait à la formation de métastases (Longo *et al.*, 2002). Une solution pour pallier à l'expansion du cancer serait d'inhiber la sécrétion de ces facteurs proangiogéniques par l'administration d'inhibiteur de l'angiogénèse. Une quinzaine d'inhibiteurs naturels sont connus jusqu'à maintenant, par exemple l'angiostatine, l'endostatine et l'antithrombine III (Longo *et al.*, 2002). Les recherches effectuées dans ce domaine ont bon espoir que ces facteurs antiangiogéniques, lorsque prescrits, auraient la possibilité de freiner la croissance de la

tumeur, et faciliterait ainsi son traitement par chimiothérapie (Longo *et al.*, 2002; Mohan *et al.*, 2004; Pandya *et al.*, 2006).

1.6.3 Immunothérapie

Il a été observé qu'une substance qui stimule les défenses immunitaires de l'organisme limite la prolifération cancéreuse. Par exemple, l'injection de bactérie dans des souris atteintes de cancer mènerait à la nécrose de la tumeur (Catros-Quemener *et al.*, 2003). Cela signifie que les cellules tumorales peuvent donc être reconnues par le système immunitaire. Effectivement, plusieurs antigènes tumoraux ont été identifiés tels que celui de la vessie (BAGE), de l'estomac (GAGE) et du rein (RAGE) (Catros-Quemener *et al.*, 2003; Enk *et al.*, 2006). Cependant, la réponse immunitaire antitumorale est souvent inefficace puisque les cellules tumorales font partie du « soi » et sont très faiblement inductrices de cette réponse. Le concept de base de l'immunothérapie est donc de stimuler le système immunitaire en injectant aux patients des cellules, telles que des cellules dendritiques, des macrophages activés avec des antigènes antitumoraux, capables de détruire spécifiquement les cellules tumorales, soit par contact direct, libération de substances tumoricides ou recrutement de cellules immunocompétentes cytotoxiques effectrices (Abastado, 2003; Catros-Quemener *et al.*, 2003; Enk *et al.*, 2006). La vaccination à l'aide de cellules sensibilisées par des lysats de cellules tumorales ou d'antigènes spécifiques de tumeur ont permis la régression tumorales chez certains patients atteints entre autres de carcinome pancréatique et de mélanome (Abastado, 2003; Bay et Blay, 2003; Enk *et al.*, 2006; Nestle *et al.*, 1998; Schnurr *et al.*, 2001).

1.6.4 Électrochimiothérapie

L'électrochimiothérapie implique la formation de pore au niveau de la membrane cytoplasmique dans les cellules soumises à un courant électrique, dans le but de faciliter l'entrée de médicaments anticancéreux non perméables ou semi-perméables telles que la bléomycine ou la cisplatine, à l'intérieur des cellules (Mir *et al.*, 2003; Satkauskas *et al.*, 2005). Dans les lignées cellulaires tumorales les pulsations électriques nécessaires à la perméabilisation de membrane seraient de 450/600 V/cm et de 400/600 V/cm pour un tissu cancéreux (Yang *et al.*, 2004). Les paramètres électriques varieraient, cependant, selon le

diamètre des électrodes, la dimension de la tumeur et le mode d'injection du médicament. L'injection du médicament en premier lieu suivi du courant électrique aurait pour effet, d'augmenter la concentration intracellulaire du médicament, ainsi que son efficacité, et permettrait de diminuer par le fait même, la dose prescrite et les effets secondaires (Labanauskiene *et al.*, 2006; Mir *et al.*, 2003; Satkauskas *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004).

1.7 Hyperthermie

1.7.1 Historique

La curiosité des chercheurs pour l'hyperthermie (HT) remonte aux premiers siècles de l'histoire. En effet, des papyrus égyptiens datant de 3000 BC, montreraient pour la première fois les vertus curatives de la chaleur (van der Zee, 2002). Au cours du 19^{ième} et 20^{ième} siècles, les mécanismes et les effets de HT, nommée alors « la thérapie par la fièvre », suscite l'intérêt de tous (Wust *et al.*, 2002). Déjà, en 1916, des médecins prescrivent des bains chauds et l'application locale de chaleur, aux patientes atteintes du cancer du col de l'utérus (Alexander, 2003).

1.7.2 Définition

L'hyperthermie (HT) consiste à élever artificiellement la température d'un corps ou d'une partie du corps, au-dessus de sa température physiologique (37°C). De nos jours, les études tendent à montrer que son action serait bénéfique de 40 à 45°C, puisqu'elle ciblerait les cellules tumorales sans affecter les cellules saines (Alexander, 2003; Hildebrandt *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2005; van der Zee, 2002; Vertrees *et al.*, 2005; Westermann *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006; Wust *et al.*, 2002). En effet, HT aurait davantage d'impact sur les cellules à pH acide, en phase de synthèse du cycle cellulaire et vivant en milieu appauvri en nutriments et en oxygène. Ce sont là les conditions typiques du microenvironnement des tumeurs solides, causées par une réduction du flux sanguin. HT y serait particulièrement efficace contrairement à la chimiothérapie (CT) et à la radiothérapie (RT) qui voient leur efficacité diminuer dans ces conditions (Hildebrandt *et al.*, 2002; van der Zee, 2002).

1.7.3 Traitement par HT au niveau clinique

Utilisée seule, HT permettrait une régression de la tumeur de 50 pourcent (Tannock et Hill, 1998). Cependant, ce n'est pas suffisant pour enrayer complètement la tumeur. La combinaison de HT à CT ou à RT semblerait être une avenue plus prometteuse (Wust *et al.*, 2002). Plusieurs études tendent à démontrer qu'effectivement HT, prescrite comme thérapie adjuvante, aurait des effets additifs et synergiques avec RT et CT (doxorubicine, melphalan, mitomycine C, cisplatine, bléomycine, etc) (Alexander, 2003; Hildebrandt *et al.*, 2002; Vertrees *et al.*, 2005; Westermann *et al.*, 2005). De manière concrète, HT sensibiliserait les cellules tumorales aux effets cytotoxiques de CT et de RT, probablement en augmentant la perméabilité membranaire et l'accumulation intracellulaire des agents de chimiothérapie, tout en inhibant la réparation de l'ADN dans les deux cas (Alexander, 2003; Hildebrandt *et al.*, 2002). Des études réalisées montrent que HT n'aurait pas d'effet direct sur l'ADN, comme il était cru dans les années 1960, mais faciliterait par ses effets décrits précédemment l'entrée et l'action nucléaire de RT ou de CT, au niveau de l'ADN (Hildebrandt *et al.*, 2002). Les effets de HT ont maintes fois été démontrés en milieu clinique et de façon générale, lorsqu'utilisé comme traitement adjuvant, HT augmente le taux de réponse, le contrôle local de la tumeur, les effets palliatifs et le pourcentage de survie d'un cancer (van der Zee, 2002). Par exemple, dans le cas du cancer du col de l'utérus, HT augmenterait le taux de contrôle du cancer après 3 ans de 41 à 61%, et le taux de survie après 3 ans de 27 à 51 % (van der Zee, 2002).

1.7.4 Techniques d'application de la chaleur

L'administration de HT peut être locale (externe, intraluminale et interstitielle), régionale (membre, organe, cavité) et généralisée (tout le corps). L'énergie thermique nécessaire afin d'induire une mort tumorale serait d'environ 140 kcal/mol, ce qui est près de l'énergie thermique nécessaire à la dénaturation des protéines (Hildebrandt *et al.*, 2002). Cette énergie peut être créée artificiellement, par des champs électriques, des micro-ondes, des ultrasons (radio-fréquence), des ondes électromagnétiques, des liquides chauds (réperfusion) et de l'air chaud (chambre thermique) (Hildebrandt *et al.*, 2002; Kawai *et al.*, 2005; van der Zee, 2002; Wu *et al.*, 2006).

1.7.5 Biochimie de HT

Un traitement par HT entraînerait plusieurs modifications biochimiques au niveau cellulaire, tels que certains changements de conformation protéique, la stimulation de la réponse immunitaire, l'altération du microenvironnement tumoral et l'induction de l'apoptose. Effectivement, des températures supérieures à 40°C causeraient la dénaturation des enzymes impliquées entre autres dans la synthèse et la réparation de l'ADN, des protéines membranaires, ainsi que celles du cytosquelette (Hildebrandt *et al.*, 2002; Kampinga, 2006; Lepock, 2005; van der Zee, 2002; Wust *et al.*, 2002). Il a été découvert que certaines lignées cellulaires cancéreuses pourraient développer de la thermotolérance, *in vitro*. Les cellules tumorales étant reliées à ce phénotype exprimeraient des protéines de choc thermique (HSP) qui protégeraient les cellules lors de stress (Kampinga, 2006; van der Zee, 2002). Cependant, *in vivo*, il semblerait que les HSP 70 et 72, sous HT, seraient présentées comme antigène à la surface des cellules tumorales, ce qui augmenterait la reconnaissance et la réponse immune médiées par des lymphocytes T cytotoxiques contre les cellules cancéreuses (Hildebrandt *et al.*, 2002; van der Zee, 2002). Il semblerait qu'effectivement, HT augmenterait la réponse de traitement lorsque combiné avec l'immunothérapie (Baronzio *et al.*, 2006).

1.7.6 Combinaison de HT et de la chimiothérapie

Bien qu'on ait peu de connaissances concernant le mécanisme exact de HT, il n'en demeure pas moins que ce traitement est un adjuvant prometteur, qui permettrait de diminuer les doses de médicaments anticancéreux administrés. Ainsi, cela permettrait aussi de réduire les effets secondaires indésirables tels que la cardiotoxicité causée par l'ADR, tout en ayant une certaine spécificité de traitement envers la tumeur.

Des études ont montré que HT permettrait également de renverser la résistance primaire aux médicaments tels que le cisplatine, le methotrexate et la mitomycine C chez des cellules ayant développé une résistance suite à un premier traitement (Herman *et al.*, 1981; Raaphorst *et al.*, 1996). De plus, il a été observé que HT permettrait d'augmenter la réponse aux agents cytotoxiques comme le melphalan, l'ADR et l'étoposide, utilisés dans les cellules résistantes d'ovaires de hamsters chinois surexprimant la P-gp (CH^RC5) et plus récemment, dans les cellules résistantes HeLa exprimant la MRP1 (HeLa MRP+) (Bates et Mackillop,

1990; Larrivee et Averill, 2000; Souslova et Averill-Bates, 2004). L'utilisation d'inhibiteurs de la fonction de la P-gp tels que la cyclosporine A, le verapamil et le PSC 833, ou la présence d'un inhibiteur de la glutathion S-transférase (GST) comme l'acide éthacrynique, augmenterait l'efficacité de la sensibilisation des cellules résistantes par HT (Averill et Larrivee, 1998; Averill et Su, 1999; Liu *et al.*, 2001; Turcotte et Averill-Bates, 2001). Sans révéler le mécanisme exact de HT sur les cellules résistantes, il semblerait que HT augmenterait l'efficacité de traitement par augmentation de la pénétration des agents anticancéreux dans les cellules tumorales résistantes et non résistantes (Bates et Mackillop, 1990; Leng *et al.*, 2006; Rietbroek *et al.*, 1999). Il a toutefois été récemment suggéré que le renversement de la résistance pléiotopique aux médicaments pourrait être attribué à la diminution de l'expression des gènes MDR1 et MRP, lorsque les cellules sont exposées à un traitement combiné de HT et de chimiothérapie (Leng *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2003).

1.8 La mort cellulaire

1.8.1 Son implication dans les thérapies anticancéreuses

Les méthodes de traitements utilisées pour combattre le cancer, que ce soit la chimiothérapie, la radiothérapie ou les méthodes alternatives (HT) visent l'élimination des cellules cancéreuses. Les résultats suite à ces traitements anticancéreux sont jugés favorables lorsqu'il y a réduction du nombre de cellules cancéreuses. Cette réduction implique la mort des cellules cancéreuses qui peut être déclenchée par divers mécanismes. Depuis les dernières années, ces mécanismes de mort cellulaire font l'objet de recherches intenses puisque les scientifiques croient que leur compréhension permettra le développement de nouvelles stratégies ayant pour but d'augmenter l'efficacité et la sélectivité des traitements conventionnels. Concrètement, l'augmentation de la mort des cellules cancéreuses est ciblée, tout en tentant de limiter les effets indésirables aux tissus sains.

1.8.2 Généralités

La mort cellulaire est avant tout, un phénomène physiologique présent dans toutes les cellules de mammifères. Elle est essentielle entre autres à la morphogénèse, au développement embryonnaire et au maintien de l'homéostasie cellulaire dans les tissus adultes (Orrenius *et al.*, 2007). Lorsque des dérégulations de ces mécanismes surviennent, la

mort cellulaire devient pathologique. Par exemple, lors de cancer et de maladie auto-immune, elle serait absente, ce qui laisserait les cellules anormales libres de croître indéfiniment (Danial et Korsmeyer, 2004). Au contraire, la mort neuronale serait démesurée dans le cas des maladies neurodégénératives, telles que le Parkinson et l'Alzheimer (Segal-Bendirdjian *et al.*, 2005).

La mort cellulaire peut s'effectuer selon une variété de mécanismes distincts, dont l'apoptose, l'autophagie et la nécrose demeurent les mieux caractérisés. Les deux premiers étant considérés comme des mécanismes (énergie-dépendants) hautement régulés menant à l'autodestruction d'une cellule ou d'un organelle, respectivement (Danial et Korsmeyer, 2004). La formation de corps cellulaires enveloppés de la membrane plasmique, permettrait ainsi leur élimination, tout en évitant une réponse inflammatoire. La nécrose, pour sa part, impliquerait une libération passive du contenu de la cellule dans le milieu extracellulaire, endommageant ainsi les tissus à proximité, déclenchant par le fait même, la réponse immune.

1.9 L'apoptose

Le terme apoptose provient du grec, « apo » signifiant « séparé de » et « ptosis » référant à « tombé de » (Kerr *et al.*, 1972). Par la suite, des études effectuées chez le nématode *caenorhabditis elegans*, la drosophile et d'autres mammifères, ont permis de mieux caractériser ce phénomène (Jin et El-Deiry, 2005).

1.9.1 Morphologie

Une cellule en apoptose peut être reconnue par sa forme arrondie et son inhibition de contact avec les cellules voisines, la dilatation de son réticulum endoplasmique permettant la formation de vacuoles et la condensation de sa chromatine à l'intérieur du noyau, qui est fragmentée par des endonucléases. Les corps apoptotiques résultant de la fragmentation de la cellule sont dégradés par les éboueurs cellulaires tels que les macrophages. L'apoptose est donc un mécanisme de mort cellulaire propre puisque les corps apoptotiques sont entourés d'une partie de la membrane, ce qui limite l'inflammation (Jin et El-Deiry, 2005; Orrenius *et al.*, 2007).

1.9.2 Protéines de régulation

1.9.2.1 Les caspases

Découvertes en 1993, les caspases ou protéases riches en cystéines, sont le cœur même de la signalisation de l'apoptose (Yuan *et al.*, 1993). Ces protéines, synthétisées sous forme de zymogènes inactives, appelées procaspases, sont formées de deux sous-unités catalytiques: une grande et une petite (Danial et Korsmeyer, 2004; Orrenius *et al.*, 2007). La proximité et l'agrégation de plusieurs procaspases peuvent induire leur dimérisation, menant à leur autoactivation. Une fois activées, elles sont libres d'aller cliver des protéines cytosoliques cibles, telles que des médiateurs et des régulateurs de l'apoptose et des protéines structurales, de réparation de l'ADN ou du cycle cellulaire, au niveau de résidus aspartate spécifiques, et inhiber ainsi leur fonctionnalité (Thornberry, 1998). Chez les mammifères, on dénombre jusqu'à maintenant, 14 caspases différentes. Certaines sont dites, inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11, 13 et 14), initiatrices (caspases 2, 8, 9, 10 et 12), et effectrices (caspases 3, 6 et 7) (Chowdhury *et al.*, 2006; Danial et Korsmeyer, 2004; Jin et El-Deiry, 2005; Kidd *et al.*, 2000; Orrenius *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005).

1.9.2.2 La famille Bcl-2

Une autre famille importante dans la régulation de l'apoptose est celle de Bcl-2 (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Elle comprend environ une quinzaine de membres chez les mammifères, dont certains sont proapoptotiques (bax, bak, bid, bik, bad) et anti-apoptotiques (bcl-2, bcl-xl). Le ratio entre les molécules pro et antiapoptotiques semble décisif dans l'enclenchement de l'apoptose ou le développement d'une tumeur (Hail *et al.*, 2006; Ozoren et El-Deiry, 2003; Zhivotovsky et Orrenius, 2006).

1.9.3 Principales voies de signalisation

L'apoptose peut être induite par des signaux cellulaires tels que le manque de nutriments, les UV, les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'oxyde nitrique (NO) et plusieurs autres (Ozoren et El-Deiry, 2003). La sensibilité de la cellule à ces différents stimuli peut être dépendante de certains facteurs comme le taux d'expression de protéines pro ou antiapoptotiques, la sévérité du stimulus et le stade du cycle cellulaire (Lawen, 2003). L'apoptose peut être activée selon trois principales voies, soit celle des récepteurs de mort

(extrinsèque), la voie mitochondriale (intrinsèque) et la voie du réticulum endoplasmique. Ces trois voies menant à l'activation d'enzymes responsables de dégrader l'ADN cellulaire (Klener *et al.*, 2006).

1.9.3.1 La voie des récepteurs de mort

Il existe plusieurs récepteurs membranaires pouvant activer l'apoptose. Ils sont subdivisés en deux grandes familles : les facteurs de nécrose tumorale (TNF) et les facteurs de croissance neuronale (NGF). Ils comprennent 8 récepteurs membranaires : TNF-R1, Fas, les récepteurs de mort (Schnurr *et al.*) (DR-3 , DR-4 (TRAIL-R1), DR-5 (TRAIL-R2) et DR-6), le récepteur de dysplasie ectodermique (EDA-R) et NGF-R (Ozoren et El-Deiry, 2003; Philchenkov, 2004).

La voie du récepteur Fas est la mieux connue (voir figure 1.9). Elle est activée par interaction du récepteur Fas avec le Fas ligand, exprimé par les lymphocytes T activés ou les cellules voisines, via leur domaine de mort (DD) (Igney et Krammer, 2002; Schultz et Harrington, 2003). Le résultat de cette interaction étant le recrutement d'une protéine adaptatrice nommée domaine de mort associé à Fas (FADD) permettant la fixation de la procaspase 8, par l'entremise de domaines effecteurs de mort (DED) (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Ces trois composantes forment un complexe d'induction du signal de mort (DISC), qui permet l'autoactivation de la procaspase 8 en caspase 8. La caspase 8 peut directement activer la procaspase 3 en caspase 3 par clivage. Cette dernière permettant de couper les inhibiteurs de la caspase activatrice de DNase (ICAD) et de libérer cette nucléase (CAD), qui peut alors procéder à la fragmentation de l'ADN (Debatin et Krammer, 2004; Klener *et al.*, 2006; Nagata, 2000).

1.9.3.2 La voie mitochondriale

Lors d'endommagements de l'ADN par des stimuli internes, tels que des irradiations, des produits toxiques et le stress oxydatif, la voie mitochondriale d'apoptose se met en branle (Jin et El-Deiry, 2005; Klener *et al.*, 2006). Cependant, cette voie peut aussi servir à amplifier le signal provenant de la voie des récepteurs de mort. Effectivement, lorsque la caspase 8 est activée, elle peut déclencher l'activation parallèle de la voie mitochondriale, en coupant Bid (Wang *et al.*, 1996), une protéine proapoptotique servant de lien entre les deux voies (« cross

talk »). Une partie de Bid appelée t-Bid peut alors être transférée vers la membrane de la mitochondrie (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Ceci induirait la translocation, l'oligomérisation et l'insertion de Bax ou Bak au niveau de la membrane externe de cette dernière, induisant alors la formation de pores mitochondriaux (Orrenius *et al.*, 2007). Des molécules proapoptotiques telles que les facteurs inducteurs d'apoptose (AIF), l'endonucléase G, les sérines protéases activées à haute température (HtrA2/Omi), le second activateur mitochondrial de caspases (Smac/Diablo) et cytochrome C, localisées dans l'espace intermembranaire, sont par le fait même libérées dans le cytosol (Seong *et al.*, 2004). Certaines de ces molécules sont directement transportées au noyau (endo G, AIF, HtrA1/Omi) et d'autres, par exemple Smac/Diablo et cytochrome C, peuvent activer des caspases. En effet, le cytochrome C est alors combiné, en présence d'ATP, au facteur activateur de protéases apoptotiques (Apaf-1) et au domaine recruteur de caspase (Verheul *et al.*) de la procaspase 9 pour former un heptamère nommé apoptosome (Li *et al.*, 1997; Shi, 2006; Zou *et al.*, 1999). Ce complexe permet l'activation par clivage de la procaspase 9 en caspase 9. La caspase 9 ayant à ce stade la possibilité d'activer la procaspase 3 en caspase 3 permet la dégradation de l'ADN de la même manière que la voie des récepteurs de mort (figure 1.9) (Danial et Korsmeyer, 2004; Kidd *et al.*, 2000; Kleener *et al.*, 2006).

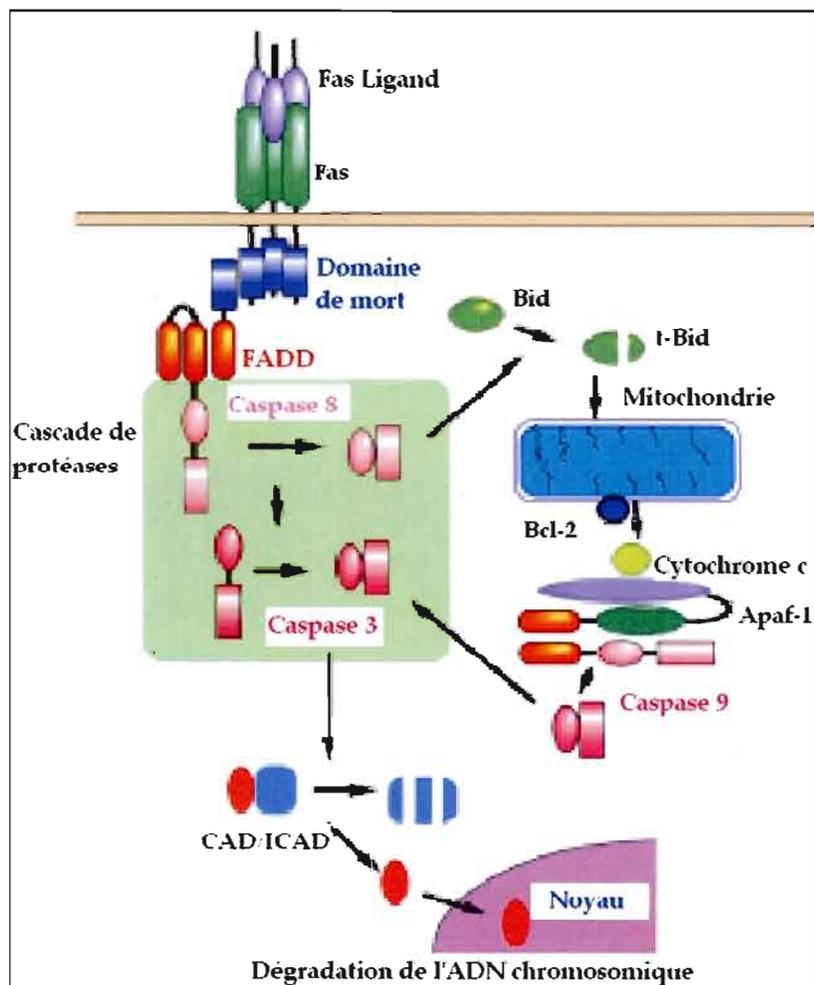


Figure 1.9 : Principales voies d'apoptose. La voie des récepteurs de mort (FAS) est activée par la liaison de FASL. Le recrutement de FADD et de la procaspase 8 à la membrane plasmique permet l'autoactivation de la caspase 8 qui peut alors entraîner l'activation de caspases exécutrices de l'apoptose (ex : caspase 3). La voie mitochondriale peut également être activée par le clivage de Bid de la part de la caspase 8. Une partie de Bid, le Bid tronqué (t-Bid) se déplace alors vers la mitochondrie, ce qui permet la relâche de cytochrome C. Celui-ci est alors combiné à l'Apaf-1 et à la caspase 9, pour mener à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase 3. La caspase 3 entraînant le clivage des inhibiteurs de la caspase activatrice de DNase (ICAD) permet de libérer cette nucléase (CAD), qui peut alors procéder à la fragmentation de l'ADN (Nagata, 1999).

1.9.3.3 La voie du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment cytosolique fortement impliqué dans la synthèse des protéines. Comme d'importantes concentrations de protéines sont contenues dans le RE, la présence de protéines chaperonnes telle que la protéine contrôlée par le glucose (GRP78), est indispensable (Faitova *et al.*, 2006). En effet, les protéines chaperonnes (ex: GRP78) s'assurent du bon repliement des protéines et préviennent leur agrégation. Les protéines qui ne mûrissent pas correctement sont fixées par GRP78 et retenues dans le RE jusqu'à ce qu'elles soient dégradées par le protéasome dans le cytosol. Suite à différents stimuli tels que l'hypoxie, le manque de nutriments, un changement de pH, une variation d'ions calciques, et plusieurs autres, il peut y avoir agrégation et accumulation de protéines ayant un défaut de conformation (Faitova *et al.*, 2006; Gupta, 2005; Xu *et al.*, 2005). Cette situation de stress au niveau du RE peut initier une réponse « unfolded protein response » (UPR), qui tentera de rétablir une situation normale (Kaufman, 1999). Cependant, l'échec de cette réponse et la présence de stress prolongé dans le RE, peuvent alors déclencher l'apoptose (Danial et Korsmeyer, 2004; Faitova *et al.*, 2006; Momoi, 2004).

Les situations de stress prolongé au niveau du RE peuvent activer des cascades de transduction du signal apoptotique (Rutkowski et Kaufman, 2004). Une des protéines transmembranaires du RE, impliquée dans cette cascade, est « inositol-requiring gene-1 » (IRE1) qui est normalement maintenue inactive par association avec la protéine chaperonne GRP78 (Faitova *et al.*, 2006). Lors de stress prolongé au niveau du RE, la GRP78 se dissocie de la protéine IRE1 laissant alors IRE1 libre de recruter la protéine adaptatrice nommée deuxième facteur associé au récepteur TNF (TRAF 2) (Momoi, 2004; Szegezdi *et al.*, 2006). TRAF 2 activerait la voie mitochondriale de l'apoptose par l'entremise de la protéine kinase régulatrice du signal apoptotique (ASK) et de la kinase c-Jun amino terminale (JNK) (Xu *et al.*, 2005). Une autre voie possible d'activation du signal apoptotique serait celle impliquant la procaspase 12 qui est aussi ancrée à la membrane du RE. En effet, la procaspase 12 pourrait être activée soit par le recrutement de TRAF2 par IRE1, par les calpaïnes ou par la caspase 7 (Gupta, 2005; Momoi, 2004; Szegezdi *et al.*, 2006). Néanmoins, le résultat de l'activation de la procaspase 12 reste le même que pour les autres voies d'activation de

l'apoptose, soit la fragmentation de l'ADN par la DNase (Kidd *et al.*, 2000; Schroder et Kaufman, 2005; Szegezdi *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2005).

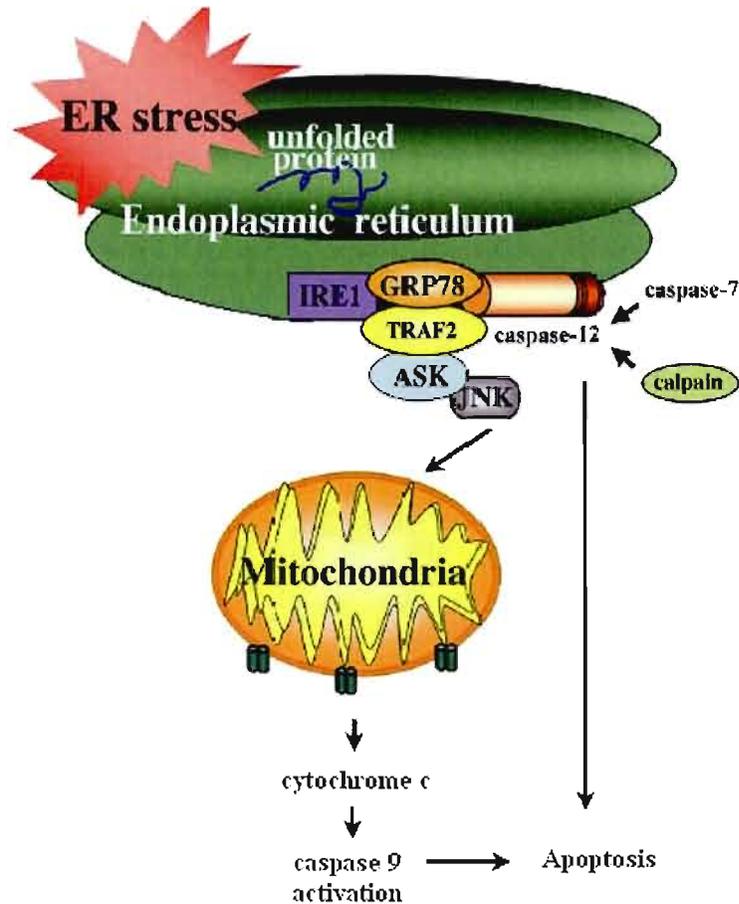


Figure 1.10 Voie apoptotique du réticulum endoplasmique : Lors de stress prolongé du RE, la protéine chaperonne GRP78 se dissocie de la protéine IRE1, ancrée à la membrane du RE, ce qui permet le recrutement de la protéine adaptatrice TRAF2. Le recrutement et l'activation de la protéine kinase ASK par TRAF 2 permettent alors le déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose par l'entremise de l'activation de la kinase JNK. De plus, l'activation de la procaspase 12, également fixée à la membrane du RE, par le recrutement de TRAF2, les calpaïnes ou la caspase 7 pourrait aussi déclencher l'apoptose (Momoi, 2004).

1.9.4 Mécanismes de résistance à l'apoptose

L'apoptose est un processus complexe impliquant plusieurs gènes et protéines ayant un rôle spécifique à jouer dans le bon déroulement de la cascade apoptotique. Lors de progression

d'une tumeur, les cellules cancéreuses peuvent développer des mécanismes de résistance à l'apoptose qui leurs permettraient d'échapper au système immunitaire (Bremer *et al.*, 2006). Par exemple, ces mécanismes d'évasion peuvent impliquer la mutation de gènes proapoptotiques tel que le gène supresseur de tumeur (p53) (inactif dans 50 % des cancers) et la surexpression de protéines antiapoptotiques (Bcl-2) (Bremer *et al.*, 2006; Gerl et Vaux, 2005; Wilson, 2006). Non seulement ces déféctuosités empêchant la mort par apoptose des cellules anormales peuvent contribuer au développement de cancer, mais ces déféctuosités entravent également l'action de la radiothérapie et de la chimiothérapie (Wilson, 2006). En effet, puisque les radiations et les médicaments anticancéreux permettent l'élimination des cellules cancéreuses par induction de l'apoptose, des dérégulations menant à l'inhibition de l'apoptose peuvent être des causes de radiorésistance ou de chimiorésistance (Bremer *et al.*, 2006; Katsman *et al.*, 2007). Plusieurs études cliniques sont présentement en cours et tentent de combattre cette résistance contre l'apoptose en sensibilisant les cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapie suivant différents mécanismes dont, entre autres, l'inhibition de la protéine antiapoptotique Bcl-2 par utilisation d'un oligonucléotide antisens (Genasense, étude clinique de phase III) (Badros *et al.*, 2005) ou la réactivation de l'activité d'un gène p53 mutant par un composé activateur tel que le réactivateur dépendant de p-53 et induction massive de l'apoptose-1 (PRIMA-1) (étude préclinique *in vivo*) (Bykov *et al.*, 2002).

1.10 Contexte actuel du projet

Les thérapies contre le cancer visent l'élimination complète des cellules tumorales. La mort des cellules cancéreuses pourrait se faire par apoptose ou par nécrose. Ces deux formes de mort cellulaire étant très distinctes sont, toutefois, très reliées et peuvent être déclenchées par un même stress. Cependant, l'intensité du stress est l'élément déterminant dans l'activation de l'une ou l'autre des morts cellulaires. Par exemple, les agents chimiothérapeutiques peuvent déclencher soit l'apoptose ou la nécrose selon le temps et la dose d'exposition (Guchelaar *et al.*, 1997). Cependant, à des doses physiologiques, les agents anticancéreux activeraient l'apoptose chez les cellules tumorales (Bold *et al.*, 1997; Russo *et al.*, 2006).

L'utilisation de ces agents est cependant limitée par leur toxicité causée aux tissus sains et le phénomène cellulaire de résistance aux médicaments (MDR), conféré entre autres par des protéines transmembranaires de type P-gp et MRP. L'hyperthermie (HT), comme traitement adjuvant à la chimiothérapie (CT), est une avenue très prometteuse dans la lutte contre le cancer. En effet, les cellules cancéreuses possédant le phénotype MDR ne sont pas nécessairement résistantes à la chaleur et l'utilisation de HT peut faciliter l'élimination de ces cellules. De plus, HT permettrait également de sensibiliser les cellules résistantes au traitement de CT. À cet effet, des études ont montré que HT peut causer la mort des cellules cancéreuses par apoptose (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Ren *et al.*, 2006; Souslova et Averill-Bates, 2004; Yoo *et al.*, 2006) mais que la cytotoxicité des deux traitements combinés (HT+CT), serait supérieure à celle de ADR et de HT séparément (Bates et Mackillop, 1986; Larrivee et Averill, 2000; Liu *et al.*, 2001). Or, les mécanismes spécifiquement impliqués dans le signalment de l'apoptose engendrée par HT et CT, seule ou combinée, n'ont pas été résolus, tant chez les cellules non résistantes que chez les cellules résistantes et font l'objet de plusieurs recherches (Klostergaard *et al.*, 2006; Mizutani *et al.*, 1997). La compréhension de ces mécanismes permettra, sans doute, une efficacité de traitement accrue envers les cellules tumorales sensibles et résistantes.

À ce sujet, des recherches effectuées dans le laboratoire du Dre Averill ont montré que HT induit la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules cancéreuses

d'adénocarcinome cervical HeLa (Bettaieb et Averill-Bates, 2005), ainsi que sur les cellules HeLa transfectées à l'aide du gène de résistance pléiotropique aux médicaments (MRP) (HeLa MRP+) (Souslova et Averill-Bates, 2004). Ce gène de résistance codant pour la protéine MRP1 confère aux cellules HeLa MRP+, une résistance à l'actinomycine D, l'étoposide, l'ADR et la vincristine (Kast et Gros, 1998). L'activation de la voie mitochondriale a été induite lorsque ces deux lignées cellulaires ont été exposées à l'ADR pour une durée de 18 h en combinaison avec HT à 42°C pendant la première heure du traitement (Barot et Averill-Bates, en préparation).

D'autres études ont également montré que l'exposition à des agents thérapeutiques tels que étoposide, cisplatine, bléomycine, méthotrexate et doxorubicine (ADR), peut aussi induire l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (Debatin et Krammer, 2004; Vermeulen *et al.*, 2005). En effet, ces médicaments déclencheraient l'apoptose en altérant l'expression des récepteurs de mort et de leurs ligands à la surface des cellules (Fan et Guo, 2001). Plus particulièrement, l'expression du récepteur Fas et de son ligand (FasL) aurait une implication importante dans la cytotoxicité médiée par les médicaments énumérés ci-haut (Sharma *et al.*, 2000). Dans le cas de bléomycine, méthotrexate et doxorubicine, il a été observé que ces médicaments pouvaient augmenter l'expression du FasL à la membrane des cellules (leucémie, tumeur solide, neuroblastome, hépatoblastome, médulloblastome, carcinome du colon, cancer du sein) et de ces observations, il a été suggéré que FasL pourraient mener à une activation autocrine ou paracrine de l'apoptose par la voie de FasR/FasL (Friesen *et al.*, 1999; Mollinedo et Gajate, 2006). Peu d'informations sont connues quant à la nature des mécanismes qui régulent l'expression de FasR/FasL mais Petak *et al.* (2001) ont proposé une modulation de FasR/FasL par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) lors d'exposition à des agents de chimiothérapie (Petak et Houghton, 2001).

1.11 Hypothèse et objectifs du projet

La revue des études précédentes permet d'émettre quelques hypothèses. Dans un premier temps, l'hyperthermie sensibiliserait les cellules résistantes au traitement par ADR, augmentant ainsi, l'efficacité du traitement de chimiothérapie. Dans un second temps, il est

également plausible de se demander si l'activation de la voie mitochondriale par ADR, seul ou combiné avec HT, ne pourrait pas survenir suite à l'induction de la voie des récepteurs de mort, en particulier du récepteur Fas induit par son ligand (FasL) chez les cellules sensibles (HeLa MRP-) et les cellules résistantes (HeLa MRP+). Finalement, tel que mentionné plus tôt, HT seul peut également induire l'apoptose dans les cellules tumorales, et la voie des récepteurs de mort pourrait potentiellement y être activée avant la voie mitochondriale. Afin d'éclaircir les mécanismes de transduction du signal apoptotique induit par HT et ADR, l'activation de la voie des récepteurs de mort sera étudiée lors de traitement des cellules HeLa et HeLa MRP+ par ADR et HT, individuellement ou en combinaison.

Les objectifs spécifiques découlant de ces hypothèses tenteront de vérifier :

1. Le mécanisme d'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (Fas), chez les cellules HeLa et HeLa MRP+ soumises à ADR.
2. L'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (Fas), chez les cellules HeLa, suite à HT.
3. Si les cellules HeLa surexprimant la protéine de résistance aux médicaments MRP1 (HeLa MRP+) résistent à l'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (Fas) induite par ADR.
4. La réduction du seuil de résistance des cellules cancéreuses surexprimant la protéine MRP1 induit par l'effet couplé de ADR et de HT.

Une activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort (Fas) est attendue suite à l'exposition des cellules HeLa et HeLa MRP+ à l'ADR ou HT individuellement. De plus, une activation plus marquée devrait être observée suite à HT et des concentrations croissantes d'ADR. La voie des récepteurs de mort (Fas) devrait également être plus activée chez les cellules HeLa, comparativement aux cellules résistantes (HeLa MRP+), puisque le traitement combiné devrait augmenter la mort cellulaire par apoptose, chez les deux lignées cellulaires par rapport aux traitements individuels.

Les mécanismes impliqués dans l'activation de la voie du récepteur de mort Fas, par ADR et/ou HT, seront étudiés dans la présente recherche, selon les étapes suivantes :

1. Détection de l'activité des caspases 8, 9 et 3.
2. Détection de l'expression du récepteur Fas et de son ligand (FasL).
3. Vérification du recrutement de FADD, du cytosol vers la membrane plasmique.
4. Détection des espèces réactives de l'oxygène (ROS).
5. Détection de l'expression de FasL et de l'activité de la caspase 8 suite à l'inhibition des ROS.

Lors de l'activation de la voie des récepteurs de mort (Fas), par ADR et HT de manière individuelle ou combinée, la trimérisation du récepteur Fas devrait se faire par liaison de son ligand, FasL, ce qui devrait entraîner une augmentation de l'expression de FADD et de la procaspase 8, au niveau de la membrane plasmique, formant ainsi le complexe DISC, nécessaire à l'autoactivation de la procaspase 8 en caspase 8. Suite à cette dernière étape, l'activation des caspases 3 et 9 est attendue. Une augmentation de la production de ROS est attendue et pourrait possiblement permettre l'augmentation de l'expression de la glycoprotéine FasL qui serait à l'origine de l'activation du signal apoptotique.

Suite à l'achèvement de ce projet, il sera possible d'éclaircir davantage le mécanisme d'apoptose engendré par ADR et HT, chez les cellules sensibles HeLa et les cellules résistantes (HeLa MRP+). De plus, ce projet permettra aussi de recueillir des données supplémentaires sur la sensibilisation des cellules résistantes à la CT, grâce à HT. Ces informations pourront s'avérer fort utiles dans le présent contexte, où l'on se tourne vers de nouvelles avenues afin de maximiser les effets thérapeutiques des agents de chimiothérapie sur les cellules cancéreuses résistantes et non résistantes. La compréhension des mécanismes d'apoptose impliqués dans les traitements de CT et/ou HT permettra également d'optimiser la spécificité et l'efficacité des traitements de CT aux cellules cancéreuses tout en diminuant les dommages aux cellules saines, limitant ainsi les effets secondaires indésirables qui compromettent sérieusement la qualité de vie des patients.

CHAPITRE II

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

2.1 Préface

Ce chapitre inclut un manuscrit présentant les résultats expérimentaux liés au projet de recherche concernant l'étude des mécanismes apoptotiques impliqués dans le traitement des cellules cancéreuses résistantes et non résistantes par l'Adriamycine, un agent anticancéreux, ainsi que l'utilisation de l'hyperthermie comme traitement adjuvant dans le but de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes aux traitements par l'Adriamycine. L'article qui sera bientôt soumis à la revue *Biochemical Pharmacology*, a pour titre : « Mechanisms of toxicity induced by Adriamycin and sensitization of MDR tumor cells by hyperthermia ». C'est afin de satisfaire aux exigences reliées à l'obtention du diplôme de maîtrise à l'UQAM, que j'ai moi-même, Catherine Lauzon, procédé à la réalisation du travail expérimental ainsi qu'à la rédaction du mémoire et du manuscrit de l'article sous la supervision de ma directrice de recherche Dre Averill.

2.2 Résumé de l'article

L'Adriamycine est un des agents anticancéreux les plus efficaces sur le marché. Son utilisation comporte toutefois certaines limitations telles que la cardiotoxicité et la résistance pléiotropique aux médicaments (MDR). Ce phénotype MDR acquis suite à l'utilisation d'agents chimiothérapeutiques est souvent associé à l'efflux des médicaments en dehors des cellules cancéreuses. Cet efflux peut être causé par la surexpression des protéines de résistance pléiotropique (P-gp et MRP1). Afin d'augmenter l'efficacité des traitements contre le cancer et de renverser le phénotype MDR, la chimiothérapie peut être combinée à l'hyperthermie. Les mécanismes de cytotoxicité de l'hyperthermie lorsque combinée à la chimiothérapie ne sont toutefois pas bien compris. Dans cette étude, les mécanismes de signalisation apoptotique ont été étudiés chez les cellules d'adénocarcinomes cervicaux (HeLa), sensibles au traitement de chimiothérapie, et les cellules HeLa MRP+, comportant un phénotype MDR, suite à l'exposition à l'Adriamycine et à l'hyperthermie (42°C). Cette étude démontre qu'il y a une hausse de la production de l'anion superoxyde par l'Adriamycine ainsi qu'une activation précoce (après 2h) de la voie du récepteur de mort Fas. Ceci s'étant manifesté par l'augmentation de l'expression membranaire des protéines Fas ligand et domaine de mort associé à Fas (FADD) ainsi que par l'augmentation de l'activité de la caspase 8. L'augmentation de la production de l'anion superoxyde, de l'expression de Fas ligand et de l'activité de la caspase 8 ont été inhibées par l'antioxydant Mn TBAP. Ceci suggère que l'activation de la voie des récepteurs de mort est médiée par le stress oxydatif. Le traitement par l'hyperthermie seule a également montré une augmentation de la production de l'anion superoxyde et une activation de la voie des récepteurs de mort. De plus, l'accroissement du taux d'apoptose et de production de l'anion superoxyde dans les cellules sensibles suggère que l'hyperthermie pourrait être utile afin d'accroître l'efficacité de l'Adriamycine dans les cellules sensibles et résistantes aux médicaments.

MOTS CLÉS : Chimiothérapie, Adriamycine, Résistance pléiotropique, MRP1, Hyperthermie, Apoptose, cellules HeLa

2.3 Manuscrit de l'article

**MECHANISMS OF TOXICITY INDUCED BY ADRIAMYCIN AND
SENSITIZATION OF MDR TUMOR CELLS BY HYPERTHERMIA**

Catherine Lauzon¹ and Diana A. Averill-Bates*^{1,2}

¹Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal
CP 8888, Succursale Centre Ville, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

*To whom correspondence should be addressed

Dr Diana A. Averill-Bates, PhD

Département des Sciences Biologiques

Université du Québec à Montréal

CP8888, Succursale Centre-Ville

Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

Tel : (514) 987-3000 (4811) ; Fax (514) 987-4647;

Email : averill.diana@uqam.ca

² Formerly Diana Bates

Running head: Apoptosis, heat shock, multidrug resistance

Key words:

Adriamycin

Multidrug resistance

Multidrug resistance protein 1

Hyperthermia

Apoptosis

Death receptor

ABSTRACT

Adriamycin is among the most effective anticancer agents on the market. However its use is limited by problems such as cardiotoxicity and multidrug resistance (MDR). The acquired MDR phenotype to chemotherapeutic agents (ex: Adriamycin) is often associated with drug efflux from tumor cells caused by overexpression of membrane proteins (P-glycoprotein and MRP1). In order to improve the effectiveness of cancer treatment and to overcome MDR, chemotherapy can be combined with hyperthermia. However, the mechanisms of cytotoxicity of hyperthermia combined with chemotherapy are not well understood. In this study, the apoptotic signalling mechanisms have been investigated in drug-sensitive human cervical adenocarcinoma (HeLa MRP-) and MDR HeLaMRP cells after exposure to Adriamycin and hyperthermia (42°C). This study demonstrates enhancement of superoxide anion generation by Adriamycin and early (after 2 h) activation of the Fas death receptor pathway. This was manifested by increased membrane protein expression of Fas ligand, Fas associated with death domain (FADD) and caspase 8 activity. Increased superoxide production, Fas ligand expression and caspase 8 activity were inhibited by the antioxidant Mn TBAP. This suggest activation of the death receptor pathway by oxidative stress. Hyperthermia treatment alone also increased superoxide production and activated the death receptor pathway. Moreover, enhancement of apoptosis and superoxide by the combined treatment suggests that hyperthermia may be useful to enhance efficiency of Adriamycin in drug-sensitive and MDR cells.

Keys words: Chemotherapy, Adriamycin, Multidrug resistance, MRP1, Hyperthermia, Apoptosis, HeLa cells

INTRODUCTION

The antitumor drug Adriamycin (ADR, doxorubicin) has been used for more than 35 years in the clinic for the treatment of a wide variety of cancers, in particular leukemias and solid tumors (Bristow *et al.*, 1978; Minow *et al.*, 1977). Cardiotoxic side effects are major limitations of ADR treatment and have been found to correlate with cumulative doses exceeding 500 mg/m² body surface area (Edward A. Lefrak *et al.*, 1973; Von Hoff *et al.*, 1979). The mechanisms involved in Adriamycin-induced cardiotoxicity and in drug antitumor action are still not entirely clear and appear to be multifactorial. The antitumor action of ADR has been attributed to intercalation of the drug between DNA base pairs, inhibition of topoisomerase II, apoptosis and an increase in oxidative stress (Bates et Winterbourn, 1982; Singal *et al.*, 1997; Takemura et Fujiwara, 2007). This leads to inhibition of DNA repair and translation, inhibition of synthesis of macromolecules, DNA damage, lipid peroxidation, and membrane damage (Takemura et Fujiwara, 2007). Oxidative stress involving overproduction of free radical intermediates and lower levels of endogenous antioxidant reserves in the heart are believed to be responsible for ADR cardiotoxicity (Hande, 1998; Singal *et al.*, 2000). ADR can undergo “redox cycling” by one electron reduction, under the action of reductases (xanthine oxidase, cytochrome P450 reductase and NADH dehydrogenase), generating the semiquinone form of the drug, superoxide anion (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). The reaction between hydrogen peroxide and the semiquinone can also produce the highly reactive hydroxyl radical (·OH) (Bates et Winterbourn, 1982; Iarussi *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006).

The success of cancer chemotherapy (ex: with ADR) treatment can be diminished by development of drug resistance phenotypes. Mammalian cells often acquire cross-resistance to several unrelated anti-neoplastic agents, after exposure to a single agent, which is known as multidrug resistance (MDR) (Shustik *et al.*, 1995). This can be caused by up regulation and overexpression of genes or proteins involved in different detoxification processes in cells. In 1976, Ling *et al.* were the first to correlate decreases of drug accumulation in cells with overexpression of P-glycoprotein (P-gp) (170 kDa) (Juliano et Ling, 1976). In 1992, the multidrug resistance associated protein 1 (MRP1) (190 kDa) was discovered by Cole *et al.* (Cole *et al.*, 1992), and acts, like P-gp, as an ATP-dependent membrane drug efflux pump

with broad substrate specificity (Kast et Gros, 1998; Nooter et Stoter, 1996). MDR can also be associated with changes in drug metabolism, increases in expression or activity of detoxification enzymes (eg. glutathione transferase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase), alterations in topoisomerase II protein levels, up regulation of DNA repair enzymes, and decreased sensitivity to apoptosis by overexpression of antiapoptotic protein (ex: Bcl-2) (Furusawa *et al.*, 2001; Gruber *et al.*, 2007; Rajagopal *et al.*, 2002; Westphal et Kalthoff, 2003). The phenomenon of MDR necessitates an increase in the clinical drug dose administered to obtain a tumor response, which results in increased normal tissue toxicity. In the case of ADR, increasing the drug dose to overcome MDR would lead to increased risk of cardiotoxicity.

To improve the effectiveness of cancer treatment, radiotherapy and chemotherapy have been combined with clinical hyperthermia (HT). HT consists of artificially increasing the temperature above the physiological temperature (37°C) either by using whole body hyperthermia or regional hyperthermia (For reviews see Alexander, 2003; van der Zee, 2002; Wust *et al.*, 2002). HT appears to be more efficient against cells in the centre of solid tumors where blood flow is reduced since higher temperatures can be achieved, due to less dissipation of heat. This microenvironment is also characterized by cells in synthesis phase of the cell cycle, growing at low pH, and deprived of nutrients and oxygen (Hildebrandt *et al.*, 2002). In these conditions, cancer cells appear to be more sensitive to the toxic effects of heat. Studies have shown that regional HT between 40-45°C can enhance the antitumor effects of cytotoxic drugs and/or radiation with few, but tolerable, side effects on healthy tissue (Colombo *et al.*, 1998; Paroni *et al.*, 2001; Schem *et al.*, 1989). HT may sensitize tumor cells to cytotoxic effects of chemotherapy (CT) by increasing cell membrane fluidity and permeability, increasing intracellular drug accumulation and inhibiting DNA repair (Kawai *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1994; Ryu *et al.*, 1996). To date, the exact mechanisms of HT-induced cell killing are not known but an increasing number of clinical trials have demonstrated that HT improves the efficacy of treatment when used as an adjuvant, combined with CT and/or radiotherapy (RT) (Harima *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2005; Sreenivasa *et al.*, 2006; van der Zee, 2002). Recent studies have also shown that HT could

improve response of cancer treatment when combined with immunotherapy (Chen *et al.*, 2006; Ostberg et Repasky, 2006).

Findings from several studies suggest that HT could also be useful for overcoming drug resistance. Indeed, HT alone can trigger a cytotoxic response in drug resistant cells (Chinese hamster ovary (CHO) (P-gp+) and HeLa (cervical adenocarcinoma) (MRP1+)) and drug sensitive cells (Bates et Mackillop, 1986; Souslova et Averill-Bates, 2004). Furthermore, HT has the capacity to sensitize primary drug-resistant cells to cisplatin, methotrexate or mitomycin C (Herman *et al.*, 1981; Raaphorst *et al.*, 1996). HT can enhance drug response to melphalan, ADR and etoposide in MDR CHO, HeLa, MV522 (human metastatic lung carcinoma) and KB-3-1 (human epidermoid carcinoma) cells, which overexpressed (naturally or by transfection) P-gp or MRP1 proteins (Bates et Mackillop, 1990; Liu *et al.*, 2001; Souslova et Averill-Bates, 2004). The use of P-gp modulators like cyclosporin A, verapamil or PSC 833 can sensitize MDR cells to anticancer drug toxicity, but their use in combination with HT can further enhance drug efficacy (Averill et Larrivee, 1998; Averill et Su, 1999; Liu *et al.*, 2001). A clinical study has also suggested that combination of HT, RT and intraarterial infusion, could be an effective treatment of progressive breast cancer showing resistance to major chemotherapeutic agents such as the anthracyclines and the taxanes (Yokoyama *et al.*, 2005). The exact mechanisms for such enhanced drug cytotoxicity in MDR cancer cells is still not elucidated, but HT appears to increase the cellular uptake of drugs (Bates et Mackillop, 1990; Leng *et al.*, 2006; Rietbroek *et al.*, 1999). Promising clinical results could be expected when HT is used as an adjuvant to chemotherapy treatment. Important advantages are that HT could reverse the MDR phenotype, diminish administered doses, decrease toxicity to healthy tissue and consequently the cardiotoxicity, in the case of ADR.

One of the major goals for using HT as an adjuvant to CT and RT, is to induce selective cancer cell death and to diminish normal tissue toxicity by targeting the tumor region using localised heating. It is now widely accepted that anticancer agents such as ADR act as inducers of apoptosis in cancer cells (Hickman, 1992; Holzman, 1996). Apoptosis is a physiological and active mode of cell death that acts as a central regulator of tissue

homeostasis. A defect in apoptotic signalling or execution mechanisms can cause inability of a drug to induce apoptosis in cancer cells and can lead to drug resistance (Korsmeyer, 1992; Miyashita et Reed, 1993). Up regulation of antiapoptotic proteins (ex: bcl-2), down regulation of proapoptotic proteins (ex: bax) or mutations of genes that code for apoptotic proteins are conditions that can cause resistance to drug-induced apoptosis (Westphal et Kalthoff, 2003).

Apoptotic signalling involves three major pathways (For reviews see Chowdhury *et al.*, 2006; Danial et Korsmeyer, 2004) : 1) death receptors pathway (extrinsic), 2) mitochondrial pathway (intrinsic) and 3) endoplasmic reticulum pathway. The death receptor pathway can be activated by several membrane receptors including Fas and tumor necrosis factor (TNF) (Nagata, 1999). Several different stresses can induce the death receptor pathway by regulation of the levels of protein expression of the death receptors and/or their ligands. This has been proposed as a possible mechanism for activation of death receptors by chemotherapeutic drugs which generate reactive oxygen species (ROS) (Petak et Houghton, 2001). The Fas death receptor pathway is initiated when the natural ligand of Fas, FasL (Suda *et al.*, 1993), binds to the receptor at the cell membrane. The adaptor protein Fas associated death domain (FADD) and the inactive cystein protease, procaspase 8 are then recruited to the cytoplasmic side of the membrane where they bind to Fas receptor (FasR) forming the death inducing signaling complex (DISC) (Kischkel *et al.*, 1995). This complex allows the cleavage of procaspase 8 and generates active caspase 8 (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Caspase 8 can then activate caspase 3, which is a potent effector of apoptosis. Caspase 8 can also cleave the Bid protein to form truncated Bid, which can activate the mitochondrial pathway of apoptosis (Gross *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1996). This mechanism serves as an amplification loop for the apoptosis signal. The mitochondrial pathway involves release of cytochrome C from mitochondria into the cytosol. In the presence of dATP, procaspase 9, the apoptotic protease activating factor-1 (apaf-1) and cytochrome C, form a complex called the apoptosome (Li *et al.*, 1997). This complex allows the activation of caspase 9, which activates caspase 3 and the execution phase of apoptosis. This involves chromatin condensation and DNA fragmentation, plasma membrane blebbing and disintegration of the cell into multiple membrane-enclosed vesicles which are eliminated by phagocytosis.

The mechanisms of apoptosis induced by HT and anticancer agents (ex: with ADR) have not been well characterised. Even less is known about apoptosis induced by HT and drugs in MDR cells. This study evaluates the role of death receptor signalling in apoptosis induced by HT and ADR in MDR HeLa cells overexpressing MRP1, compared to their drug sensitive counterparts.

MATERIAL AND METHODS

Tissue culture

Drug-sensitive human HeLa cells (American Type Culture Collection) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM high glucose) supplemented with 10% fetal bovin serum, 2 mM glutamine, penicillin (50 units/mL), and streptomycin (50 µg/mL) (Gibco Canada, Burlington, Ontario) (Souslova et Averill-Bates, 2004). The MDR cell line HeLaMRP was kindly provided by Dr Philippe Gros, McGill University, Montreal, Canada. These cells are resistant to actinomycin D, etoposide, Adriamycin, and vincristine (Kast et Gros, 1998). Cells were grown in monolayer in tissue culture flasks (Sarstedt Inc, Montreal, Quebec) at 37°C under 5% CO₂ in a humidified atmosphere, using a water-jacketed incubator. The culture medium for HeLaMRP cells contained etoposide (VP-16) (250 ng/mL), which was removed for the final passage before experiments. Experiments were carried out using confluent cells incubated for 24 h at 37°C with fresh culture medium. Cells were harvested with 0.25% trypsin-1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Gibco Canada), washed by centrifugation (3 min, 1000 g) and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 10 mM glucose.

Hyperthermia and drug treatment

Cells were incubated with different concentrations of Adriamycin (Sigma-Aldrich Inc., Saint-Louis, MO) for times ranging from 30 min to 18 h. When cells were treated with Adriamycin and hyperthermia together, they were incubated at 42°C for the first hour of drug treatment and then incubated with the drug at 37°C for the remaining time (17 h). When the time of drug treatment was 30 min and 1 h, cells were heated at 42°C during the drug treatment.

Cell cycle analysis by propidium iodide DNA staining

After 18 h of incubation with different concentrations of ADR (37 or 42°C), 3×10^6 cells were washed three times with cold PBS by centrifugation (1000 g, 3 min) to stop the incubation. The cells were resuspended in 500 µL of staining buffer (50 mg of sodium citrate, 150 µL of Triton® X-100, 5 mg of propidium iodide and 1 mg of A ribonuclease, diluted in 50 mL of H₂O) and incubated in the dark for 30 min on ice with constant agitation (Krishan, 1975). Cells were analysed with the FL-2 (Em: 585 nm) channel of a FACScan flow cytometer

equipped with an argon laser emitting at 488 nm (Becton Dickinson, San José, USA). Data was acquired and analysed using Cell Quest (Becton Dickinson) and MOD FIT (Verity Software House inc., Topsham, ME) software, respectively. A total of 10,000 cells were analysed for each sample and % of cells in each phase of the cell cycle was calculated.

Morphological analysis of cell death

Following treatment, 50 µg/mL of Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Inc.) was added for 15 min at 37°C and then 50 µg/mL of propidium iodide (PI) was added. Hoechst was used to stain apoptotic cells with condensed chromatin in the nucleus (blue-green fluorescence) and propidium iodide was used to stain necrotic cells (red fluorescence). Apoptotic and necrotic cells were observed by fluorescence microscopy (model IM, Carl Zeiss Canada Ltd, St.Laurent, QC), photographs were taken using a Sony digital 3CCD Color Video Camera and analysed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, Ontario) (Tanel et Averill-Bates, 2007).

Flow cytometric analysis of Bax and Bcl-2 levels

To determine Bax and Bcl-2 expression, freshly harvested cells were washed three times with PBS-1% FBS by centrifugation (1000 g, 3 min) and then fixed with paraformaldehyde (0.25%) for 1 h or overnight at 4°C. After washing with PBS-1% FBS, cells were permeabilized with Tween® 20 (0.05%) at 37°C for 15 min with agitation. After washing, cells were stained for 45 min at room temperature with anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies (1:60) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After washing with PBS-1% FBS, cells were incubated for 45 min at room temperature (in the dark) with anti-mouse secondary antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (Kim *et al.*) (1:1000) (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA). Cells (10,000) were subjected to flow cytometric analysis using the FL-1 (Em: 530 nm) channel of a FACScan. Data were acquired and analysed using Cell Quest software.

Determination of caspase activity by fluorescence spectroscopy

After incubation with ADR, freshly harvested HeLa and HeLaMRP cells (1×10^6) were washed three times with cold PBS by centrifugation (1000 g, 3 min) and resuspended in 75

μ L of reaction buffer (26 mM piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 133 mM NaCl, 13 mM DL-dithiothreitol (DTT), 1.3 mM EDTA, 0.13% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propane-sulfonic acid (CHAPS), 13% sucrose, pH 7.2). Cells were lysed by freezing at -20°C for 30 min. The kinetic reaction was started after addition of 25 μ L of the appropriate caspase substrate (200 μ M) (Calbiochem) at 37°C . Caspase 8, 9, 10 and 3 activities were measured by cleavage of Z-IETD-AFC, Ac-LEHD-AFC, Ac-AEVD-AFC and Ac-DEVD-AMC, respectively (Bettaieb et Averill-Bates, 2005). The release of fluorescent products amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC) or amino-4-methyl coumarin (AMC) was monitored in a spectrofluorimeter (Spectra Max Gemini, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) with an excitation wavelength of 400 nm and emission wavelength of 505 nm for AFC or 380/460 nm for AMC. Activities of caspases are represented as relative cumulative fluorescence of the kinetic reaction and normalised to non-resistant HeLa cell controls at 37°C without ADR treatment.

Subcellular fractionation and Western blotting

After treatment with ADR, cytosolic and membrane fractions from HeLa and HeLaMRP cells were isolated as described previously (Bettaieb et Averill-Bates, 2005; Tanel et Averill-Bates, 2007). Freshly harvested cells were washed in buffer A (100 mM sucrose, 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), 20 mM 4-morpholinepropane-sulfonic acid (MOPS), pH 7.4), resuspended and homogenized (Dounce homogenizer, 200 strokes) in buffer B (buffer A plus 5% Percoll, 0.01% digitonin, supplemented with 10 μ L/mL cocktail of protease inhibitors: [4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride] (AEBSF), aprotinin, pepstatin A, leupeptin, bestatin and [*N*-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide (E-64) (Sigma-Aldrich, Inc, St Louis, MO)). Unbroken cells and nuclei were removed by centrifugation (2500 g for 10 min). A further centrifugation of the supernatant fraction at 100,000 g for 1 h resulted in a pellet designated as the microsomal fraction and the supernatant was designated as the cytosolic fraction. FADD protein expression was detected in these two fractions. Whole cell lysates were used for immunodetection of total FADD protein expression. The protein concentration in all fractions was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976). For immunodetection of FADD, 30 μ g of proteins were

resuspended in sample buffer (Laemmli, 1970), boiled for 5 min at 100°C and loaded onto a 12% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel. Electrophoresis was carried out at a constant voltage of 125 V. Cellular proteins were transferred electrophoretically to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane using a Trans-Blot® SD Semidry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were probed with the primary antibodies: anti-FADD, anti-GAPDH (1:1000) (Santa Cruz Biotechnology). Secondary antibodies consisted of horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse (1:2000) (Biosource, Camarillo, CA, USA), respectively. Proteins were detected using the HyBlot CL™ chemiluminescence kit (Denville Scientific Inc, Metuchen, NJ, USA), and films (HyGlo™ medical X-ray films; Denville Scientific Inc) were scanned with a laser densitometer (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA, USA).

Detection of FasR and FasL by flow cytometry

Cells were preincubated, with or without cycloheximide (2 µg/mL for 1 h), a protein synthesis inhibitor, or with or without Mn TBAP (Calbiochem) (200 µM for 2 h), an antioxidant, before ADR and hyperthermia treatment. Cells (0.5×10^6) were washed three times with PBS-1% FBS by centrifugation (1000 g, 3 min) and then fixed and permeabilized (or not), as previously described for Bax/Bcl-2. Cells were washed and incubated (30 min in the dark) with monoclonal antibodies, anti-FasR and anti-FasL (1:300) (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA) coupled to FITC and phycoerythrin, respectively. Cells (10,000 per sample) were analysed with FL-1 (Em: 530 nm) and FL-2 (Em: 585 nm) channels respectively, using a FACScan flow cytometer. Data were acquired and analysed using Cell Quest software.

Measurement of ROS generation

The measurement of hydrogen peroxide (H₂O₂) generation was performed as described by Du *et al.* with modifications (Du *et al.*, 2006). Briefly, cells were pretreated with different concentrations of ADR for 4 h. 20 µM 5-(and 6-) carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) or 20 µM carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDCFDA) (Invitrogen™, Burlington, Ontario, CAN) were then added. H₂DCFDA produces a green fluorescence when it becomes oxidized, while CDCFDA is the oxidized form of the probe.

CDCFDA acts as a control for changes in uptake, ester cleavage, and efflux, so that any changes in fluorescence seen between groups with the oxidation-sensitive dye can be directly attributed to changes in dye oxidation (Du *et al.*, 2006). At the end of the treatment, cells were harvested and washed three times with cold PBS to remove the unbound dye. The generation of superoxide anion (after 30 min or 1 h of ADR treatment at 37 or 42°C; ± 2 h MnTBAP (200 µM) antioxidant pretreatment) was estimated similarly using 20 µM dihydroethidium (Invitrogen™) that produces a red fluorescence when it becomes oxidized to hydroxyethidium by superoxide anion. Levels of hydrogen peroxide or superoxide anion were estimated by FACScan using FL-1 and FL-2 channels, respectively.

RESULTS

Disruption of cell cycle distribution by HT combined with ADR in HeLa MRP+ and MRP- cells

To investigate the inhibition of DNA synthesis and cell proliferation by ADR and thermal stress, cell cycle distribution was analysed by flow cytometry after PI staining for DNA content. In untreated control cells, overexpression of MRP resulted in a marked two-fold decrease in the number of cells in S-phase from 38 % in HeLa cells to 20 % in HeLaMRP+ cells (Figure 2.1 A, B). In HeLa MRP+ cells, there was 20 % increase in cells with a G1 DNA content, relative to native MRP- cells (Figure 2.1 A-B). When exposed to increasing concentrations of ADR, the cell cycle distribution was somewhat different for HeLa parental cells and HeLa MRP+ cells (Figure 2.1 A-B). An accumulation of cells in G2/M was accompanied by a decrease in G1 phase cells after 18 h of treatment with ADR, indicating that exposure to ADR causes a stable G2/M growth arrest rather than a transient G2 delay. By comparison, cell cycle arrest in G2/M reached a higher level in MRP+ cells than parental HeLa cells following treatment with 2 μ M ADR. Heat treatment alone for 1 h at 42°C had only a very small effect on cell cycle distribution (Figure 2.1 C-D). When thermal stress was combined with ADR in parental HeLa cells, there was a slight decrease in G2/M cells corresponding with a small increase in S phase, relative to HeLa cells treated with ADR at 37°C. In MRP+ HeLa cells, combined treatment with heat increased the number of cells with S phase DNA content, but the difference was more pronounced at 5 μ M ADR where it was correlated with a large decrease in G2/M phase cells. Moreover, in HeLa and HeLa MRP+ cells, there was a marked decline in cells in G1 phase, at 37 and 42°C after ADR exposure.

Induction of apoptosis by ADR and thermal stress. Enhancement of pro-apoptotic effect of ADR by thermal stress

Since ADR caused cells to arrest in G2/M phase, it was hypothesized that ADR would induce apoptotic cell death. Therefore, the ability of ADR to cause cell death by apoptosis was investigated in MRP+ and MRP- cells. To achieve this, apoptotic and necrotic cells were assessed using Hoechst and propidium iodide staining, respectively (Figure 2.2). We show that ADR alone induces nuclear chromatin condensation, which is one of the hallmarks of apoptosis. Less chromatin condensation was observed in MDR cells and a higher

concentration of ADR was needed to induce a similar level of chromatin condensation as in non-resistant parental HeLa cells. Thermal stress increased sensitivity of MDR and drug-sensitive cells to ADR and a higher degree of chromatin condensation was observed (Figure 2.2).

Activation of caspases by ADR and heat

To determine the pathways by which ADR induces apoptosis in MRP⁺ and MRP⁻ cells, and whether apoptosis is caspase dependent, the activity of initiator caspases 8 and 9 and effector caspase 3 was assessed after 18 h of exposure to ADR, compared to drug-sensitive HeLa cells (Figure 2.3). Treatment with ADR alone increased activities of caspases 8, 9 and 3 in both cell lines suggesting that ADR induces apoptosis through both the death receptor and mitochondrial pathways. In HeLa MRP⁺ cells, higher concentrations of ADR (2-10 μ M) are needed to increase caspase activities. The lower concentrations of ADR (0.5-1 μ M) used to activate caspases in parental HeLa cells had no effect in MRP⁺ cells (data not shown). Comparison of caspase activation between the two cell lines showed similar levels for caspase 8, lower activation of caspase 9 in MRP⁺ cells and higher activation of caspase 3 in MRP⁺ cells.

Subsequently, we assessed whether thermal stress could enhance ADR-induced activation of caspases. However, unlike chromatin condensation, thermal treatment did not enhance caspase activation by ADR, neither in non-resistant HeLa cells nor in MDR MRP⁺ cells. Surprisingly caspase 3 activation was lower in MRP⁺ cells, when combined heat and drug treatment was used. Heat treatment for 1 h at 42°C had little effect on caspase activities apart from small increases in caspase 8 activity in MRP⁺ cells (Figure 2.3 B) and caspase 9 activity in MRP⁻ cells (Figure 2.3 C). Taken together, these results suggest that the combined heat and drug treatment could enhance cell sensitivity to ADR whereby heat may only affect later stage apoptotic events in the nucleus leading to DNA damage.

Given that the death receptor pathway often activates the mitochondrial pathway, we next sought to determine the kinetics of activation of caspase 8, the initiator caspase in the death receptor pathway. A kinetic analysis of caspase 3, 8, 9 and 10 activities in the HeLa parental

cell line is shown during 8 h of exposure to ADR (Figure 2.4 A). Caspase 3 and 8 activities increased in a time-dependent manner after only 2 h of exposure to ADR, while caspase 9 and 10 activities remained close to control levels after 8 h. This clearly shows that there is activation of apoptosis signalling mechanisms in HeLa cells as early as 2 h after ADR treatment (Figure 2.4 A). Moreover, induction of the death receptor pathway may occur upstream of intrinsic pathway induction in MRP⁻ HeLa cells. However, MDR cells seems to be resistant to death receptor apoptosis pathway activation because in comparison to MRP⁻ cells, there was only low activation of caspase 8 in HeLa MRP⁺ cells after 4-8 h (Figure 2.4B). To confirm the absence of early mitochondrial pathway activation after 8 h of ADR and HT exposure, analysis of the ratio of Bax/Bcl-2 expression showed no change compared to controls in both cell lines (Figure 2.5).

Death receptor pathway signalling: translocation of FADD adaptor protein

Since FADD recruitment to the Fas receptor is an important step for the activation of the extrinsic pathway of apoptosis, the translocation of FADD protein was assessed (Figure 2.6). Western blot analysis of sub-cellular fractionated samples shows that FADD levels in the plasma membrane increased after 1 and 2 h of ADR treatment and then decreased to reach 60% of control levels after 8 h of treatment in HeLa MRP⁻ cells (Figure 2.6 A, B). Surprisingly, FADD levels did not decrease in the cytosol as expected, but rather increased suggesting a possible “de novo” synthesis. However, ADR did not cause any changes in total FADD levels in cell lysates from parental HeLa cells. This recruitment of FADD to the membrane after 1 and 2 h of treatment with ADR corresponds with the processing and activation of caspase 8 after 2 h (Figure 2.4 A). FADD recruitment to the membrane seems to be an early event in ADR-induced apoptosis in HeLa MRP⁻ cells. In MRP⁺ cells, despite a lack of apparent FADD translocation to membrane fractions, levels of apparent FADD in in microsomal and cytoplasmic fractions were increased by about 50% and 100%, respectively, compared to MRP⁻ cells.

Up-regulation of Fas death ligand expression by ADR treatment

We hypothesised that sensitization of HeLa cells to death receptor-mediated apoptosis by drug treatment could be due to up-regulation of Fas receptor (FasR) and/or Fas death ligand

(FasL) expression. The effect of ADR treatment on cellular FasR and FasL expression was analyzed by FACScan using anti-FasL and anti-FasR monoclonal antibodies (Figure 2.7 A-B). Parental HeLa cells that were exposed to 1 μ M of ADR expressed a higher level (1.6 fold) of cellular FasL protein, but a similar level of FasR protein, when compared to untreated control cells (Figure 2.7 A). Similarly, FasL protein expression increased 1.8 fold in MDR HeLa cells, compared to control cells, while the level of FasR decreased by 25% (Figure 2.7 B). For both cell lines, there was no difference in the expression of FasR and FasL between the heat-shocked ADR-treated cells and those treated with ADR at 37°C. To evaluate the implication of FasL in FADD translocation to membranes after 1-2 h (Figure 2.6 A, B), a time course analysis for ADR-induced increase in FasL expression was performed in HeLa MRP- cells (Figure 2.7 C). Expression of FasL gradually increased with time from 1 to 4 h in MRP- cells. FasL expression was enhanced after only 1 h and may be responsible for FADD translocation. To determine whether protein synthesis is required for the induction of FasL by ADR (1 μ M) in HeLa cells, the effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) on ADR-induced FasL protein expression was analyzed (Figure 2.7 C). CHX did not change FasL expression in HeLa cells. This indicates that protein synthesis is not required for increasing FasL protein expression by ADR. Permeabilization of HeLa cells was also performed to detect intracellular and membrane-bound FasL. Levels of FasL expression were similar, with or without permeabilization (Figure 2.7 C). This suggests that HeLa cells were only expressing the membrane form of FasL, which corroborates with findings of Qian *et al*, who detected FasL by confocal microscopy in HeLa cells (Qian *et al.*, 2006).

Superoxide generation by ADR treatment

It has been reported that ROS production by chemotherapeutic drugs can modulate FasR and/or FasL expression (Petak et Houghton, 2001). We therefore determined whether the ADR-induced increase in FasL expression was dependent on ROS production. The level of superoxide anion, monitored by DHE, increased during the first 30 minutes of ADR treatment, decreased between 30 and 60 min, and remained above control levels up to 4 h (Figure 2.8). ADR treatment had little effect on the fluorescence intensity of H₂DCFDA, suggesting that ADR does not generate hydrogen peroxide. These findings suggest that superoxide anion could be the ROS responsible for the increase in FasL expression.

Influence of heat and antioxidant inhibition on ADR-induced ROS generation

The effect of ADR and heat shock on the level of ROS generation was determined. Individual exposure to HT or ADR led to an increase in ROS generation in HeLa and HeLa MRP+ cells (Figure 2.9). As expected, a larger increase in $O_2^{\cdot -}$ occurred compared to H_2O_2 , in both cell lines. There was a more pronounced increase in H_2O_2 generation in ADR-treated MRP+ cells compared to MRP- cells (Figure 2.9 A, B). There was a tendency for a slight increase in H_2O_2 generation at 42°C. Use of the oxidation-insensitive dye (CDCFDA) demonstrated that there was no efflux of the oxidised probe from HeLa (MRP-) and HeLa MRP+ cells (Figure 2.9 A, B). On the other hand, ADR caused a concentration-dependent increase in superoxide generation in MRP- and MRP+ HeLa cells (Figure 2.9 C, D). Superoxide production was slightly higher in MRP+ cells. The superoxide dismutase (SOD) mimetic Mn TBAP, inhibited the generation of superoxide anion by ADR (Figure 2.9 C, D). The combined heat and drug treatment generated much higher levels of superoxide anion than individual treatment in both cell lines (Figure 2.9 C-F). These results suggest that hyperthermia could enhance the cytotoxicity of ADR by increasing the levels of superoxide anion.

Inhibition of FasL induction and caspase 8 activity by the antioxidant Mn TBAP following ADR exposure

Finally, to investigate the role of ROS in modulating FasL up-regulation and caspase 8 activation, cells were pretreated with Mn TBAP prior to ADR exposure (Figure 2.10). Mn TBAP inhibited the increased expression of FasL and caspase 8 activity in both MRP- and MRP+ HeLa cells. This suggests that ROS play an important role in sensitizing cells to FasL-mediated apoptosis induced by ADR.

DISCUSSION

It is widely accepted that chemotherapeutic agents such as ADR can trigger apoptosis in cancer cells, but the signalling mechanisms are not entirely understood. Furthermore, these mechanisms are often dependent on cell type, the kind of drug, the drug dose and cellular environment. This study demonstrates that ADR causes apoptosis which is mediated by the death receptor pathway and ROS generation, in HeLa cells and their MDR counterparts with overexpression of MRP1.

HeLa cells underwent cell cycle arrest in G₂/M phase after 18 h of ADR treatment. This is consistent with other studies that have found G₂/M arrest was induced by ADR in HeLa, osteosarcoma Saos-2 cells (Tsang *et al.*, 2003) and colon carcinoma cells (Verheul *et al.*, 2007). It was also reported that ADR may act as a cell cycle-dependent drug and that its main cytotoxic effects may be in proliferating cells (Ling *et al.*, 1996). Moreover, DNA damage was found predominantly in G₂ phase after ADR treatment in HeLa cells (Potter *et al.*, 2002). The exact mechanism of cytotoxicity of ADR is not fully understood but affinity of ADR for DNA implies that its anti-tumour effect could depend on ADR intercalation between base pairs. Indeed, DNA intercalation by ADR results in topoisomerase II (topo II) inhibition, including the topoII-alpha primarily expressed in S and G₂ phases, thereby preventing release of DNA torsion during transcription and replication (Potter *et al.*, 2002). This may block DNA synthesis and activate the G₂/M check point.

Cell cycle arrest by ADR treatment indicates that ADR is able to cause irreparable DNA damage, that can lead to irreversible cell cycle arrest whereby cells undergo apoptotic cell death (DiPaola, 2002; Verheul *et al.*, 2007). Morphological analysis of apoptosis demonstrates that ADR can effectively trigger apoptosis in a concentration dependent manner in HeLa cells. Nuclear chromatin condensation, one of the late stage events in activation of apoptosis, occurs after 18 to 24 h of ADR exposure. We therefore expected the apoptotic signalling pathways to be activated during the preceding hours. To determine which pathway was involved in ADR-mediated apoptosis, the implication of caspases in the death receptor and mitochondrial pathways was tested after 18 h. Indeed, increased activity of caspase 8, 9 and 3 after 18 h of ADR treatment shows that ADR can activate both the death receptor and

the mitochondrial pathways of apoptosis in HeLa cells. Surprisingly, kinetics for activation of caspases showed much earlier activation of caspase 8 and the death receptor pathway (after 2 h) whereas activation of caspase 9 and the mitochondrial pathway and execution phases occurred much later after 18 h. In this case, the mitochondrial pathway could be activated as an amplification loop signal, by the death receptor pathway.

The implication of the death receptor pathway in ADR-mediated apoptosis in HeLa cells, was confirmed by translocation of the death receptor protein FADD and increased expression of FasL. These events occurred after 1-2 h of ADR treatment, confirming the early activation of the death receptor pathway. Another study has also shown increased FasL expression after ADR treatment in human endothelial cells (HUVEC) (Damrot *et al.*, 2006). FasR is widely distributed in most cell types. Little is known about the molecular mechanisms underlying increased FasL expression in tumors, but it has been reported that cytotoxic cancer agents can effectively enhance FasL expression, which may lead to apoptosis (O'Connell *et al.*, 1999). This may arise since increased levels of FasL allow the necessary proximity of the ligand to the FasR, allowing FasR aggregation and subsequent death receptor activation.

To investigate the reason for increased FasL expression, the generation of ROS was evaluated in HeLa cells undergoing ADR treatment. Our findings demonstrated that ADR generated ROS, and that the major ROS produced was superoxide anion, with little production of hydrogen peroxide. This was confirmed by other studies using osteosarcoma Saos-2 cells (Tsang *et al.*, 2003) and hepatocytes (Navarro *et al.*, 2006). $O_2^{\cdot-}$ production was dependent on ADR concentration and was evident after 30 min of drug treatment in HeLa cells. We confirmed that $O_2^{\cdot-}$ generation is likely to be the initiating factor that leads to increased FasL expression, because $O_2^{\cdot-}$ production, increased FasL expression and caspase 8 activity were inhibited by the antioxidant MnTBAP. These findings confirm the implication of oxidative stress ($O_2^{\cdot-}$) in the apoptotic mechanism activated by ADR HeLa cells.

This study was also interested in apoptotic responses to ADR in MDR cells. The effects of ADR were compared between resistant HeLa MRP+ cells, which overexpress MRP 1, and drug sensitive HeLa cells. Morphological analysis of apoptosis showed that HeLa MRP+

cells were effectively more resistant to ADR-induced apoptosis than non-resistant cells. However, cell cycle analysis in HeLaMRP cells demonstrated that a more important proportion was blocked in G₂/M compared to HeLa cells. This may probably be explained by activation of repair mechanisms in resistant HeLa MRP⁺ cells in contrast to activation of apoptotic signalling in HeLa cells. Indeed, the intracellular drug level in HeLa MRP⁺ cells is less than in HeLa cells, for the same concentration of drug, due to drug efflux by MRP1. This may result in less DNA damage, and increased ability to activate repair mechanisms and cell cycle arrest, without activation of apoptosis in MDR cells.

The resistant phenotype also exhibited lower activation of caspase 8 and 9, although higher activation of caspase 3, compared to drug-sensitive HeLa cells. Although ADR-induced translocation of FADD to membranes was not evident, HeLa MRP⁺ cells contained much higher levels of FADD in both cytosolic and membrane fractions relative to HeLa cells. Together with higher levels of FasR, this seems to enable death receptor pathway activation in HeLaMRP cells. Furthermore, superoxide anion production and FasL expression were also increased by ADR in HeLa MRP⁺ cells. Increased FasL expression and caspase 8 activation were mediated by ROS in HeLa MRP⁺ cells, since they were inhibited by Mn TBAP. As for HeLa cells, the death receptor pathway is activated by ADR in HeLa MRP⁺ cells, but overall, less apoptosis was detected.

This study also evaluated the effect of HT treatment on apoptotic signalling, alone or in combined treatment with ADR, in sensitive HeLa and resistant HeLa MRP⁺ cells. Exposure to a mild dose of HT (42°C for 1 h) had a relatively small effect on cell cycle distribution, although HT caused a slight increase in S cell cycle phase compared to G₂/M in resistant and non resistant HeLa cells. Another study reported that lung and human leukemia (HL-60) cancer cells exposed to HT, were shown to selectively induce apoptosis during the S-phase, although the exact mechanism is unknown (Lim *et al.*, 2006; Vertrees *et al.*, 2005).

Morphological analysis showed that apoptosis was enhanced with temperature in both cell lines. Besides increasing caspase 9 activity in drug-sensitive HeLa cells, this mild heat dose did not affect other apoptotic mediators, involved in the death receptor and mitochondrial

pathways. It is possible that HT may enhance apoptosis through caspase-independent pathways. Other apoptotic mechanisms that could be considered are the activation of apoptosis caused by other mitochondrial proapoptotic factors (AIF, EndoG, Smac/Diablo) (Madash et Hajnoczky, 2001). For example, AIF translocation to the nucleus occurred after heat stimulation in A172 and T986 glioma cell lines (Fukami *et al.*, 2004). Alternatively, HT may only affect later stage apoptotic events in the nucleus. In support of this idea, HT can inhibit DNA repair processes, which would favour HT enhancement of apoptotic events in the nucleus (Roti Roti, 2007). In this study, HT caused enhancement of $O_2^{\cdot-}$ production in HeLa and HeLa MRP+ cells. This is corroborated by other studies that found increased $O_2^{\cdot-}$ generation after HT treatment in lymphoma cells (U937) (Cui *et al.*, 2004), skeletal muscle cells (Salo *et al.*, 1991) and rat intestinal epithelial cells (Flanagan *et al.*, 1998). Because ROS are able to directly cause DNA damage (Barzilai et Yamamoto, 2004), it is plausible that this may contribute to enhancement of apoptosis by heat at the nuclear level.

This study shows that combined treatment with ADR and HT increased apoptosis at the level of nuclear chromatin condensation in HeLa and HeLa MRP+ cells. This suggests that combined treatment could improve the efficiency of CT treatment in drug-sensitive cells and in resistant cancer cells. ADR-induced $O_2^{\cdot-}$ production was the factor which was the most affected by HT in the two cell lines. Indeed, $O_2^{\cdot-}$ generation doubled with the combined heat and drug treatment. This study suggests that $O_2^{\cdot-}$ production may be an important common element in the apoptotic mechanisms induced by both ADR and HT alone, and that their combined use may enhance and facilitate the apoptotic signal. Both ADR and ROS are able to cause DNA damage and HT may enhance apoptosis at the nuclear level by inhibiting DNA repair processes.

Although further studies are required to improve understanding of the mechanisms involved, this study shows that HT can enhance ADR-induced generation of ROS and apoptosis in drug-sensitive and MDR cells with increased expression of MRP1. These findings may be beneficial in clinical cancer treatment where ADR and HT in combined treatment could be useful for eliminating both drug-resistant and drug-sensitive cancer cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Ahmed Bettaieb for assistance. Financial support was from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (DAB).

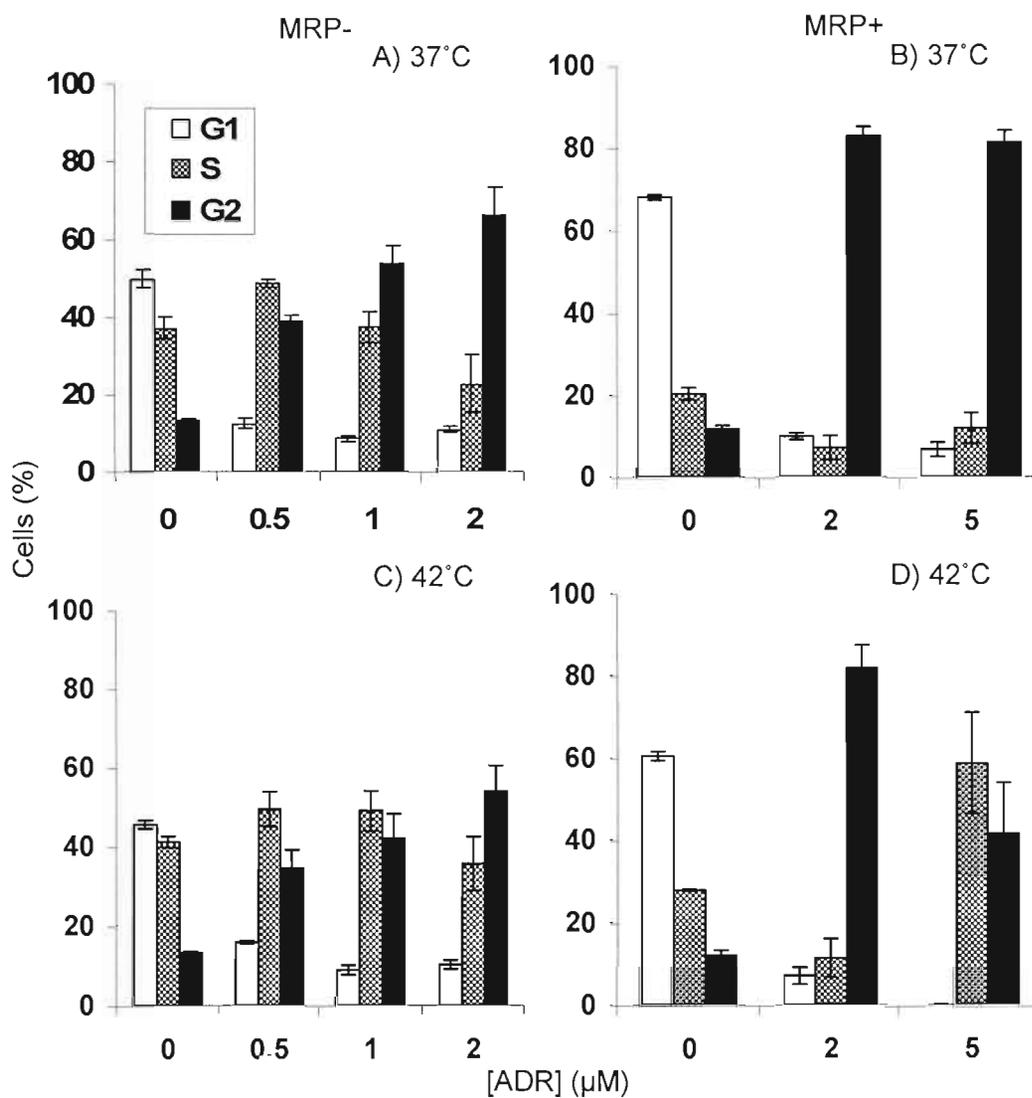


Figure 2.1 ADR induced cell cycle perturbation in native and resistant HeLa cells at 37 and 42°C. HeLa cells were exposed to different concentrations of ADR (0-2 μM for MRP- (A and C) and 0-5 μM for MRP+ (B and D)), either at 37°C for 18 h (A and B), or combined with 1 h of 42°C hyperthermia for the first hour of 18 h drug treatment (C and D). The percentages of cells in each phase of the cell cycle (G1, S, G2) were obtained by FacScan analysis. Means ± SEM are shown from at least 3 independent experiments.

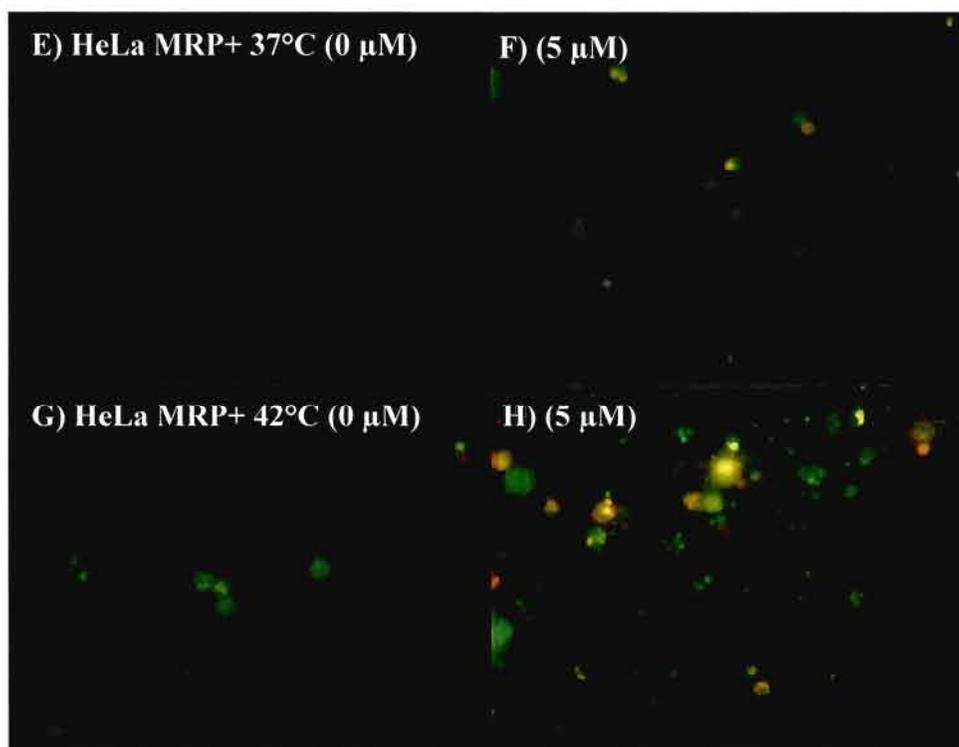
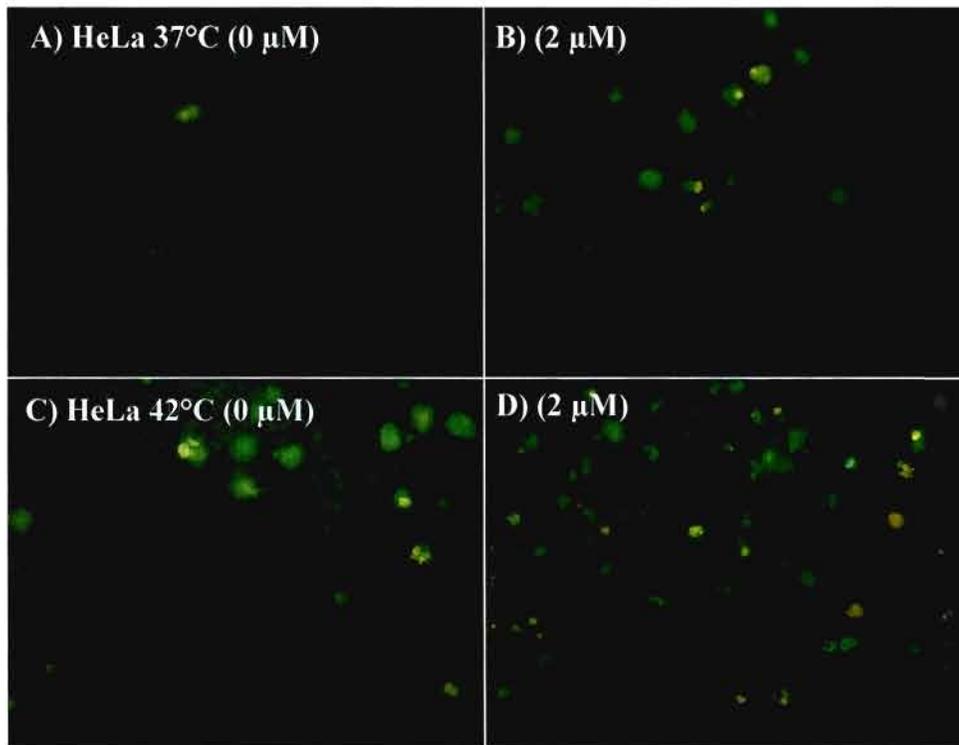


Figure 2.2 Induction of apoptosis by Adriamycin and thermal stress. Morphological analysis of apoptosis by Hoechst staining after 18 (data not shown) or 24 h of heat and drug exposure. HeLa and HeLa MRP+ cells were exposed to different concentrations of ADR (0 or 2 μ M for MRP- (A-D) and 0 or 5 μ M for MRP+ (E-H)), either at 37°C for 18 or 24h (A,B,E,F), or combined with 1 h of 42°C hyperthermia for the first hour of drug treatment (C,D,G,H). Magnification: 320X. Photograph are representative of . 3 independent experiments.

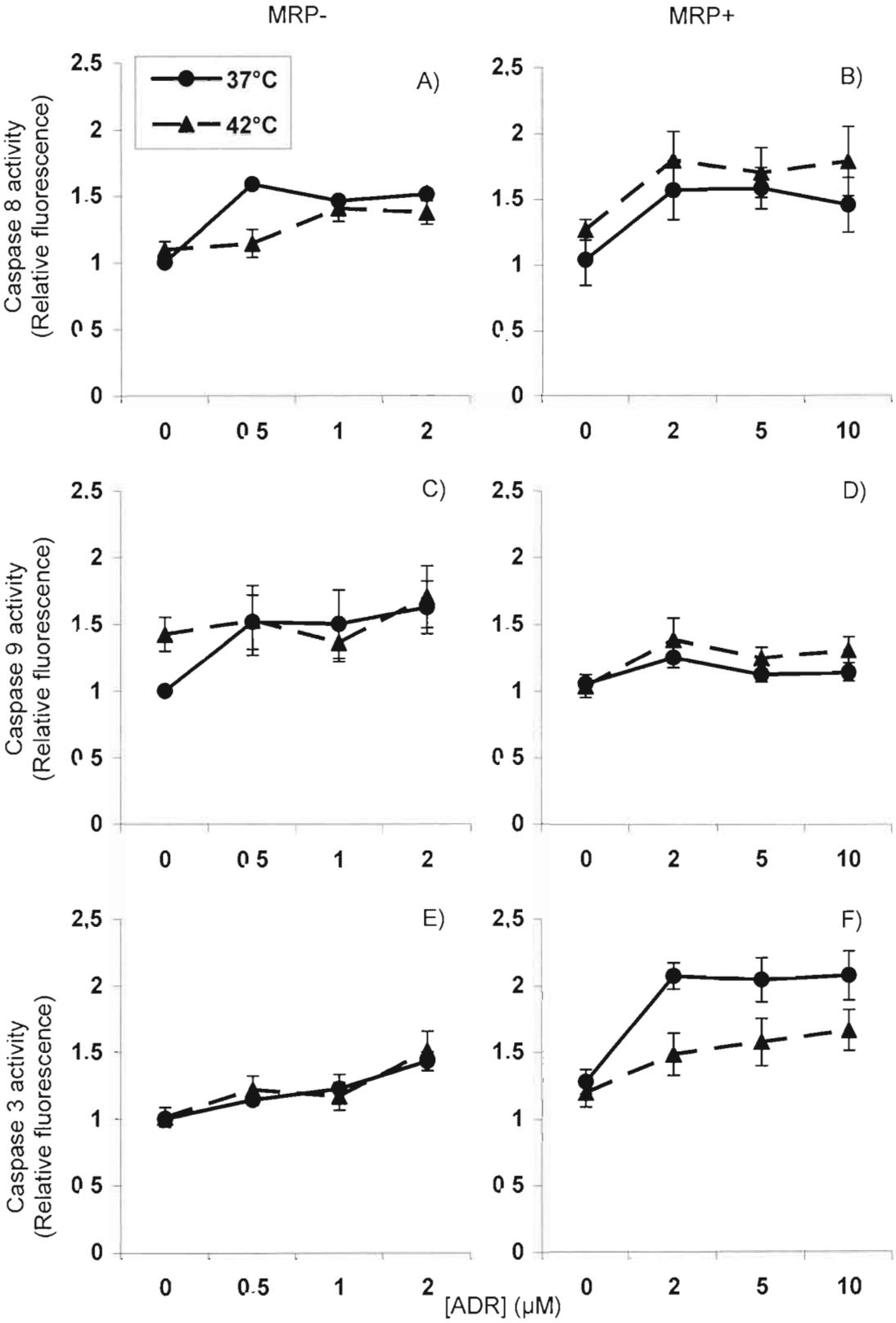


Figure 2.3 Activation of caspases 8, 9 and 3 after 18 h of treatment by ADR. MDR (MRP+)(B, D, F) and non-resistant (MRP-)(A, C, E) HeLa cells were treated for 18 h with different concentrations of ADR (0-2 μ M for non-resistant cells (MRP-) and 0-10 μ M for resistant cells (MRP+)). Cells were incubated at 37°C for 18 h or combined with 1 h of 42°C hyperthermia for the first hour of 18 h drug treatment. Caspase activities are related to untreated control HeLa cells (37°C) that are designated as 1. Means \pm SEM are shown from at least 3 independent experiments.

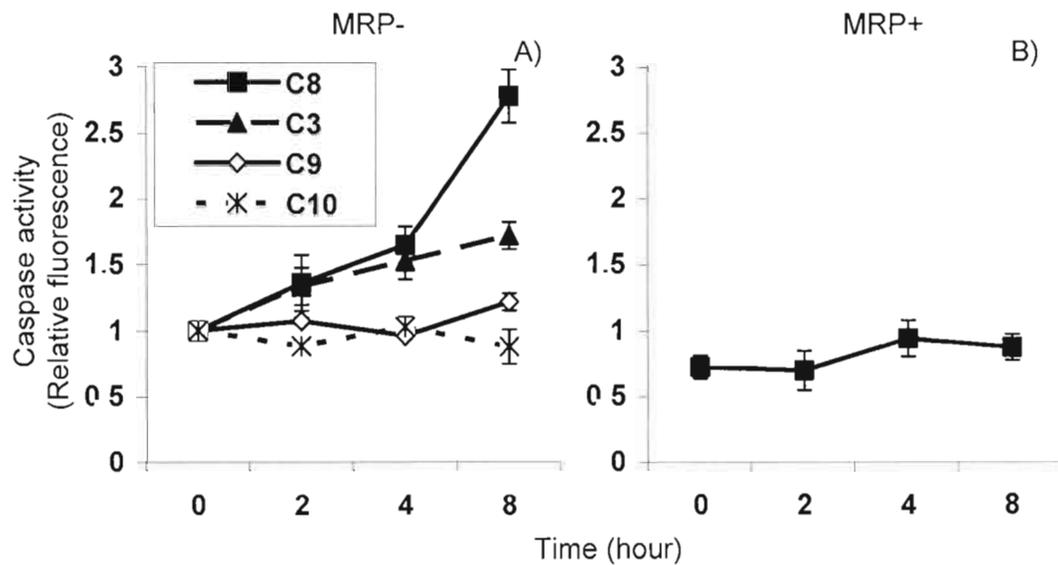


Figure 2.4 Kinetics of caspase activation during 8 h of treatment with ADR : activation of caspases 8 and 3 by ADR in HeLa cells (MRP-). A) Non-resistant (MRP-) and B) MRP+ HeLa cells were treated with 1 μ M (MRP-) and 2 μ M (MRP+) of ADR at 37°C for different times. Caspase (8, 3, 9 and 10) activities are relative to untreated control cells (37°C) that are designated as 1. Means \pm SEM are shown from at least 3 independent experiments.

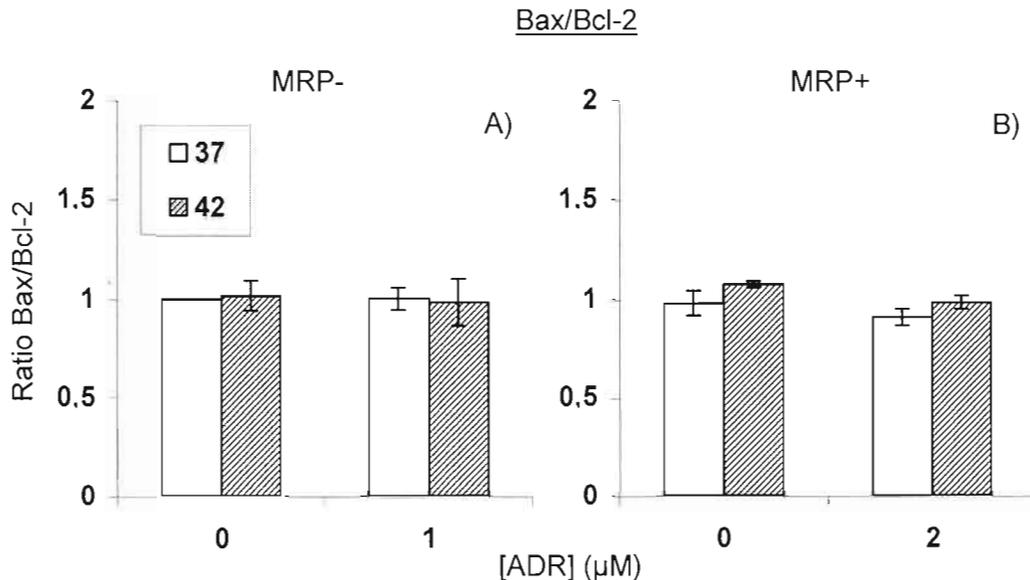


Figure 2.5 Lack of early activation of the mitochondrial pathway in non-resistant cells (MRP-) and resistant (MRP+) HeLa cells after 8 h of exposure to ADR and HT. Non-resistant (MRP-)(A) and resistant (MRP+)(B) HeLa cells were exposed to ADR for 18 h at different concentrations (0, 1 μM for HeLa MRP- and 0, 2 μM for HeLa MRP+). Cells were incubated at 37°C for 18 h, or at 42°C for the first hour of 18 h drug treatment. Levels of Bax and Bcl-2 expression were detected by FacScan and the ratio of Bax/Bcl-2 was determined. All results were compared to the untreated non-resistant HeLa cells, that was fixed at 1. Means \pm SEM are shown from 3 independent experiments.

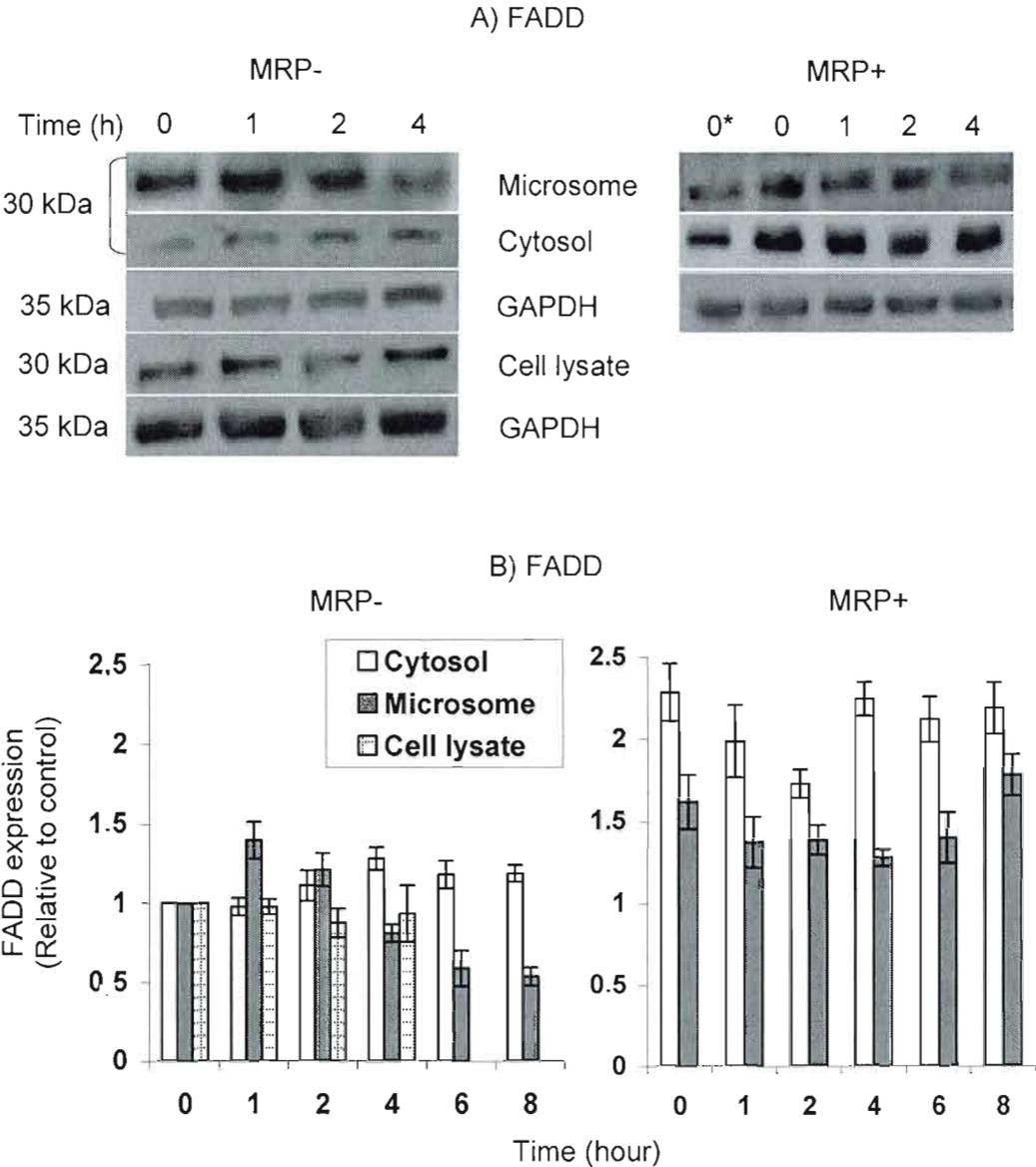


Figure 2.6 ADR induces translocation of death receptor pathway protein FADD from the cytosol to membranes. A) and B) HeLa MRP- and MRP+ cells were treated with 1 MRP-) or 2 (MRP+) μ M of ADR at 37°C for different times up to 8 h. FADD (~ 30 kDa) protein levels in cytosolic and membrane fractions and in whole cell lysates, were analyzed by immunoblotting and were expressed relative to untreated HeLa control cells (37°C). Representative blots are shown only for t = 0 to 4 h. GAPDH was used as loading control. Means \pm SEM are shown from at least 3 independent experiments.* Untreated control HeLa cells.

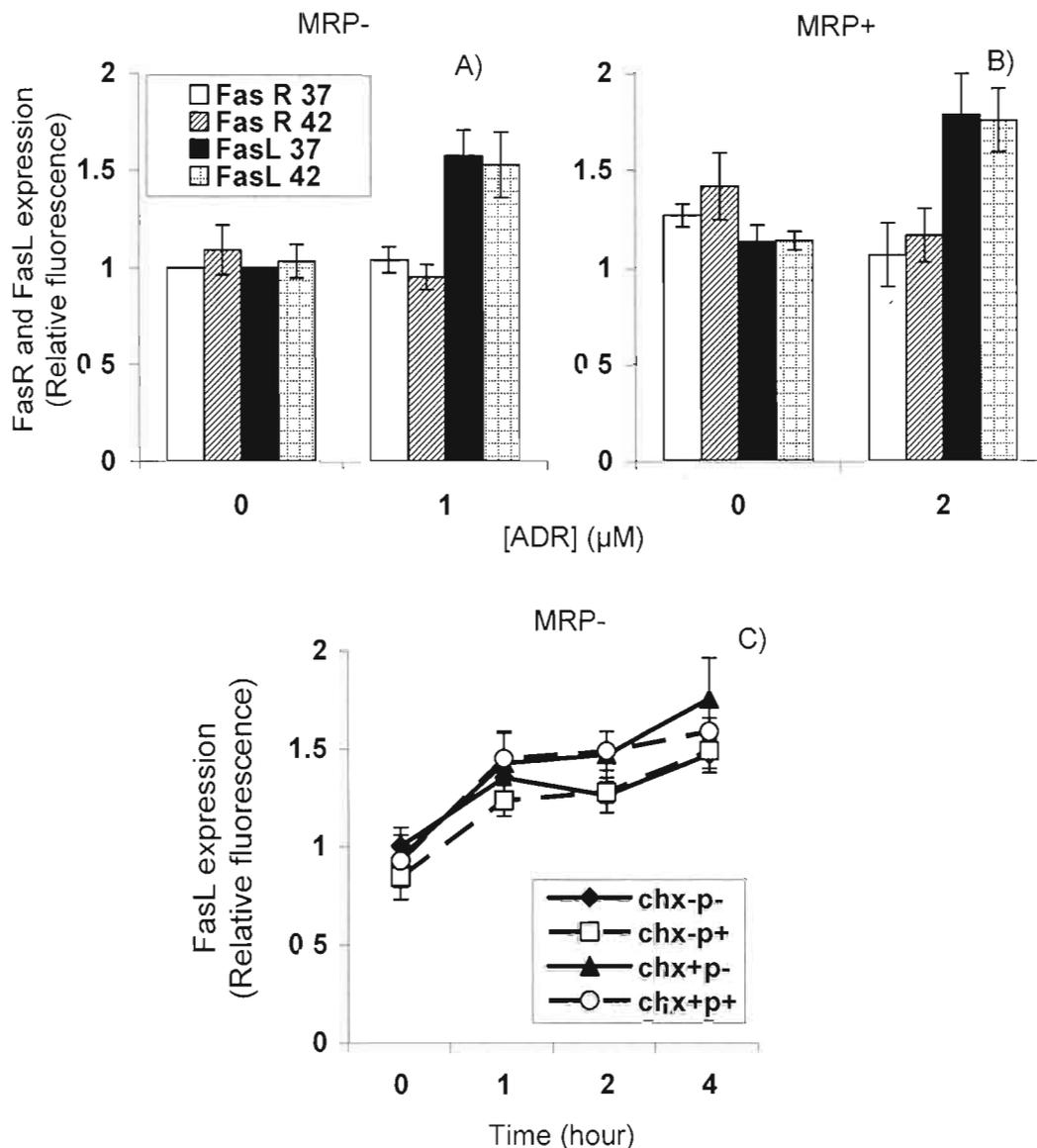


Figure 2.7 ADR causes induction of FasL expression in native (MRP-) and resistant (MRP+) HeLa cells. A) and B) HeLa cells were incubated for 8 h with ADR (0, 1 μM (MRP-); 0, 2 μM (MRP+)), either at 37°C for 8 h or combined with 1 h of 42°C hyperthermia for the first hour of 8 h drug treatment. Cells were fixed and FITC-labeled FasL and FasR antibodies were detected by FacScan. C) Non-resistant HeLa cells (MRP-) were incubated (1h), or not, with an inhibitor of protein synthesis, cycloheximide (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Cells were then treated with ADR (1 μM) for different times (0, 1, 2, 4 h). Cells were then fixed, permeabilized or not and levels of FasL and FasR were detected. Levels of FasL and FasR were expressed relative to untreated HeLa cells at 37°C, designated as 1. Means \pm SEM are shown from at least three different experiments.

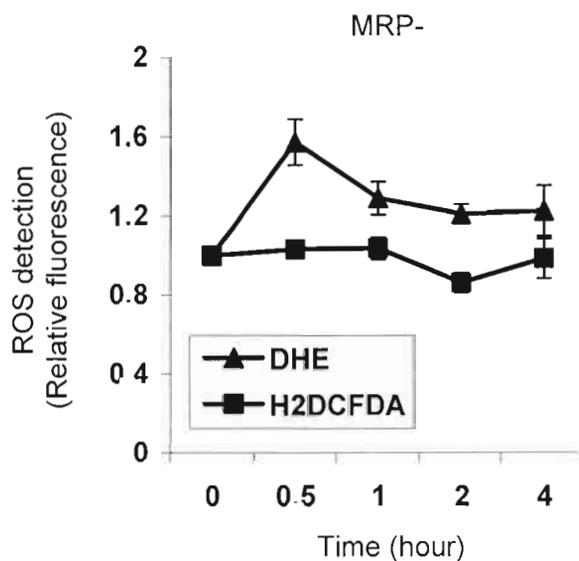


Figure 2.8 Kinetics of ROS formation following treatment with ADR in non-resistant HeLa cells (MRP-). Cells were incubated with ADR (1 μM) for different times up to 4 h, at 37°C. Cells were then incubated with DHE (O_2^- detection) (20 μM) or H₂DCFDA (H₂O₂ detection) (20 μM) for 30 minutes at 37°C and analysed by FacScan. Levels of fluorescence for DHE and H₂DCFDA are expressed relative to their respective untreated controls, designated as 1. Means \pm SEM are shown from at least 4 different experiments.

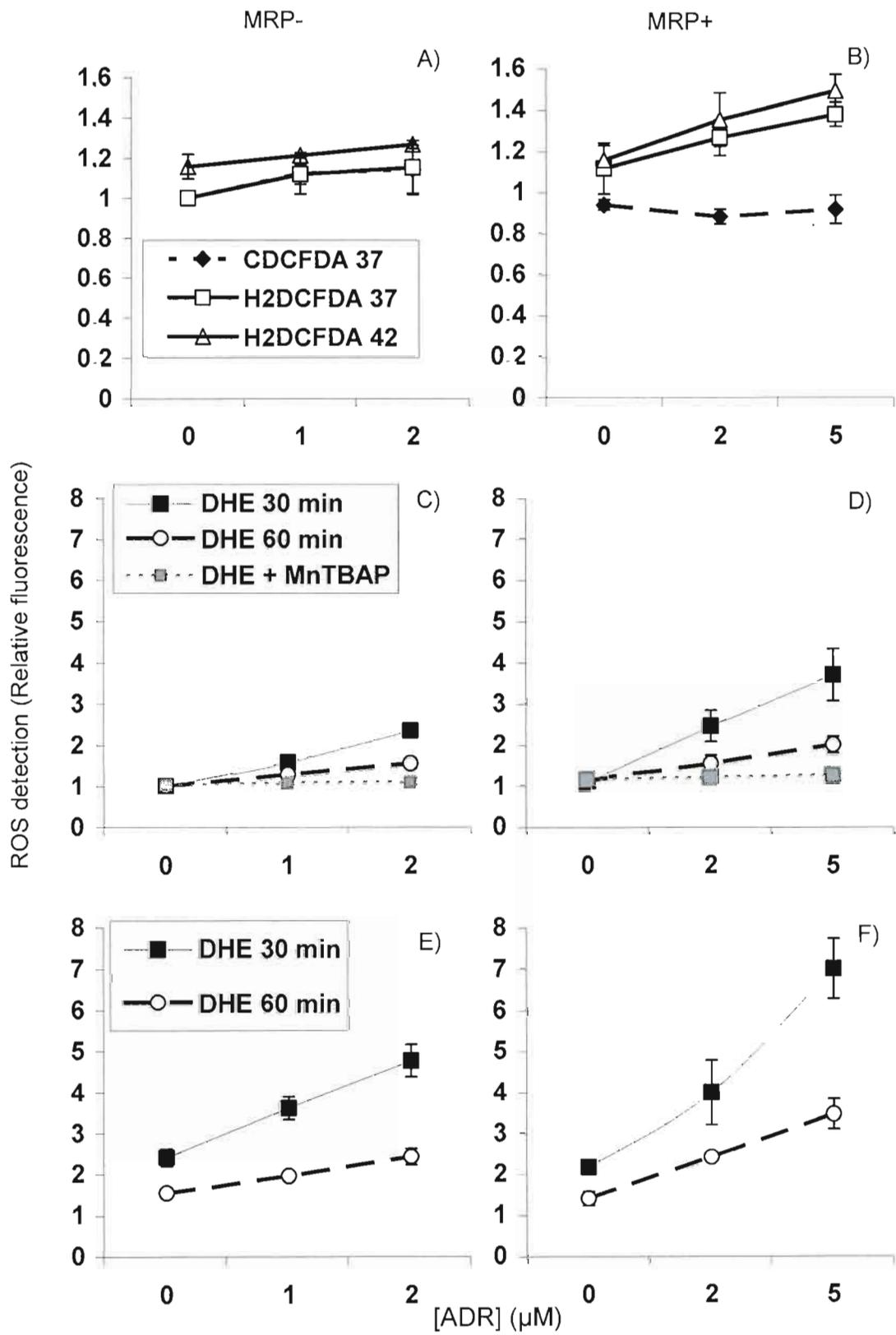


Figure 2.9 Generation of O_2^- in native (MRP⁻) and resistant (MRP⁺) HeLa cells by ADR at 37 and 42°C. A) and B) Cells were treated with ADR at 37°C for 4 h (or 1 h at 42°C + 3h at 37°C) and then incubated for 30 minutes with 20 μ M of H_2DCFDA (H_2O_2 detection), or with 20 μ M $CDCFDA$. C) and D) Cells were incubated with ADR for 30 or 60 min (at 37°C) followed by 30 min with 20 μ M of DHE (O_2^- detection). Some cells were pretreated with the antioxidant Mn TBAP, for 2 h before ADR (1h) treatment and labelling with DHE for 30 min. E) and F) Detection of O_2^- after ADR treatment at 42°C for 30 or 60 min, followed by labelling with DHE. Means \pm SEM are shown from at least three different experiments.

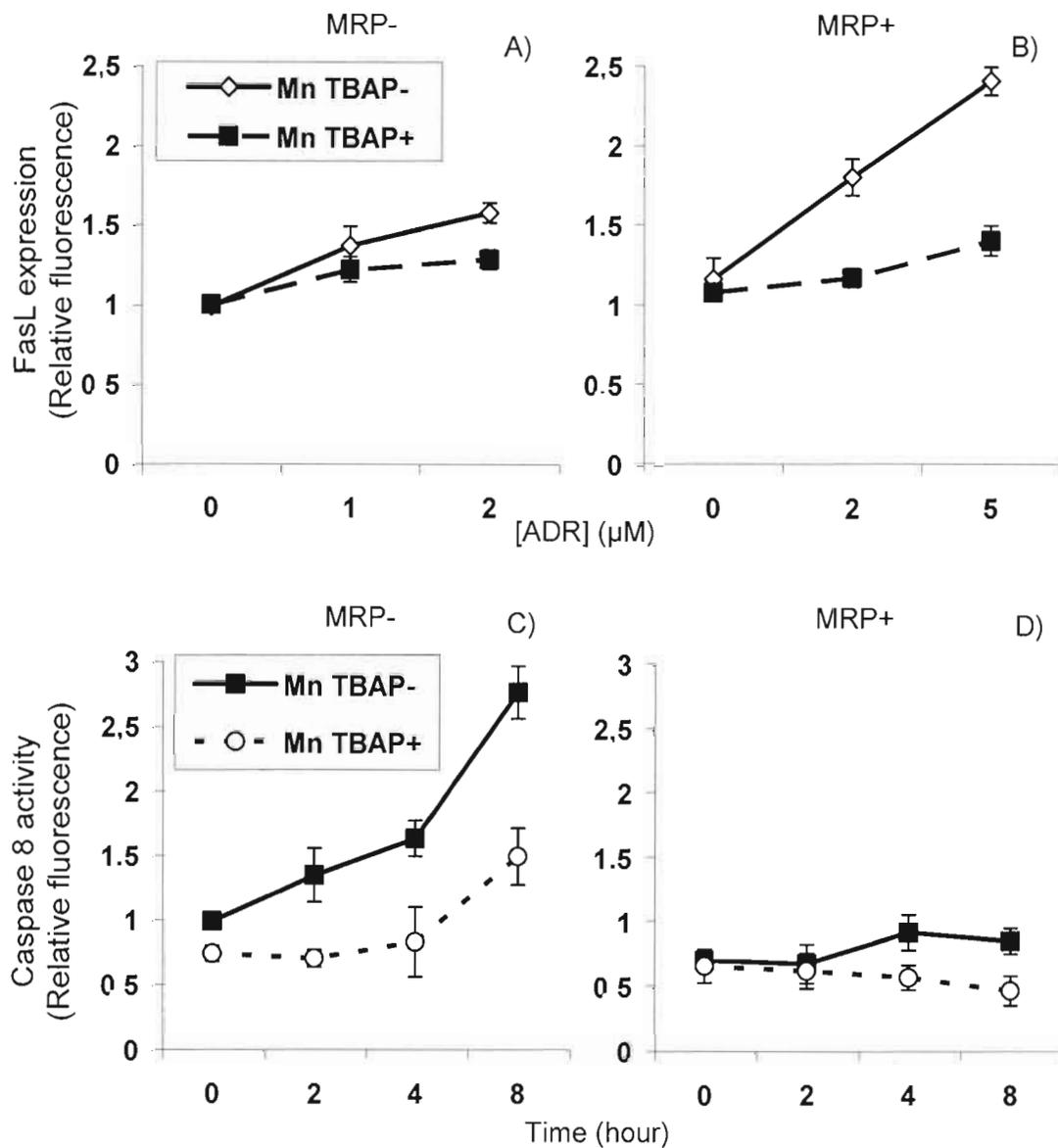


Figure 2.10 Induction of FasL expression and caspase 8 activity by ADR is inhibited by the antioxidant Mn TBAP. A-D) HeLa cells were pretreated with MnTBAP (200 μM) for 2 h and then treated with ADR for 1 h (MRP- = 0-2 μM ; MRP+ = 0-5 μM) when FasL protein expression was detected and treated with ADR for 0 up to 8 h (MRP- = 1 μM ; MRP+ = 2 μM) when caspase 8 was detected. All data were expressed relative to the untreated HeLa cell control (37°C) that was designated as 1. Means \pm SEM are shown from at least three independent experiments.

REFERENCES

- Alexander, H. R., Jr. 2003. «Hyperthermia and its modern use in cancer treatment». *Cancer*. vol. 98, no 2, p. 219-221.
- Averill, D. A., and B. Larrivé. 1998. «Hyperthermia, cyclosporine A and melphalan cytotoxicity and transport in multidrug resistant cells». *Int J Hyperthermia*. vol. 14, no 6, p. 583-588.
- Averill, D. A., and C. Su. 1999. «Sensitization to the cytotoxicity of adriamycin by verapamil and heat in multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells». *Radiat Res*. vol. 151, no 6, p. 694-702.
- Barzilai, A., and K. Yamamoto. 2004. «DNA damage responses to oxidative stress». *DNA Repair (Amst)*. vol. 3, no 8-9, p. 1109-1115.
- Bates, D. A., and W. J. Mackillop. 1986. «Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells». *Cancer Res*. vol. 46, no 11, p. 5477-5481.
- Bates, D. A., and W. J. Mackillop. 1990. «The effect of hyperthermia in combination with melphalan on drug-sensitive and drug-resistant CHO cells in vitro». *Br J Cancer*. vol. 62, no 2, p. 183-188.
- Bates, D. A., and C. C. Winterbourn. 1982. «Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H₂O₂: evidence for hydroxyl radical participation». *FEBS Lett*. vol. 145, no 1, p. 137-142.
- Bettaieb, A., and D. A. Averill-Bates. 2005. «Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis». *J Cell Physiol*. vol. 205, no 1, p. 47-57.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev and D. Wallach. 1996. «Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death». *Cell*. vol. 85, no 6, p. 803-815.
- Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem*. vol. 72, p. 248-254.
- Bristow, M. R., M. E. Billingham, J. W. Mason and J. R. Daniels. 1978. «Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity». *Cancer Treat Rep*. vol. 62, no 6, p. 873-879.

- Chen, Q., D. T. Fisher, S. A. Kucinska, W. C. Wang and S. S. Evans. 2006. «Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress». *Cancer Immunol Immunother.* vol. 55, no 3, p. 299-311.
- Chowdhury, I., B. Tharakan and G. K. Bhat. 2006. «Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited». *Cell Mol Biol Lett.* vol. 11, no 4, p. 506-525.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan and R. G. Deeley. 1992. «Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line». *Science.* vol. 258, no 5088, p. 1650-1654.
- Colombo, R., L. F. Da Pozzo, A. Lev, A. Salonia, P. Rigatti, Z. Leib, C. Servadio, E. Caldarera and M. Pavone-Macaluso. 1998. «Local microwave hyperthermia and intravesical chemotherapy as bladder sparing treatment for select multifocal and unresectable superficial bladder tumors». *J Urol.* vol. 159, no 3, p. 783-787.
- Cui, Z. G., T. Kondo, L. B. Feril Jr, K. Waki, O. Inanami and M. Kuwabara. 2004. «Effects of antioxidants on X-ray- or hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells». *Apoptosis.* vol. 9, no 6, p. 757-763.
- Damrot, J., T. Nubel, B. Epe, W. P. Roos, B. Kaina and G. Fritz. 2006. «Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide». *Br J Pharmacol.* vol. 149, no 8, p. 988-997.
- Danial, N. N., and S. J. Korsmeyer. 2004. «Cell death: critical control points». *Cell.* vol. 116, no 2, p. 205-219.
- DiPaola, R. S. 2002. «To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi and al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin Cancer Res.* vol. 8, no 11, p. 3311-3314.
- Du, J., D. H. Daniels, C. Asbury, S. Venkataraman, J. Liu, D. R. Spitz, L. W. Oberley and J. J. Cullen. 2006. «Mitochondrial production of reactive oxygen species mediate dicumarol-induced cytotoxicity in cancer cells». *J Biol Chem.* vol. 281, no 49, p. 37416-37426.
- Flanagan, S. W., P. L. Moseley and G. R. Buettner. 1998. «Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping». *FEBS Lett.* vol. 431, no 2, p. 285-286.
- Fukami, T., S. Nakasu, K. Baba, M. Nakajima and M. Matsuda. 2004. «Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and apoptosis in human glioma cell lines». *J Neurooncol.* vol. 70, no 3, p. 319-331.

- Furusawa, S., S. Nakano, J. Wu, S. Sakaguchi, M. Takayanagi, K. I. Sasaki and S. Satoh. 2001. «Apoptosis induced by doxorubicin and cinchonine in P388 multidrug-resistant cells». *J Pharm Pharmacol*. vol. 53, no 7, p. 1029-1039.
- Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and S. J. Korsmeyer. 1999. «Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death». *J Biol Chem*. vol. 274, no 2, p. 1156-1163.
- Gruber, B. M., E. L. Anuszewska, I. Bubko, A. Gozdzik, I. Fokt and W. Priebe. 2007. «Effect of structural modification at the 4, 3', and 2' positions of doxorubicin on topoisomerase II poisoning, apoptosis, and cytotoxicity in human melanoma cells». *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. vol. 55, no 3, p. 193-198.
- Hande, K. R. 1998. «Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1400, no 1-3, p. 173-184.
- Harima, Y., K. Nagata, K. Harima, V. V. Ostapenko, Y. Tanaka and S. Sawada. 2001. «A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma». *Int J Hyperthermia*. vol. 17, no 2, p. 97-105.
- Herman, T. S., A. E. Cress, C. Sweets and E. W. Gerner. 1981. «Reversal of resistance to methotrexate by hyperthermia in Chinese hamster ovary cells». *Cancer Res*. vol. 41, no 10, p. 3840-3843.
- Hickman, J. A. 1992. «Apoptosis induced by anticancer drugs». *Cancer Metastasis Rev*. vol. 11, no 2, p. 121-139.
- Hildebrandt, B., P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix and H. Riess. 2002. «The cellular and molecular basis of hyperthermia». *Crit Rev Oncol Hematol*. vol. 43, no 1, p. 33-56.
- Holzman, D. 1996. «Apoptosis provides new targets for chemotherapy». *J Natl Cancer Inst*. vol. 88, no 16, p. 1098-1100.
- Iarussi, D., P. Indolfi, F. Casale, P. Coppolino, M. A. Tedesco and M. T. Di Tullio. 2001. «Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood». *Curr Med Chem*. vol. 8, no 13, p. 1649-1660.
- Jones, E. L., J. R. Oleson, L. R. Prosnitz, T. V. Samulski, Z. Vujaskovic, D. Yu, L. L. Sanders and M. W. Dewhirst. 2005. «Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors». *J Clin Oncol*. vol. 23, no 13, p. 3079-3085.

- Juliano, R. L., and V. Ling. 1976. «A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants». *Biochim Biophys Acta*. vol. 455, no 1, p. 152-162.
- Kast, C., and P. Gros. 1998. «Epitope insertion favors a six transmembrane domain model for the carboxy-terminal portion of the multidrug resistance-associated protein». *Biochemistry*. vol. 37, no 8, p. 2305-2313.
- Kawai, H., Y. Minamiya, M. Kitamura, I. Matsuzaki, M. Hashimoto, H. Suzuki and S. Abo. 1997. «Direct measurement of doxorubicin concentration in the intact, living single cancer cell during hyperthermia». *Cancer*. vol. 79, no 2, p. 214-219.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Krammer and M. E. Peter. 1995. «Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor». *Embo J*. vol. 14, no 22, p. 5579-5588.
- Korsmeyer, S. J. 1992. «Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death». *Blood*. vol. 80, no 4, p. 879-886.
- Krishan, A. 1975. «Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining». *J Cell Biol*. vol. 66, no 1, p. 188-193.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature*. vol. 227, no 5259, p. 680-685.
- Lefrak E.A., J. Pitha, S. Rosenheim and J.A.Gottlieb. 1973. «A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity». *Cancer*. vol. 32, no 2, p. 302-314.
- Leng, W. D., D. Z. Wang, G. Feng and J. He. 2006. «Effect of hyperthermia on multidrug resistance of tongue squamous cell carcinoma cell line (Tca8113) and its multidrug resistance cell line Tca8113/CBDEA». *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. vol. 24, no 5, p. 447-450.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang. 1997. «Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade». *Cell*. vol. 91, no 4, p. 479-489.
- Lim, C. U., Y. Zhang and M. H. Fox. 2006. «Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells». *Int J Hyperthermia*. vol. 22, no 1, p. 77-91.
- Ling, Y. H., A. K. el-Naggar, W. Priebe and R. Perez-Soler. 1996. «Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells». *Mol Pharmacol*. vol. 49, no 5, p. 832-841.

- Liu, Y., C. W. Cho, X. Yan, T. K. Henthorn, K. O. Lillehei, W. N. Cobb and K. Y. Ng. 2001. «Ultrasound-Induced hyperthermia increases cellular uptake and cytotoxicity of P-glycoprotein substrates in multi-drug resistant cells». *Pharm Res.* vol. 18, no 9, p. 1255-1261.
- Liu, Y., K. Lillehei, W. N. Cobb, U. Christians and K. Y. Ng. 2001. «Overcoming MDR by ultrasound-induced hyperthermia and P-glycoprotein modulation». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 289, no 1, p. 62-68.
- Madesh, M., and G. Hajnoczky. 2001. «VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release». *J Cell Biol.* vol. 155, no 6, p. 1003-1015.
- Miller, R. C., M. Richards, C. Baird, S. Martin and E. J. Hall. 1994. «Interaction of hyperthermia and chemotherapy agents; cell lethality and oncogenic potential». *Int J Hyperthermia.* vol. 10, no 1, p. 89-99.
- Minow, R. A., R. S. Benjamin, E. T. Lee and J. A. Gottlieb. 1977. «Adriamycin cardiomyopathy-risk factors». *Cancer.* vol. 39, no 4, p. 1397-1402.
- Miyashita, T., and J. C. Reed. 1993. «Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line». *Blood.* vol. 81, no 1, p. 151-157.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Kramer, M. E. Peter and V. M. Dixit. 1996. «FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex». *Cell.* vol. 85, no 6, p. 817-827.
- Nagata, S. 1999. «Fas ligand-induced apoptosis». *Annu Rev Genet.* vol. 33, p. 29-55.
- Navarro, R., I. Busnadiego, M. B. Ruiz-Larrea and J. I. Ruiz-Sanz. 2006. «Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures». *Ann N Y Acad Sci.* vol. 1090, p. 419-428.
- Nooter, K., and G. Stoter. 1996. «Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy». *Pathol Res Pract.* vol. 192, no 7, p. 768-780.
- O'Connell, J., M. W. Bennett, G. C. O'Sullivan, J. K. Collins and F. Shanahan. 1999. «The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege». *Immunol Today.* vol. 20, no 1, p. 46-52.
- Ostberg, J. R., and E. A. Repasky. 2006. «Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function». *Cancer Immunol Immunother.* vol. 55, no 3, p. 292-298.

- Paroni, R., A. Salonia, A. Lev, L. F. Da Pozzo, G. Cighetti, F. Montorsi, P. Rigatti and R. Colombo. 2001. «Effect of local hyperthermia of the bladder on mitomycin C pharmacokinetics during intravesical chemotherapy for the treatment of superficial transitional cell carcinoma». *Br J Clin Pharmacol*. vol. 52, no 3, p. 273-278.
- Petak, I., and J. A. Houghton. 2001. «Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy». *Pathol Oncol Res*. vol. 7, no 2, p. 95-106.
- Potter, A. J., K. A. Gollahon, B. J. Palanca, M. J. Harbert, Y. M. Choi, A. H. Moskovitz, J. D. Potter and P. S. Rabinovitch. 2002. «Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin». *Carcinogenesis*. vol. 23, no 3, p. 389-401.
- Qian, J., W. Chen, M. Lettau, G. Podda, M. Zornig, D. Kabelitz and O. Janssen. 2006. «Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL». *Cell Signal*. vol. 18, no 8, p. 1327-1337.
- Raaphorst, G. P., S. Doja, L. Davis, D. Stewart and C. E. Ng. 1996. «A comparison of hyperthermia cisplatin sensitization in human ovarian carcinoma and glioma cell lines sensitive and resistant to cisplatin treatment». *Cancer Chemother Pharmacol*. vol. 37, no 6, p. 574-580.
- Rajagopal, A., A. C. Pant, S. M. Simon and Y. Chen. 2002. «In vivo analysis of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) activity using transient expression of fluorescently tagged MRP1». *Cancer Res*. vol. 62, no 2, p. 391-396.
- Rietbroek, R. C., M. S. Schilthuis, J. van der Zee and D. Gonzalez Gonzalez. 1999. «Hyperthermia in combination with chemotherapy in gynecological cancers». *Ned Tijdschr Geneeskd*. vol. 143, no 2, p. 85-88.
- Roti Roti, J. L. 2007. «Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication». *Int J Hyperthermia*. vol. 23, no 1, p. 3-15.
- Ryu, S., S. L. Brown, S. H. Kim, M. S. Khil and J. H. Kim. 1996. «Preferential radiosensitization of human prostatic carcinoma cells by mild hyperthermia». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. vol. 34, no 1, p. 133-138.
- Salo, D. C., C. M. Donovan and K. J. Davies. 1991. «HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise». *Free Radic Biol Med*. vol. 11, no 3, p. 239-246.
- Schem, B. C., O. Mella and O. Dahl. 1989. «Potentiation of combined BCNU and hyperthermia by pH reduction in vitro and hypertonic glucose in vivo in the BT4 rat glioma». *Int J Hyperthermia*. vol. 5, no 6, p. 707-715.

- Shustik, C., W. Dalton and P. Gros. 1995. «P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation». *Mol Aspects Med.* vol. 16, no 1, p. 1-78.
- Singal, P. K., N. Iliskovic, T. Li and D. Kumar. 1997. «Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention». *Faseb J.* vol. 11, no 12, p. 931-936.
- Singal, P. K., T. Li, D. Kumar, I. Danelisen and N. Iliskovic. 2000. «Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation». *Mol Cell Biochem.* vol. 207, no 1-2, p. 77-86.
- Souslova, T., and D. A. Averill-Bates. 2004. «Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 60, no 5, p. 1538-1551.
- Sreenivasa, G., B. Hildebrandt, S. Kummel, K. Jungnickel, C. H. Cho, W. Tilly, D. Bohmer, V. Budach, R. Felix and P. Wust. 2006. «Radiochemotherapy combined with regional pelvic hyperthermia induces high response and resectability rates in patients with nonresectable cervical cancer > or =FIGO IIB "bulky"». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 66, no 4, p. 1159-1167.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein and S. Nagata. 1993. «Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family». *Cell.* vol. 75, no 6, p. 1169-1178.
- Takemura, G., and H. Fujiwara. 2007. «Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management». *Prog Cardiovasc Dis.* vol. 49, no 5, p. 330-352.
- Tanel, A., and D. A. Averill-Bates. 2007. «Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein». *Free Radic Biol Med.* vol. 42, no 6, p. 798-810.
- Tsang, W. P., S. P. Chau, S. K. Kong, K. P. Fung and T. T. Kwok. 2003. «Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis». *Life Sci.* vol. 73, no 16, p. 2047-2058.
- van der Zee, J. 2002. «Heating the patient: a promising approach?». *Ann Oncol.* vol. 13, no 8, p. 1173-1184.
- Verheul, H. M., D. Z. Qian, M. A. Carducci and R. Pili. 2007. «Sequence-dependent antitumor effects of differentiation agents in combination with cell cycle-dependent cytotoxic drugs». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 60, no 3, p. 329-339.
- Vertrees, R. A., G. C. Das, V. L. Popov, A. M. Coscio, T. J. Goodwin, R. Logrono, J. B. Zwischenberger and P. J. Boor. 2005. «Synergistic interaction of hyperthermia and Gemcitabine in lung cancer». *Cancer Biol Ther.* vol. 4, no 10, p. 1144-1153.

- Von Hoff, D. D., M. W. Layard, P. Basa, H. L. Davis, Jr., A. L. Von Hoff, M. Rozenweig and F. M. Muggia. 1979. «Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure». *Ann Intern Med.* vol. 91, no 5, p. 710-717.
- Wang, K., X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman and S. J. Korsmeyer. 1996. «BID: a novel BH3 domain-only death agonist». *Genes Dev.* vol. 10, no 22, p. 2859-2869.
- Westphal, S., and H. Kalthoff. 2003. «Apoptosis: targets in pancreatic cancer». *Mol Cancer.* vol. 2, p. 6.
- Wust, P., B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix and P. M. Schlag. 2002. «Hyperthermia in combined treatment of cancer». *Lancet Oncol.* vol. 3, no 8, p. 487-497.
- Yokoyama, G., T. Fujii, E. Ogo, H. Yanaga, U. Toh, M. Yamaguchi, M. Mishima, S. Takamori, K. Shirouzu and H. Yamana. 2005. «Advanced chemoresistant breast cancer responding to multidisciplinary treatment with hyperthermia, radiotherapy, and intraarterial infusion». *Int J Clin Oncol.* vol. 10, no 2, p. 139-143.

CHAPITRE III

CONCLUSION

3.1 Implication d'ADR dans le signalement de l'apoptose chez les cellules HeLa

ADR est un des médicaments anticancéreux le plus utilisé dans le traitement du cancer. Son mode d'action exact est cependant mal connu et est le sujet d'intenses recherches. Il est connu que l'ADR peut s'insérer entre deux paires de bases azotées d'ADN ce qui inhiberait l'activité de la topoisomérase II. Ceci entraînerait principalement l'arrêt du cycle cellulaire par activation de « check points » et activerait, lors de dommages irréparables, la mort de la cellule par apoptose. Le métabolisme de l'ADR entraînerait également la formation de radicaux libres qui endommageraient l'ADN, les protéines et les constituants des membranes cellulaires. Les mécanismes apoptotiques spécifiquement impliqués dans la mort des cellules cancéreuses lors de traitement par ADR et l'influence du stress oxydatif dans le déclenchement de l'apoptose ne sont toutefois pas entièrement compris. C'est pourquoi dans le cadre de ce projet, nous avons tenté d'éclaircir ces différents mécanismes.

L'arrêt du cycle cellulaire en G2/M chez les cellules exposées à l'ADR confirme que les dommages causés à l'ADN par ADR sont irréparables et peuvent entraîner l'apoptose des cellules HeLa. Ceci a été démontré par l'analyse morphologique chez les cellules HeLa après 18-24 h d'exposition à l'ADR. L'apoptose peut être déclenchée par plusieurs voies de signalisation soit la voie mitochondriale, la voie des récepteurs de mort et la voie du réticulum endoplasmique. Cependant, des études réalisées dans le laboratoire ont montré l'activation de la voie mitochondriale chez les cellules HeLa après 18 h d'incubation avec l'ADR. L'activité enzymatique des caspases 9 et 3 a également permis de confirmer cette activation après 18 h d'exposition à l'ADR. Cependant, il est possible que la voie mitochondriale agissent comme voie d'amplification du signal apoptotique et qu'elle soit activée par la voie des récepteurs de mort via l'activation de la voie du « cross talk » dépendante de la translocation de la protéine proapoptotique t-Bid.

Dans cette étude, l'implication de la voie des récepteurs a été confirmée par l'activation de la caspase initiateur de cette voie, la caspase 8. L'activité de la caspase 8 serait supérieure après 8 h d'exposition à l'ADR qu'après 18 h, ce qui signifie que la voie des récepteurs de mort pourrait être activée de manière précoce, avant la voie mitochondriale, qui elle serait activée plus tard soit après 18 h d'exposition à l'ADR. L'activation de la voie des récepteurs de mort serait également confirmée par l'expression de la protéine FADD qui serait effectivement augmentée au niveau de la fraction microsomale après 2 h d'exposition à l'ADR, ce qui laisse croire à un recrutement membranaire de la part d'un récepteur de mort cellulaire. L'analyse de l'expression de FasR et de son ligand (FasL) après incubation avec l'ADR, a permis de constater une augmentation de FasL chez les cellules HeLa. Bien que le niveau d'expression de FasR demeure stable après l'exposition à l'ADR, l'augmentation de l'expression de FasL pourrait toutefois être à l'origine du recrutement membranaire de FADD. En effet, puisque l'expression de FasL peut être induite après seulement 1 h d'incubation, cette augmentation pourrait faciliter l'agrégation de FasR à son ligand (FasL) et déclencher ainsi l'activation du récepteur qui pourrait à son tour recruter la protéine FADD après 2 h d'exposition à l'ADR. De plus, comme la caspase 8 est activée et que l'expression de FasL est augmentée, ceci peut renforcer l'idée de l'activation de la voie des récepteurs de mort par le récepteur Fas.

Afin d'investiguer la cause de l'augmentation du niveau d'expression de FasL chez les cellules HeLa, le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été étudié. À ce sujet, Petak *et al* (2001) ont mentionné que certains agents chimiothérapeutiques pouvaient moduler l'expression des récepteurs et de leur ligand par l'entremise de la production de ROS. Ceci nous a permis de vérifier qu'il y avait bel et bien production de ROS dans les cellules HeLa exposées à l'ADR et que l'anion superoxyde était le ROS qui était principalement produit en présence de l'ADR. De plus, cette production de O_2^- était plus forte après 30 minutes d'incubation, ce qui pourrait corroborer avec l'augmentation de l'expression du FasL après seulement 1 h de traitement par l'ADR. Dans le but de vérifier cette hypothèse, les cellules ont été prétraitées avec Mn TBAP avant le traitement par l'ADR. Le Mn TBAP est un antioxydant mimétique de la superoxyde dismutase qui peut capter les ions O_2^- et inhiber leur détection. Le niveau d'anion superoxyde fut effectivement diminué,

ce qui montra l'efficacité du traitement par l'antioxydant lors d'exposition avec l'ADR. Le prétraitement avec Mn TBAP a également permis d'inhiber l'expression de FasL au niveau membranaire ainsi que l'activité de la caspase 8 des cellules HeLa traitées avec l'ADR. Ces derniers résultats amènent une preuve de l'importante implication des anions superoxydes produits par l'ADR dans l'induction de l'expression de FasL et de l'activité de la caspase 8 des cellules HeLa soumises à l'ADR. De plus, ceci démontre l'implication du stress oxydatif dans l'activation de la voie des récepteurs de mort.

3.2 Effets de l'ADR sur les cellules résistantes HeLa MRP+

La résistance aux médicaments est un obstacle majeur dans les traitements de chimiothérapie. Le phénotype de résistance aux médicaments peut être acquis à la suite d'une première exposition à un seul médicament. Ceci peut entraîner une résistance à plusieurs agents anticancéreux n'ayant pas de ressemblance entre leur structure chimique. Ce phénomène se nomme résistance pléiotropique aux médicaments (« Multidrug Resistance ») et plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans cette résistance tels que la surexpression d'enzymes responsables de la détoxification cellulaire (glutathion synthétase, glutathion S-transférase), la surexpression de protéines antiapoptotiques (ex :Bcl-2 et HSPs), la diminution du niveau de la topoisomérase II ou la mutation de son gène ainsi que la surexpression de protéines de résistance aux médicaments (P-gp et MRP). Les protéines P-gp et MRP étant considérées comme des protéines de détoxification de la cellule, agiraient en expulsant les substances cytotoxiques, dont les agents chimiothérapeutiques, vers le milieu extracellulaire de manière ATP-dépendante. Les conséquences majeures liées à la surexpression de ces protéines de résistance seraient la diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses résistantes aux traitements de chimiothérapie, l'augmentation des doses administrées afin d'obtenir un traitement efficace et l'augmentation des effets néfastes aux tissus sains (cardiotoxicité dans le cas de l'ADR).

Dans cette étude, les effets de la présence de la protéine MRP chez les cellules HeLa MRP+, ont été comparés suite à un traitement à l'ADR aux effets chez les cellules HeLa non résistantes. L'étude de cytotoxicité, par l'utilisation de la sulforhodamine B, menée par Kast *et al* a démontré que les cellules HeLa MRP+ étaient plus résistantes que les HeLa à l'ADR

(Kast et Gros, 1998). Cette présente étude démontre que les cellules HeLa MRP⁺ seraient aussi plus résistantes à l'apoptose induite par exposition à l'ADR que les cellules HeLa, puisque le niveau d'apoptose (condensation de la chromatine) est inférieur chez les HeLa MRP⁺ comparativement aux cellules HeLa. Cependant, ce faible taux d'apoptose ne serait pas représentatif du cycle cellulaire chez les cellules HeLa MRP⁺ en comparaison avec les cellules HeLa. En effet, l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M est plus important chez les cellules HeLa MRP⁺ que les cellules HeLa, ce qui pourrait peut-être s'expliquer par le fait que les cellules HeLa MRP⁺ déclencheraient moins d'apoptose que chez les cellules HeLa puisqu'elles attendraient plutôt la fin de la phase de réparation des dommages causés par l'ADR, avant de passer à la mitose.

Le phénotype MDR chez les HeLa MRP⁺ serait également supporté par le faible niveau d'activation de la caspase 8 et 9 lors d'exposition à l'ADR. Par contre, la production d'anion superoxyde est également plus élevée chez les cellules HeLaMRP après 30 min et 1 h, tout comme chez les HeLa. Il se pourrait que cette hausse soit la cause de l'augmentation de l'expression du FasL observée chez les cellules HeLa MRP⁺ lors d'exposition à l'ADR. Les résultats obtenus suite à l'exposition des cellules HeLa MRP⁺ à l'ADR, ne permettent pas de se prononcer sur les mécanismes exacts impliqués dans leur résistance face à l'ADR. Cependant, l'ADR causerait la production d'anions superoxydes, l'augmentation de l'expression de FasL, l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation des caspases 8, 9 et 3 chez les cellules HeLa MRP⁺. Toutefois, la diminution du niveau d'apoptose suggère que les cellules résistantes auraient une meilleure capacité de réparation de l'ADN au niveau du noyau.

3.3 Hyperthermie comme thérapie adjuvante à la chimiothérapie

L'HT consiste en une augmentation de la température tumorale de 2 à 5°C au-dessus de la température physiologique (37°C). Sa seule utilisation montrerait une diminution de la grosseur des tumeurs, mais ne suffirait pas à enrayer complètement un cancer. Cependant, il a été démontré que l'hyperthermie serait un traitement adjuvant très prometteur dans le domaine des thérapies contre le cancer. Effectivement, l'HT permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux que ce soit la chimiothérapie, la radiothérapie, et plus récemment, l'HT a également montré beaucoup de succès lorsque combinée à

l'immunothérapie. De plus, l'hyperthermie permettrait aussi de diminuer la toxicité aux tissus sains et donc les effets secondaires indésirables qui peuvent accompagner les traitements classiques contre le cancer. L'HT agirait principalement en provoquant des changements dans la conformation protéique, en stimulant la réponse immunitaire, en altérant le microenvironnement tumoral et en induisant l'apoptose. Il a également été reconnu que l'HT pourrait diminuer la résistance des cellules cancéreuses envers CT et RT. En effet, l'HT sensibiliserait les cellules tumorales résistantes aux effets cytotoxiques de CT et RT soit en augmentant la perméabilité membranaire, en facilitant l'accumulation des agents de chimiothérapie et en inhibant la réparation de l'ADN. Les études précédentes dans la littérature concernant l'HT n'ont pas permis de déterminer de façon précise son mécanisme d'action à l'intérieur des cellules cancéreuses sensibles et résistantes ainsi que les voies de signalisation qui y sont impliquées, et ce en traitement seul ou combiné à CT. C'est ce que ce travail a tenté d'éclaircir par le traitement des cellules cancéreuses, non résistantes (HeLa) et résistantes (HeLa MRP+), avec l'ADR et l'HT (1 h à 42°C).

La détection de l'apoptose augmente en fonction de la température (à 42°C) d'exposition chez les cellules résistantes et non résistantes. Ceci signifie que l'HT pourrait effectivement diminuer la résistance des cellules tumorales. Vu les légères différences au niveau du cycle cellulaire, il est aussi plausible de dire que l'apoptose pourrait être déclenchée par l'HT via un mécanisme indépendant du cycle cellulaire chez les cellules cancéreuses. Un des mécanismes proposés à ce sujet dans la littérature, suggère une action indépendante de la protéine p53. La protéine p53 est fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, jouant un rôle décisif dans la réparation des dommages ou le déclenchement de la mort cellulaire lors d'un arrêt du cycle au niveau des « check points ». De plus, il semblerait, selon les caractéristiques du modèle cellulaire établi, que le gène p53 des cellules HeLa serait moins actif que chez d'autres lignées cellulaires.

Puisque l'HT (42°C pour 1 h) affecte très peu l'activité des caspases, ceci pourrait laisser croire à l'activation d'un mécanisme caspase-indépendant par l'HT. Cependant, l'HT induit une augmentation importante de production de l'anion superoxyde chez les cellules HeLa et HeLa MRP+. D'autres études concernant le mécanisme d'action de l'HT ont

également montré une formation de O_2^- suite à un traitement par le choc thermique (44°C) chez les cellules de lymphome (U937) (Cui *et al.*, 2004). La production de ROS étant considérée comme un événement apoptotique précoce, pourrait être la cause du déclenchement de l'apoptose chez les cellules HeLa et HeLa MRP+ soumises au choc thermique seul. En effet, un mécanisme envisagé serait la formation de pore au niveau de la membrane mitochondriale, provoquée par l'accumulation d'anion superoxyde (Madesh et Hajnoczky, 2001). Ceci pourrait déclencher le relâchement de plusieurs protéines proapoptotiques telle que AIF, endoG, cytochrome C et Smac/Diablo, contenues entre les deux feuillettes de la membrane mitochondriale. Par exemple, la translocation de AIF vers le noyau, ainsi que sa liaison avec l'ADN, pourrait causer la fragmentation de l'ADN et ainsi, l'exécution de l'apoptose (Fukami *et al.*, 2004). D'autre part, l'HT pourrait également avoir une double action soit de favoriser l'action des ROS produits par l'ADR causant des dommages à l'ADN et d'inhiber la réparation de l'ADN.

Pour ce qui est du traitement combiné de l'ADR et de l'HT, l'étude démontre qu'il serait possible d'augmenter l'efficacité de l'ADR dans les cellules non résistantes HeLa, mais qu'il serait également possible de sensibiliser les cellules résistantes HeLa MRP+ au traitement de chimiothérapie (ADR). En effet, même si le niveau d'apoptose reste inférieure chez les cellules HeLa MRP+ par rapport aux cellules HeLa, suite au traitement combiné (ADR et HT), leur réponse s'apparente à celle des HeLa. Par exemple, le niveau d'apoptose, la production de ROS et le cycle cellulaire varient de manière température dépendante chez les deux lignées. Tel que mentionné précédemment, l'HT et l'ADR, en traitement individuel, favoriseraient l'apoptose via la production de ROS. Effectivement, lors de traitement combiné (ADR et HT), la production de ROS étant supérieure dans les deux lignées cellulaires en comparaison avec les traitements individuels. Cela signifie que le traitement combiné pourrait augmenter l'efficacité de traitement et sensibiliser les cellules résistantes. Ceci corrobore avec les résultats de l'analyse morphologique, qui montre qu'effectivement, le niveau d'apoptose augmente avec le traitement combiné dans les deux lignées cellulaires. La production d'anion superoxyde semblerait être un élément commun important dans le mécanisme apoptotique lié à chacun des traitements. Lors de leur combinaison, la production de l'anion superoxyde par l'HT, pourrait, en plus d'activer la voie des récepteurs de mort,

favoriser la dépolarisation de la mitochondrie, et donc faciliter l'activation de la voie d'amplification mitochondriale par l'ADR. Ceci déclencherait l'apoptose plus rapidement, et à plus faibles concentrations d'ADR chez les deux lignées cellulaires et pourrait également augmenter les effets cytotoxiques de l'ADR en inhibant la réparation de l'ADN.

En somme, cette étude a permis d'éclaircir le mécanisme de signalisation impliqué lors de traitement avec l'ADR, un agent thérapeutique très renommé. En effet, la production de ROS permettrait l'activation précoce de la voie des récepteurs de mort, qui pourrait activer plus tardivement la voie mitochondriale. Ceci permettrait d'amplifier le signal apoptotique et ainsi déclencher l'exécution de l'apoptose chez les cellules non résistantes HeLa. Par contre, les effets induits par l'ADR chez les cellules résistantes demandent à être clarifiés puisque le niveau d'apoptose est inférieur aux cellules non résistantes, mais le mécanisme de signalement apoptotique est quand même enclenché. L'hyperthermie, pour sa part, induirait principalement l'apoptose en favorisant la production d'anions superoxydes. L'anion superoxyde pourrait induire la dépolarisation de la mitochondrie et/ou causer des dommages à l'ADN. Ceci pourrait causer le relâchement de facteur tel que AIF et EndoG pouvant induire la fragmentation de l'ADN et donc l'apoptose. La combinaison des deux traitements pourrait permettre effectivement d'augmenter l'efficacité du traitement par l'ADR chez les cellules non résistantes, mais également de sensibiliser les cellules résistantes HeLa MRP+. Ceci aurait pour avantage de diminuer la dose de médicaments nécessaire pour arriver à l'élimination des cellules résistantes et non résistantes, ce qui permettrait conséquemment de diminuer les effets secondaires liés au traitement de chimiothérapie, et donc l'amélioration de la qualité de vie du patient.

3.4 Perspectives futures

Les travaux futurs pourraient comprendre l'utilisation d'une molécule antagoniste au récepteur Fas ce qui pourrait permettre d'apporter une autre preuve à l'activation de la voie des récepteurs via le FasR par l'ADR chez les cellules HeLa sensibles et HeLaMRP, à condition que l'activité de la caspase 8 s'en trouve diminuée. De plus, la présence de siRNA contre FasL permettrait aussi de confirmer son implication dans l'activation de la voie des récepteurs de mort lors d'exposition à l'ADR. En effet, la présence de siRNA causerait le « knock down » de FasL, et permettrait de bloquer l'agrégation de FasL et FasR par l'ADR.

Si l'activité de la caspase 8 est inhibée ceci démontrerait que le FasL est vraiment responsable de l'activation de la voie du récepteur de mort Fas.

Puisque les cellules HeLa MRP+ montrent une activation de la voie des récepteurs de mort, il serait intéressant d'étudier davantage les mécanismes de signallement apoptotique impliqués plus tardivement soit après 48 h. En effet, il se pourrait que l'apoptose soit enclenché plus tard dans les cellules résistantes. Les mécanismes entourant les effets mitochondriaux et nucléaires des ROS par l'ADR et l'HT demandent également à être approfondis, afin de mieux comprendre leur implication dans les cellules sensibles et résistantes. De plus, il serait aussi important d'étudier spécifiquement l'implication des mécanismes caspases-indépendants tels que AIF et EndoG dans l'activation de l'apoptose lors de traitement par l'HT et l'ADR.

La reconnaissance des effets bénéfiques de l'hyperthermie dans les traitements contre le cancer suscite un intérêt marqué pour cette technique en milieu clinique. En effet, l'hyperthermie comme traitement adjuvant à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie, augmenterait l'efficacité et la sélectivité du traitement tout en diminuant les effets toxiques néfastes pour les tissus environnants. D'ailleurs, plusieurs études cliniques sont présentement en cours ou sont sur le point de débiter entre autres sur le cancer du col de l'utérus (Duke University Medical Center). D'autre part, plusieurs groupes de recherche se concentrent également à développer de nouvelles techniques de chauffage afin de minimiser les pertes de chaleur par la dispersion dans les tissus environnants. En effet, une de ces nouvelles stratégies implique l'injection tumorale directe d'un fluide contenant des nanoparticules magnétiques (Wust *et al.*, 2006). L'application d'un champ magnétique permettant alors la formation de chaleur. D'autres études se concentrent également sur l'encapsulation de médicaments anticancéreux tels que l'ADR et le cisplatine dans des liposomes qui sont de petites vésicules entourées d'une bicouche lipidique. Certaines études tentent même la coencapsulation du cisplatine et du verapamil, un inhibiteur de la P-gp (Zhang *et al.*, 2007). Cette approche est prometteuse afin de contrer la résistance aux médicaments. Un autre groupe de recherche propose également des liposomes sensibles à la chaleur dont le contenu

serait libéré par application de l'hyperthermie (Woo *et al.*, 2007). Bref, l'hyperthermie est un domaine de recherche en pleine effervescence qui ne manque pas de nous surprendre.

RÉFÉRENCES

- Abastado, J. P. 2003. «Cellular immunotherapy: complexity of immune system and industrial development». *Bull Cancer*. vol. 90, no 8-9, p. 789-794.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th. New York: Garland Science, 1616 p.
- Alexander, H. R., Jr. 2003. «Hyperthermia and its modern use in cancer treatment». *Cancer*. vol. 98, no 2, p. 219-221.
- Aouali, N., H. Morjani, A. Trussardi, E. Soma, B. Giroux et M. Manfait. 2003. «Enhanced cytotoxicity and nuclear accumulation of doxorubicin-loaded nanospheres in human breast cancer MCF7 cells expressing MRP1». *Int J Oncol*. vol. 23, no 4, p. 1195-1201.
- Aries, A., P. Paradis, C. Lefebvre, R. J. Schwartz et M. Nemer. 2004. «Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 101, no 18, p. 6975-6980.
- ASPC. 1997. «Mon combat pour la vie». *Agence de Santé publique du Canada*. En ligne. http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/tbwimf-mcplv/causes_f.html.
- ASPC. 1998. «Le cancer du col utérin au Canada». *Agence de Santé publique du Canada*. En ligne. http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/updates/cervix-98_f.html.
- Averill, D. A., et B. Larrivée. 1998. «Hyperthermia, cyclosporine A and melphalan cytotoxicity and transport in multidrug resistant cells». *Int J Hyperthermia*. vol. 14, no 6, p. 583-588.
- Averill, D. A., et C. Su. 1999. «Sensitization to the cytotoxicity of adriamycin by verapamil and heat in multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells». *Radiat Res*. vol. 151, no 6, p. 694-702.
- Badros, A. Z., O. Goloubeva, A. P. Rapoport, B. Ratterree, N. Gahres, B. Meisenberg, N. Takebe, M. Heyman, J. Zwiebel, H. Streicher, C. D. Gocke, D. Tomic, J. A. Flaws, B. Zhang et R. G. Fenton. 2005. «Phase II study of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with dexamethasone and thalidomide in relapsed multiple myeloma patients». *J Clin Oncol*. vol. 23, no 18, p. 4089-4099.
- Bakos, E., et L. Homolya. 2007. «Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1)». *Pflugers Arch*. vol. 453, no5, p. 621-41.
- Baronzio, G., A. Gramaglia et G. Fiorentini. 2006. «Hyperthermia and immunity. A brief overview». *In Vivo*. vol. 20, no 6A, p. 689-695.

- Barzilai, A., et K. Yamamoto. 2004. «DNA damage responses to oxidative stress». *DNA Repair (Amst)*. vol. 3, no 8-9, p. 1109-1115.
- Bates, D. A., et W. J. Mackillop. 1986. «Hyperthermia, adriamycin transport, and cytotoxicity in drug-sensitive and -resistant Chinese hamster ovary cells». *Cancer Res*. vol. 46, no 11, p. 5477-5481.
- Bates, D. A., et W. J. Mackillop. 1990. «The effect of hyperthermia in combination with melphalan on drug-sensitive and drug-resistant CHO cells in vitro». *Br J Cancer*. vol. 62, no 2, p. 183-188.
- Bates, D. A., et C. C. Winterbourn. 1982. «Deoxyribose breakdown by the adriamycin semiquinone and H₂O₂: evidence for hydroxyl radical participation». *FEBS Lett*. vol. 145, no 1, p. 137-142.
- Bay, J. O., et J. Y. Blay. 2003. «Cancer cell therapy: what future?». *Bull Cancer*. vol. 90, no 8-9, p. 675-676.
- Bettaieb, A., et D. A. Averill-Bates. 2005. «Thermotolerance induced at a mild temperature of 40 degrees C protects cells against heat shock-induced apoptosis». *J Cell Physiol*. vol. 205, no 1, p. 47-57.
- Bold, R. J., P. M. Termuhlen et D. J. McConkey. 1997. «Apoptosis, cancer and cancer therapy». *Surg Oncol*. vol. 6, no 3, p. 133-142.
- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, Y. V. Goltsev et D. Wallach. 1996. «Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death». *Cell*. vol. 85, no 6, p. 803-815.
- Bradford, M. M. 1976. «A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding». *Anal Biochem*. vol. 72, p. 248-254.
- Bremer, E., G. van Dam, B. J. Kroesen, L. de Leij et W. Helfrich. 2006. «Targeted induction of apoptosis for cancer therapy: current progress and prospects». *Trends Mol Med*. vol. 12, no 8, p. 382-393.
- Bristow, M. R., M. E. Billingham, J. W. Mason et J. R. Daniels. 1978. «Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity». *Cancer Treat Rep*. vol. 62, no 6, p. 873-879.
- Brown, G. A., J. P. McPherson, L. Gu, D. W. Hedley, R. Toso, K. L. Deuchars, M. H. Freedman et G. J. Goldenberg. 1995. «Relationship of DNA topoisomerase II alpha and beta expression to cytotoxicity of antineoplastic agents in human acute lymphoblastic leukemia cell lines». *Cancer Res*. vol. 55, no 1, p. 78-82.

- Bykov, V. J., N. Issaeva, A. Shilov, M. Hultcrantz, E. Pugacheva, P. Chumakov, J. Bergman, K. G. Wiman et G. Selivanova. 2002. «Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound». *Nat Med.* vol. 8, no 3, p. 282-288.
- Catros-Quemener, V., F. Bouet et N. Genetet. 2003. «Antitumor immunity and cellular cancer therapies». *Med Sci (Paris)*. vol. 19, no 1, p. 43-53.
- Chen, Q., D. T. Fisher, S. A. Kucinska, W. C. Wang et S. S. Evans. 2006. «Dynamic control of lymphocyte trafficking by fever-range thermal stress». *Cancer Immunol Immunother.* vol. 55, no 3, p. 299-311.
- Chowdhury, I., B. Tharakan et G. K. Bhat. 2006. «Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited». *Cell Mol Biol Lett.* vol. 11, no 4, p. 506-525.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan et R. G. Deeley. 1992. «Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line». *Science.* vol. 258, no 5088, p. 1650-1654.
- Cole, S. P., K. E. Sparks, K. Fraser, D. W. Loe, C. E. Grant, G. M. Wilson et R. G. Deeley. 1994. «Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells». *Cancer Res.* vol. 54, no 22, p. 5902-5910.
- Colombo, R., L. F. Da Pozzo, A. Lev, A. Salonia, P. Rigatti, Z. Leib, C. Servadio, E. Calderera et M. Pavone-Macaluso. 1998. «Local microwave hyperthermia and intravesical chemotherapy as bladder sparing treatment for select multifocal and unresectable superficial bladder tumors». *J Urol.* vol. 159, no 3, p. 783-787.
- Cui, Z. G., T. Kondo, L. B. Feril Jr, K. Waki, O. Inanami et M. Kuwabara. 2004. «Effects of antioxidants on X-ray- or hyperthermia-induced apoptosis in human lymphoma U937 cells». *Apoptosis.* vol. 9, no 6, p. 757-763.
- Cutts, S. M., et D. R. Phillips. 1995. «Use of oligonucleotides to define the site of interstrand cross-links induced by Adriamycin». *Nucleic Acids Res.* vol. 23, no 13, p. 2450-2456.
- Damrot, J., T. Nubel, B. Epe, W. P. Roos, B. Kaina et G. Fritz. 2006. «Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide». *Br J Pharmacol.* vol. 149, no 8, p. 988-997.
- Danial, N. N., et S. J. Korsmeyer. 2004. «Cell death: critical control points». *Cell.* vol. 116, no 2, p. 205-219.

- Dean, M., Y. Hamon et G. Chimini. 2001. «The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily». *J Lipid Res.* vol. 42, no 7, p. 1007-1017.
- Debatin, K. M., et P. H. Kramer. 2004. «Death receptors in chemotherapy and cancer». *Oncogene.* vol. 23, no 16, p. 2950-2966.
- Deeley, R. G., et S. P. Cole. 2006. «Substrate recognition and transport by multidrug resistance protein 1 (ABCC1)». *FEBS Lett.* vol. 580, no 4, p. 1103-1111.
- Depeille, P., P. Cuq, S. Mary, I. Passagne, A. Evrard, D. Cupissol et L. Vian. 2004. «Glutathione S-transferase M1 and multidrug resistance protein 1 act in synergy to protect melanoma cells from vincristine effects». *Mol Pharmacol.* vol. 65, no 4, p. 897-905.
- DiPaola, R. S. 2002. «To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis». *Clin Cancer Res.* vol. 8, no 11, p. 3311-3314.
- Du, J., D. H. Daniels, C. Asbury, S. Venkataraman, J. Liu, D. R. Spitz, L. W. Oberley et J. J. Cullen. 2006. «Mitochondrial production of reactive oxygen species mediate dicumarol-induced cytotoxicity in cancer cells». *J Biol Chem.* vol. 281, no 49, p. 37416-37426.
- Durst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg et H. zur Hausen. 1983. «A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions». *Proc Natl Acad Sci USA.* vol. 80, no 12, p. 3812-3815.
- Endicott, J. A., et V. Ling. 1989. «The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance». *Annu Rev Biochem.* vol. 58, p. 137-171.
- Enk, A. H., J. C. Becker et G. Schuler. 2006. «Immunotherapy of malignant melanoma-basic principles and novel therapeutic approaches». *J Dtsch Dermatol Ges.* vol. 4, no 8, p. 635-645.
- Faitova, J., D. Krekac, R. Hrstka et B. Vojtesek. 2006. «Endoplasmic reticulum stress and apoptosis». *Cell Mol Biol Lett.* vol. 11, no 4, p. 488-505.
- Fan, X. Q., et Y. J. Guo. 2001. «Apoptosis in oncology». *Cell Res.* vol. 11, no 1, p. 1-7.
- Flanagan, S. W., P. L. Moseley et G. R. Buettner. 1998. «Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping». *FEBS Lett.* vol. 431, no 2, p. 285-286.
- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *N Engl J Med.* vol. 285, no 21, p. 1182-1186.

- Franco, E. L., N. F. Schlecht et D. Saslow. 2003. «The epidemiology of cervical cancer». *Cancer J.* vol. 9, no 5, p. 348-359.
- Friesen, C., S. Fulda et K. M. Debatin. 1999. «Cytotoxic drugs and the CD95 pathway». *Leukemia.* vol. 13, no 11, p. 1854-1858.
- Fukami, T., S. Nakasu, K. Baba, M. Nakajima et M. Matsuda. 2004. «Hyperthermia induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) and apoptosis in human glioma cell lines». *J Neurooncol.* vol. 70, no 3, p. 319-331.
- Furusawa, S., S. Nakano, J. Wu, S. Sakaguchi, M. Takayanagi, K. I. Sasaki et S. Satoh. 2001. «Apoptosis induced by doxorubicin and cinchonine in P388 multidrug-resistant cells». *J Pharm Pharmacol.* vol. 53, no 7, p. 1029-1039.
- Gerl, R., et D. L. Vaux. 2005. «Apoptosis in the development and treatment of cancer». *Carcinogenesis.* vol. 26, no 2, p. 263-270.
- Gong, Y., Y. Wang, F. Chen, J. Han, J. Miao, N. Shao, Z. Fang et R. Ou Yang. 2000. «Identification of the subcellular localization of daunorubicin in multidrug-resistant K562 cell line». *Leuk Res.* vol. 24, no 9, p. 769-774.
- Gottesman, M. M., et I. Pastan. 1993. «Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter». *Annu Rev Biochem.* vol. 62, p. 385-427.
- Griffiths, Anthony J. F., et David T. Suzuki. 2002. *Introduction à l'analyse génétique ; traduction de la 7e édition américaine par Chrystelle Sanlaville ; révision scientifique de Denise Aragnol et Dominique Charmot*, 3e éd. Paris ; Bruxelles: DeBoeck, 860 p.
- Gross, A., X. M. Yin, K. Wang, M. C. Wei, J. Jockel, C. Milliman, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst et S. J. Korsmeyer. 1999. «Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death». *J Biol Chem.* vol. 274, no 2, p. 1156-1163.
- Gruber, B. M., E. L. Anuszewska, I. Bubko, A. Gozdzik, I. Fokt et W. Priebe. 2007. «Effect of structural modification at the 4, 3', and 2' positions of doxorubicin on topoisomerase II poisoning, apoptosis, and cytotoxicity in human melanoma cells». *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* vol. 55, no 3, p. 193-198.
- Guchelaar, H. J., A. Vermes, I. Vermes et C. Haanen. 1997. «Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy». *Pharm World Sci.* vol. 19, no 3, p. 119-125.
- Gupta, S. 2005. «Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging». *Immunol Rev.* vol. 205, p. 114-129.

- Hail, N., Jr., H. J. Kim et R. Lotan. 2006. «Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis». *Apoptosis*. vol. 11, no 10, p. 1677-1694.
- Hajdu, S. I. 2005. «2000 years of chemotherapy of tumors». *Cancer*. vol. 103, no 6, p. 1097-1102.
- Hande, K. R. 1998. «Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1400, no 1-3, p. 173-184.
- Harima, Y., K. Nagata, K. Harima, V. V. Ostapenko, Y. Tanaka et S. Sawada. 2001. «A randomized clinical trial of radiation therapy versus thermoradiotherapy in stage IIIB cervical carcinoma». *Int J Hyperthermia*. vol. 17, no 2, p. 97-105.
- Harper, D. M., E. L. Franco, C. Wheeler, D. G. Ferris, D. Jenkins, A. Schuind, T. Zahaf, B. Innis, P. Naud, N. S. De Carvalho, C. M. Roteli-Martins, J. Teixeira, M. M. Blatter, A. P. Korn, W. Quint et G. Dubin. 2004. «Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial». *Lancet*. vol. 364, no 9447, p. 1757-1765.
- Harper, D. M., E. L. Franco, C. M. Wheeler, A. B. Moscicki, B. Romanowski, C. M. Roteli-Martins, D. Jenkins, A. Schuind, S. A. Costa Clemens et G. Dubin. 2006. «Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial». *Lancet*. vol. 367, no 9518, p. 1247-1255.
- Haverkos, H., M. Rohrer et W. Pickworth. 2000. «The cause of invasive cervical cancer could be multifactorial». *Biomed Pharmacother*. vol. 54, no 1, p. 54-59.
- Haverkos, H. W. 2005. «Multifactorial etiology of cervical cancer: a hypothesis». *MedGenMed*. vol. 7, no 4, p. 57.
- Hennessy, M., et J. P. Spiers. 2007. «A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter». *Pharmacol Res*. vol. 55, no 1, p. 1-15.
- Herman, T. S., A. E. Cress, C. Sweets et E. W. Gerner. 1981. «Reversal of resistance to methotrexate by hyperthermia in Chinese hamster ovary cells». *Cancer Res*. vol. 41, no 10, p. 3840-3843.
- Hickman, J. A. 1992. «Apoptosis induced by anticancer drugs». *Cancer Metastasis Rev*. vol. 11, no 2, p. 121-139.
- Hildebrandt, B., P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix et H. Riess. 2002. «The cellular and molecular basis of hyperthermia». *Crit Rev Oncol Hematol*. vol. 43, no 1, p. 33-56.

- Hipfner, D. R., R. G. Deeley et S. P. Cole. 1999. «Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1461, no 2, p. 359-376.
- Hirose, M. 2002. «Biology and modulation of multidrug resistance (MDR) in hematological malignancies». *Int J Hematol*. vol. 76 Suppl 2, p. 206-211.
- Holland, James F., Emil Frei et Donald W. Kufe. 2003. *Holland, Frei cancer medicine 6*, 6e éd. Hamilton (Ont.): B C Decker, 2 vol 2699, 2640 p.
- Holzman, D. 1996. «Apoptosis provides new targets for chemotherapy». *J Natl Cancer Inst*. vol. 88, no 16, p. 1098-1100.
- Iarussi, D., P. Indolfi, F. Casale, P. Coppolino, M. A. Tedesco et M. T. Di Tullio. 2001. «Recent advances in the prevention of anthracycline cardiotoxicity in childhood». *Curr Med Chem*. vol. 8, no 13, p. 1649-1660.
- Igney, F. H., et P. H. Krammer. 2002. «Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis». *Nat Rev Cancer*. vol. 2, no 4, p. 277-288.
- Jeremias, I., K. Stahnke et K. M. Debatin. 2005. «CD95/Apo-1/Fas: independent cell death induced by doxorubicin in normal cultured cardiomyocytes». *Cancer Immunol Immunother*. vol. 54, no 7, p. 655-662.
- Jin, Z., et W. S. El-Deiry. 2005. «Overview of cell death signaling pathways». *Cancer Biol Ther*. vol. 4, no 2, p. 139-163.
- Jones, E. L., J. R. Oleson, L. R. Prosnitz, T. V. Samulski, Z. Vujaskovic, D. Yu, L. L. Sanders et M. W. Dewhirst. 2005. «Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors». *J Clin Oncol*. vol. 23, no 13, p. 3079-3085.
- Juliano, R. L., et V. Ling. 1976. «A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants». *Biochim Biophys Acta*. vol. 455, no 1, p. 152-162.
- Kampinga, H. H. 2006. «Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: a short introduction to newcomers in the field». *Int J Hyperthermia*. vol. 22, no 3, p. 191-196.
- Kast, C., et P. Gros. 1998. «Epitope insertion favors a six transmembrane domain model for the carboxy-terminal portion of the multidrug resistance-associated protein». *Biochemistry*. vol. 37, no 8, p. 2305-2313.
- Katsman, A., K. Umezawa et B. Bonavida. 2007. «Reversal of resistance to cytotoxic cancer therapies: DHMEQ as a chemo-sensitizing and immuno-sensitizing agent». *Drug Resist Updat*. vol. 10, no 1-2, p. 1-12.

- Kaufman, R. J. 1999. «Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls». *Genes Dev.* vol. 13, no 10, p. 1211-1233.
- Kawai, H., Y. Minamiya, M. Kitamura, I. Matsuzaki, M. Hashimoto, H. Suzuki et S. Abo. 1997. «Direct measurement of doxorubicin concentration in the intact, living single cancer cell during hyperthermia». *Cancer.* vol. 79, no 2, p. 214-219.
- Kawai, N., A. Ito, Y. Nakahara, M. Futakuchi, T. Shirai, H. Honda, T. Kobayashi et K. Kohri. 2005. «Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats». *Prostate.* vol. 64, no 4, p. 373-381.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie et A. R. Currie. 1972. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics». *Br J Cancer.* vol. 26, no 4, p. 239-257.
- Kesic, V. 2006. «Management of cervical cancer». *Eur J Surg Oncol.* vol. 32, no 8, p. 832-837.
- Kidd, V. J., J. M. Lahti et T. Teitz. 2000. «Proteolytic regulation of apoptosis». *Semin Cell Dev Biol.* vol. 11, no 3, p. 191-201.
- Kim, Y., A. G. Ma, K. Kitta, S. N. Fitch, T. Ikeda, Y. Ihara, A. R. Simon, T. Evans et Y. J. Suzuki. 2003. «Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis». *Mol Pharmacol.* vol. 63, no 2, p. 368-377.
- Kischkel, F. C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P. H. Kramer et M. E. Peter. 1995. «Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor». *Embo J.* vol. 14, no 22, p. 5579-5588.
- Klener, P., Jr., L. Andera, P. Klener, E. Necas et J. Zivny. 2006. «Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways». *Folia Biol (Praha).* vol. 52, no 1-2, p. 34-44.
- Klostergaard, J., M. E. Leroux, E. Auzenne, M. Khodadadian, W. Spohn, J. Y. Wu et N. J. Donato. 2006. «Hyperthermia engages the intrinsic apoptotic pathway by enhancing upstream caspase activation to overcome apoptotic resistance in MCF-7 breast adenocarcinoma cells». *J Cell Biochem.* vol. 98, no 2, p. 356-369.
- Kluck, R. M., E. Bossy-Wetzel, D. R. Green et D. D. Newmeyer. 1997. «The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis». *Science.* vol. 275, no 5303, p. 1132-1136.

- Koivusalo, R., E. Krausz, H. Helenius et S. Hietanen. 2005. «Chemotherapy compounds in cervical cancer cells primed by reconstitution of p53 function after short interfering RNA-mediated degradation of human papillomavirus 18 E6 mRNA: opposite effect of siRNA in combination with different drugs». *Mol Pharmacol.* vol. 68, no 2, p. 372-382.
- Korsmeyer, S. J. 1992. «Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death». *Blood.* vol. 80, no 4, p. 879-886.
- Krishan, A. 1975. «Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining». *J Cell Biol.* vol. 66, no 1, p. 188-193.
- Labanauskiene, J., J. Didziapetriene et E. Aleknavicius. 2006. «The role of electroporation in increasing the effectiveness of anticancer drugs». *Medicina (Kaunas).* vol. 42, no 1, p. 33-37.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4». *Nature.* vol. 227, no 5259, p. 680-685.
- Lancet. 2006. «Who should be vaccinated against human papillomavirus?». *Lancet Infect Dis.* vol. 6, no 1, p. 1.
- Larrivé, B., et D. A. Averill. 2000. «Modulation of adriamycin cytotoxicity and transport in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells by hyperthermia and cyclosporin A». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 45, no 3, p. 219-230.
- Lawen, A. 2003. «Apoptosis-an introduction». *Bioessays.* vol. 25, no 9, p. 888-896.
- Lefrak E.A., J. Pitha, S. Rosenheim et J.A.Gottlieb. 1973. «A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity». *Cancer.* vol. 32, no 2, p. 302-314.
- Leng, W. D., D. Z. Wang, G. Feng et J. He. 2006. «Effect of hyperthermia on multidrug resistance of tongue squamous cell carcinoma cell line (Tca8113) and its multidrug resistance cell line Tca8113/CBDEA». *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* vol. 24, no 5, p. 447-450.
- Lepock, J. R. 2005. «How do cells respond to their thermal environment?». *Int J Hyperthermia.* vol. 21, no 8, p. 681-687.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley et S. P. Cole. 2001. «Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters». *Toxicology.* vol. 167, no 1, p. 3-23.

- Leslie, E. M., R. G. Deeley et S. P. Cole. 2005. «Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense». *Toxicol Appl Pharmacol.* vol. 204, no 3, p. 216-237.
- Levi, F. 2001. «Circadian chronotherapy for human cancers». *Lancet Oncol.* vol. 2, no 5, p. 307-315.
- Levi, F. 2006. «Chronotherapeutics: the relevance of timing in cancer therapy». *Cancer Causes Control.* vol. 17, no 4, p. 611-621.
- Li, H., H. Zhu, C. J. Xu et J. Yuan. 1998. «Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis». *Cell.* vol. 94, no 4, p. 491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri et X. Wang. 1997. «Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade». *Cell.* vol. 91, no 4, p. 479-489.
- Lim, C. U., Y. Zhang et M. H. Fox. 2006. «Cell cycle dependent apoptosis and cell cycle blocks induced by hyperthermia in HL-60 cells». *Int J Hyperthermia.* vol. 22, no 1, p. 77-91.
- Ling, V. 1997. «Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 40 Suppl, p. S3-8.
- Ling, Y. H., A. K. el-Naggar, W. Priebe et R. Perez-Soler. 1996. «Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells». *Mol Pharmacol.* vol. 49, no 5, p. 832-841.
- Liu, Y., C. W. Cho, X. Yan, T. K. Henthorn, K. O. Lillehei, W. N. Cobb et K. Y. Ng. 2001. «Ultrasound-Induced hyperthermia increases cellular uptake and cytotoxicity of P-glycoprotein substrates in multi-drug resistant cells». *Pharm Res.* vol. 18, no 9, p. 1255-1261.
- Liu, Y., K. Lillehei, W. N. Cobb, U. Christians et K. Y. Ng. 2001. «Overcoming MDR by ultrasound-induced hyperthermia and P-glycoprotein modulation». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 289, no 1, p. 62-68.
- Lockhart, A. C., R. G. Tirona et R. B. Kim. 2003. «Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy». *Mol Cancer Ther.* vol. 2, no 7, p. 685-698.
- Lodish, Harvey F. 2000. *Molecular cell biology*, 4^{éd}. New York: W.H. Freeman, 1053 p.

- Longo, R., R. Sarmiento, M. Fanelli, B. Capaccetti, D. Gattuso et G. Gasparini. 2002. «Anti-angiogenic therapy: rationale, challenges and clinical studies». *Angiogenesis*. vol. 5, no 4, p. 237-256.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter et X. Wang. 1998. «Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors». *Cell*. vol. 94, no 4, p. 481-490.
- Madesh, M., et G. Hajnoczky. 2001. «VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release». *J Cell Biol*. vol. 155, no 6, p. 1003-1015.
- Mandell, G.L., J.E. Bennett et R. Dolin. 2004. *Principles and Practice of Infectious Diseases* 2t., 6éd. Coll. «Principles and Practice of », no 1: London : Churchill Livingstone, 4000 p.
- Meschini, S., A. Calcabrini, E. Monti, D. Del Bufalo, A. Stringaro, E. Dolfini et G. Arancia. 2000. «Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells». *Int J Cancer*. vol. 87, no 5, p. 615-628.
- Miller, R. C., M. Richards, C. Baird, S. Martin et E. J. Hall. 1994. «Interaction of hyperthermia and chemotherapy agents; cell lethality and oncogenic potential». *Int J Hyperthermia*. vol. 10, no 1, p. 89-99.
- Minotti, G., P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo et L. Gianni. 2004. «Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity». *Pharmacol Rev*. vol. 56, no 2, p. 185-229.
- Minow, R. A., R. S. Benjamin, E. T. Lee et J. A. Gottlieb. 1977. «Adriamycin cardiomyopathy-risk factors». *Cancer*. vol. 39, no 4, p. 1397-1402.
- Mir, L. M., N. Morsli, J. R. Garbay, V. Billard, C. Robert et M. Marty. 2003. «Electrochemotherapy: a new treatment of solid tumors». *J Exp Clin Cancer Res*. vol. 22, no 4 Suppl, p. 145-148.
- Miyashita, T., et J. C. Reed. 1993. «Bcl-2 oncoprotein blocks chemotherapy-induced apoptosis in a human leukemia cell line». *Blood*. vol. 81, no 1, p. 151-157.
- Mizutani, H., S. Tada-Oikawa, Y. Hiraku, M. Kojima et S. Kawanishi. 2005. «Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide». *Life Sci*. vol. 76, no 13, p. 1439-1453.
- Mizutani, Y., Y. Okada, O. Yoshida, M. Fukumoto et B. Bonavida. 1997. «Doxorubicin sensitizes human bladder carcinoma cells to Fas-mediated cytotoxicity». *Cancer*. vol. 79, no 6, p. 1180-1189.

- Mohan, R., H. J. Hammers, P. Bargagna-Mohan, X. H. Zhan, C. J. Herbstritt, A. Ruiz, L. Zhang, A. D. Hanson, B. P. Conner, J. Rougas et V. S. Pribluda. 2004. «Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis». *Angiogenesis*. vol. 7, no 2, p. 115-122.
- Mollinedo, F., et C. Gajate. 2006. «Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy». *Drug Resist Updat*. vol. 9, no 1-2, p. 51-73.
- Momoi, T. 2004. «Caspases involved in ER stress-mediated cell death». *J Chem Neuroanat*. vol. 28, no 1-2, p. 101-105.
- Morin, Yves, Gérard Amarenco et Jacques Barbaut. 2000. *Larousse médical*, 2e éd. Paris: Larousse-Bordas, 1212 p.
- Mormont, M. C., et F. Levi. 2003. «Cancer chronotherapy: principles, applications, and perspectives». *Cancer*. vol. 97, no 1, p. 155-169.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, F. C. Kischkel, K. O'Rourke, A. Shevchenko, J. Ni, C. Scaffidi, J. D. Bretz, M. Zhang, R. Gentz, M. Mann, P. H. Krammer, M. E. Peter et V. M. Dixit. 1996. «FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex». *Cell*. vol. 85, no 6, p. 817-827.
- Nagata, S. 1999. «Fas ligand-induced apoptosis». *Annu Rev Genet*. vol. 33, p. 29-55.
- Nagata, S. 2000. «Apoptotic DNA fragmentation». *Exp Cell Res*. vol. 256, no 1, p. 12-18.
- Navarro, R., I. Busnadiego, M. B. Ruiz-Larrea et J. I. Ruiz-Sanz. 2006. «Superoxide anions are involved in doxorubicin-induced ERK activation in hepatocyte cultures». *Ann N Y Acad Sci*. vol. 1090, p. 419-428.
- Nestle, F. O., S. Aljagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg et D. Schadendorf. 1998. «Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells». *Nat Med*. vol. 4, no 3, p. 328-332.
- Nooter, K., et G. Stoter. 1996. «Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy». *Pathol Res Pract*. vol. 192, no 7, p. 768-780.
- O'Connell, J., M. W. Bennett, G. C. O'Sullivan, J. K. Collins et F. Shanahan. 1999. «The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege». *Immunol Today*. vol. 20, no 1, p. 46-52.
- Orrenius, S., V. Gogvadze et B. Zhivotovsky. 2007. «Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death». *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. vol. 47, p. 143-183.

- Ostberg, J. R., et E. A. Repasky. 2006. «Emerging evidence indicates that physiologically relevant thermal stress regulates dendritic cell function». *Cancer Immunol Immunother.* vol. 55, no 3, p. 292-298.
- Ozoren, N., et W. S. El-Deiry. 2003. «Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells». *Semin Cancer Biol.* vol. 13, no 2, p. 135-147.
- Pandya, N. M., N. S. Dhalla et D. D. Santani. 2006. «Angiogenesis-a new target for future therapy». *Vascul Pharmacol.* vol. 44, no 5, p. 265-274.
- Paroni, R., A. Salonia, A. Lev, L. F. Da Pozzo, G. Cighetti, F. Montorsi, P. Rigatti et R. Colombo. 2001. «Effect of local hyperthermia of the bladder on mitomycin C pharmacokinetics during intravesical chemotherapy for the treatment of superficial transitional cell carcinoma». *Br J Clin Pharmacol.* vol. 52, no 3, p. 273-278.
- Partridge, J. M., et L. A. Koutsky. 2006. «Genital human papillomavirus infection in men». *Lancet Infect Dis.* vol. 6, no 1, p. 21-31.
- Petak, I., et J. A. Houghton. 2001. «Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy». *Pathol Oncol Res.* vol. 7, no 2, p. 95-106.
- Philchenkov, A. 2004. «Caspases: potential targets for regulating cell death». *J Cell Mol Med.* vol. 8, no 4, p. 432-444.
- Potter, A. J., K. A. Gollahon, B. J. Palanca, M. J. Harbert, Y. M. Choi, A. H. Moskovitz, J. D. Potter et P. S. Rabinovitch. 2002. «Flow cytometric analysis of the cell cycle phase specificity of DNA damage induced by radiation, hydrogen peroxide and doxorubicin». *Carcinogenesis.* vol. 23, no 3, p. 389-401.
- Potter, A. J., et P. S. Rabinovitch. 2005. «The cell cycle phases of DNA damage and repair initiated by topoisomerase II-targeting chemotherapeutic drugs». *Mutat Res.* vol. 572, no 1-2, p. 27-44.
- Qian, J., W. Chen, M. Lettau, G. Podda, M. Zornig, D. Kabelitz et O. Janssen. 2006. «Regulation of FasL expression: a SH3 domain containing protein family involved in the lysosomal association of FasL». *Cell Signal.* vol. 18, no 8, p. 1327-1337.
- Raaphorst, G. P., S. Doja, L. Davis, D. Stewart et C. E. Ng. 1996. «A comparison of hyperthermia cisplatin sensitization in human ovarian carcinoma and glioma cell lines sensitive and resistant to cisplatin treatment». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 37, no 6, p. 574-580.
- Rajagopal, A., A. C. Pant, S. M. Simon et Y. Chen. 2002. «In vivo analysis of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) activity using transient expression of fluorescently tagged MRP1». *Cancer Res.* vol. 62, no 2, p. 391-396.

- Ren, G. X., W. Guo, D. X. Ye, G. F. Shen, J. F. Bai, S. J. Li et Y. Z. Chen. 2006. «A study on the mechanism of inducing apoptosis of Tca8113 cells by means of ultrasound hyperthermia». *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*. vol. 15, no 5, p. 507-511.
- Reyes, J., E. G. de Vries, P. L. Jansen et M. Muller. 2000. «The (patho)physiological functions of the MRP family». *Drug Resist Updat*. vol. 3, no 5, p. 289-302.
- Reyes, J., E. G. de Vries, E. F. Nienhuis, P. L. Jansen et M. Muller. 1999. «ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1». *Br J Pharmacol*. vol. 126, no 3, p. 681-688.
- Rietbroek, R. C., M. S. Schilthuis, J. van der Zee et D. Gonzalez Gonzalez. 1999. «Hyperthermia in combination with chemotherapy in gynecological cancers». *Ned Tijdschr Geneesk*. vol. 143, no 2, p. 85-88.
- Roti Roti, J. L. 2007. «Heat-induced alterations of nuclear protein associations and their effects on DNA repair and replication». *Int J Hyperthermia*. vol. 23, no 1, p. 3-15.
- Russo, A., M. Terrasi, V. Agnese, D. Santini et V. Bazan. 2006. «Apoptosis: a relevant tool for anticancer therapy». *Ann Oncol*. vol. 17 Suppl 7, p. vii115-vii123.
- Rutkowski, D. T., et R. J. Kaufman. 2004. «A trip to the ER: coping with stress». *Trends Cell Biol*. vol. 14, no 1, p. 20-28.
- Ryu, S., S. L. Brown, S. H. Kim, M. S. Khil et J. H. Kim. 1996. «Preferential radiosensitization of human prostatic carcinoma cells by mild hyperthermia». *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. vol. 34, no 1, p. 133-138.
- Salo, D. C., C. M. Donovan et K. J. Davies. 1991. «HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise». *Free Radic Biol Med*. vol. 11, no 3, p. 239-246.
- Satkauskas, S., D. Batiuskaite, S. Salomskaite-Davalgijene et M. S. Venslauskas. 2005. «Effectiveness of tumor electrochemotherapy as a function of electric pulse strength and duration». *Bioelectrochemistry*. vol. 65, no 2, p. 105-111.
- Schem, B. C., O. Mella et O. Dahl. 1989. «Potentiation of combined BCNU and hyperthermia by pH reduction in vitro and hypertonic glucose in vivo in the BT4 rat glioma». *Int J Hyperthermia*. vol. 5, no 6, p. 707-715.
- Schlaerth, A. C., et N. R. Abu-Rustum. 2006. «Role of minimally invasive surgery in gynecologic cancers». *Oncologist*. vol. 11, no 8, p. 895-901.
- Schnurr, M., P. Galambos, C. Scholz, F. Then, M. Dauer, S. Endres et A. Eigler. 2001. «Tumor cell lysate-pulsed human dendritic cells induce a T-cell response against

- pancreatic carcinoma cells: an in vitro model for the assessment of tumor vaccines». *Cancer Res.* vol. 61, no 17, p. 6445-6450.
- Schroder, M., et R. J. Kaufman. 2005. «ER stress and the unfolded protein response». *Mutat Res.* vol. 569, no 1-2, p. 29-63.
- Schultz, D. R., et W. J. Harrington, Jr. 2003. «Apoptosis: programmed cell death at a molecular level». *Semin Arthritis Rheum.* vol. 32, no 6, p. 345-369.
- Segal-Bendirdjian, E., C. Dudognon, J. Mathieu, J. Hillion et F. Besancon. 2005. «Cell death signalling: recent advances and therapeutic application». *Bull Cancer.* vol. 92, no 1, p. 23-35.
- Seong, Y. M., J. Y. Choi, H. J. Park, K. J. Kim, S. G. Ahn, G. H. Seong, I. K. Kim, S. Kang et H. Rhim. 2004. «Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP». *J Biol Chem.* vol. 279, no 36, p. 37588-37596.
- Shapiro, A. B., et V. Ling. 1995. «Using purified P-glycoprotein to understand multidrug resistance». *J Bioenerg Biomembr.* vol. 27, no 1, p. 7-13.
- Sharma, K., R. X. Wang, L. Y. Zhang, D. L. Yin, X. Y. Luo, J. C. Solomon, R. F. Jiang, K. Markos, W. Davidson, D. W. Scott et Y. F. Shi. 2000. «Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand». *Pharmacol Ther.* vol. 88, no 3, p. 333-347.
- Shi, Y. 2006. «Mechanical aspects of apoptosome assembly». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 18, no 6, p. 677-684.
- Shustik, C., W. Dalton et P. Gros. 1995. «P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation». *Mol Aspects Med.* vol. 16, no 1, p. 1-78.
- Simon, P., et I. Dupond. 2006. «Anti-HPV vaccination: preventing cervical cancer». *Rev Med Brux.* vol. 27, no 4, p. S338-340.
- Singal, P. K., N. Iliskovic, T. Li et D. Kumar. 1997. «Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention». *Faseb J.* vol. 11, no 12, p. 931-936.
- Singal, P. K., T. Li, D. Kumar, I. Danelisen et N. Iliskovic. 2000. «Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation». *Mol Cell Biochem.* vol. 207, no 1-2, p. 77-86.
- Société canadienne du cancer. 2006. «Statistiques canadiennes sur le cancer 2006». Société canadienne du cancer. En ligne. <http://dsp-psd.tpsgc.gc.ca/Collection/CS2-37-2006F.pdf>.

- Solazzo, M., O. Fantappie, N. Lasagna, C. Sassoli, D. Nosi et R. Mazzanti. 2006. «P-gp localization in mitochondria and its functional characterization in multiple drug-resistant cell lines». *Exp Cell Res.* vol. 312, no 20, p. 4070-4078.
- Souslova, T., et D. A. Averill-Bates. 2004. «Multidrug-resistant hela cells overexpressing MRP1 exhibit sensitivity to cell killing by hyperthermia: interactions with etoposide». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 60, no 5, p. 1538-1551.
- Sreenivasa, G., B. Hildebrandt, S. Kummel, K. Jungnickel, C. H. Cho, W. Tilly, D. Bohmer, V. Budach, R. Felix et P. Wust. 2006. «Radiochemotherapy combined with regional pelvic hyperthermia induces high response and resectability rates in patients with nonresectable cervical cancer > or =FIGO IIB "bulky"». *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* vol. 66, no 4, p. 1159-1167.
- Stefkova, J., R. Poledne et J. A. Hubacek. 2004. «ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases». *Physiol Res.* vol. 53, no 3, p. 235-243.
- Steinbrook, R. 2006. «The potential of human papillomavirus vaccines». *N Engl J Med.* vol. 354, no 11, p. 1109-1112.
- Stride, B. D., S. P. Cole et R. G. Deeley. 1999. «Localization of a substrate specificity domain in the multidrug resistance protein». *J Biol Chem.* vol. 274, no 32, p. 22877-22883.
- Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein et S. Nagata. 1993. «Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family». *Cell.* vol. 75, no 6, p. 1169-1178.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, A. M. Gorman et A. Samali. 2006. «Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis». *EMBO Rep.* vol. 7, no 9, p. 880-885.
- Takemura, G., et H. Fujiwara. 2007. «Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management». *Prog Cardiovasc Dis.* vol. 49, no 5, p. 330-352.
- Tanel, A., et D. A. Averill-Bates. 2007. «Activation of the death receptor pathway of apoptosis by the aldehyde acrolein». *Free Radic Biol Med.* vol. 42, no 6, p. 798-810.
- Tannock, Ian, et Richard P. Hill. 1998. *The basic science of oncology*, 3^{ed}. New York: McGraw-Hill Health Professions Division, 539 p.
- Thornberry, N. A. 1998. «Caspases: key mediators of apoptosis». *Chem Biol.* vol. 5, no 5, p. R97-103.

- Tsang, W. P., S. P. Chau, S. K. Kong, K. P. Fung et T. T. Kwok. 2003. «Reactive oxygen species mediate doxorubicin induced p53-independent apoptosis». *Life Sci.* vol. 73, no 16, p. 2047-2058.
- Tsuruo, T., M. Naito, A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto et N. Haga. 2003. «Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal». *Cancer Sci.* vol. 94, no 1, p. 15-21.
- Turcotte, S., et D. A. Averill-Bates. 2001. «Sensitization to the cytotoxicity of melphalan by ethacrynic acid and hyperthermia in drug-sensitive and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells». *Radiat Res.* vol. 156, no 3, p. 272-282.
- van Bladeren, P. J. 2000. «Glutathione conjugation as a bioactivation reaction». *Chem Biol Interact.* vol. 129, no 1-2, p. 61-76.
- van der Zee, J. 2002. «Heating the patient: a promising approach?». *Ann Oncol.* vol. 13, no 8, p. 1173-1184.
- Verheul, H. M., D. Z. Qian, M. A. Carducci et R. Pili. 2007. «Sequence-dependent antitumor effects of differentiation agents in combination with cell cycle-dependent cytotoxic drugs». *Cancer Chemother Pharmacol.* vol. 60, no 3, p. 329-339.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele et Z. N. Berneman. 2005. «Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer». *Ann Hematol.* vol. 84, no 10, p. 627-639.
- Vertrees, R. A., G. C. Das, A. M. Coscio, J. Xie, J. B. Zwischenberger et P. J. Boor. 2005. «A mechanism of hyperthermia-induced apoptosis in ras-transformed lung cells». *Mol Carcinog.* vol. 44, no 2, p. 111-121.
- Vertrees, R. A., G. C. Das, V. L. Popov, A. M. Coscio, T. J. Goodwin, R. Logrono, J. B. Zwischenberger et P. J. Boor. 2005. «Synergistic interaction of hyperthermia and Gemcitabine in lung cancer». *Cancer Biol Ther.* vol. 4, no 10, p. 1144-1153.
- Von Hoff, D. D., M. W. Layard, P. Basa, H. L. Davis, Jr., A. L. Von Hoff, M. Rozenzweig et F. M. Muggia. 1979. «Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure». *Ann Intern Med.* vol. 91, no 5, p. 710-717.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick et N. J. Gay. 1982. «Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold». *Embo J.* vol. 1, no 8, p. 945-951.
- Wang, K., X. M. Yin, D. T. Chao, C. L. Milliman et S. J. Korsmeyer. 1996. «BID: a novel BH3 domain-only death agonist». *Genes Dev.* vol. 10, no 22, p. 2859-2869.

- Wang, Z. B., Y. Q. Liu et Y. F. Cui. 2005. «Pathways to caspase activation». *Cell Biol Int.* vol. 29, no 7, p. 489-496.
- Westermann, A. M., E. L. Jones, B. C. Schem, E. M. van der Steen-Banasik, P. Koper, O. Mella, A. L. Uitterhoeve, R. de Wit, J. van der Velden, C. Burger, C. L. van der Wilt, O. Dahl, L. R. Prosnitz et J. van der Zee. 2005. «First results of triple-modality treatment combining radiotherapy, chemotherapy, and hyperthermia for the treatment of patients with stage IIB, III, and IVA cervical carcinoma». *Cancer.* vol. 104, no 4, p. 763-770.
- Westphal, S., et H. Kalthoff. 2003. «Apoptosis: targets in pancreatic cancer». *Mol Cancer.* vol. 2, p. 6.
- Wheater, Paul R., Barbara Young et John W. Heath. 2001. *Histologie fonctionnelle*, 1^{éd.} Paris: De Boeck Université, 413 p.
- Wiley, D. J., E. Wiesmeier, E. Masongsong, K. H. Gylys, L. A. Koutsky, D. G. Ferris, E. Barr et J. Yu Rao. 2006. «Smokers at higher risk for undetected antibody for oncogenic human papillomavirus type 16 infection». *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* vol. 15, no 5, p. 915-920.
- Wilson, W. H. 2006. «Drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma». *Semin Hematol.* vol. 43, no 4, p. 230-239.
- Woo, J., G. N. Chiu, G. Karlsson, E. Wasan, L. Ickenstein, K. Edwards et M. B. Bally. 2008. «Use of a passive equilibration methodology to encapsulate cisplatin into preformed thermosensitive liposomes». *Int J Pharm.* vol. 349, no 1-2, p. 38-46.
- Wu, L., R. J. McGough, O. A. Arabe et T. V. Samulski. 2006. «An RF phased array applicator designed for hyperthermia breast cancer treatments». *Phys Med Biol.* vol. 51, no 1, p. 1-20.
- Wust, P., U. Gneveckow, M. Johannsen, D. Bohmer, T. Henkel, F. Kahmann, J. Sehouli, R. Felix, J. Rieke et A. Jordan. 2006. «Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy-feasibility, tolerance and achieved temperatures». *Int J Hyperthermia.* vol. 22, no 8, p. 673-685.
- Wust, P., B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix et P. M. Schlag. 2002. «Hyperthermia in combined treatment of cancer». *Lancet Oncol.* vol. 3, no 8, p. 487-497.
- Xu, C., B. Bailly-Maitre et J. C. Reed. 2005. «Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions». *J Clin Invest.* vol. 115, no 10, p. 2656-2664.

- Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C. N. Kim, A. M. Ibrado, J. Cai, T. I. Peng, D. P. Jones et X. Wang. 1997. «Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked». *Science*. vol. 275, no 5303, p. 1129-1132.
- Yang, K., B. Yue et Z. Wang. 2004. «Progress in electrochemotherapy». *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. vol. 21, no 6, p. 1043-1046.
- Yokoyama, G., T. Fujii, E. Ogo, H. Yanaga, U. Toh, M. Yamaguchi, M. Mishima, S. Takamori, K. Shirouzu et H. Yamana. 2005. «Advanced chemoresistant breast cancer responding to multidisciplinary treatment with hyperthermia, radiotherapy, and intraarterial infusion». *Int J Clin Oncol*. vol. 10, no 2, p. 139-143.
- Yoo, J., H. R. Kim et Y. J. Lee. 2006. «Hyperthermia enhances tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human cancer cells». *Int J Hyperthermia*. vol. 22, no 8, p. 713-728.
- Yuan, J., S. Shaham, S. Ledoux, H. M. Ellis et H. R. Horvitz. 1993. «The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme». *Cell*. vol. 75, no 4, p. 641-652.
- Zaman, G. J., M. J. Flens, M. R. van Leusden, M. de Haas, H. S. Mulder, J. Lankelma, H. M. Pinedo, R. J. Scheper, F. Baas, H. J. Broxterman et al. 1994. «The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 91, no 19, p. 8822-8826.
- Zhang, L., Y. Yang, X. Y. Wei, Y. R. Shi, H. Y. Liu, R. F. Niu et X. S. Hao. 2007. «Reversing adriamycin resistance of human breast cancer cells by hyperthermia combined with Interferon alpha and Verapamil». *J Exp Clin Cancer Res*. vol. 26, no 2, p. 201-207.
- Zhang, P., D. Wang et G. Zheng. 2003. «Reversal effect of hyperthermia on multidrug resistant phenomena». *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. vol. 21, no 2, p. 127-129.
- Zhivotovsky, B., et S. Orrenius. 2006. «Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes». *Carcinogenesis*. vol. 27, no 10, p. 1939-1945.
- Zou, H., Y. Li, X. Liu et X. Wang. 1999. «An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9». *J Biol Chem*. vol. 274, no 17, p. 11549-11556.