



COUPLAGE DE PEPTIDES DE PENETRATION CELLULAIRE A UN AGENT ANTI-TUMORAL ET EVALUATION DE L'EFFICACITE DES COMPLEXES

Sonia Aroui

► To cite this version:

Sonia Aroui. COUPLAGE DE PEPTIDES DE PENETRATION CELLULAIRE A UN AGENT ANTI-TUMORAL ET EVALUATION DE L'EFFICACITE DES COMPLEXES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00584436

HAL Id: tel-00584436

<https://theses.hal.science/tel-00584436>

Submitted on 8 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



REPUBLIQUE TUNISIENNE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MONASTIR

INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR

Ecole Doctorale : Sciences Biologiques, Biotechnologie et Santé

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de :

Doctorat en cotutelle

Spécialités:

Sciences Biologiques et Biotechnologie

Par :

Sonia AROUI Ep. KALLALA

Sujet : COUPLAGE DE PEPTIDES DE PENETRATION CELLULAIRE A UN
AGENT ANTI-TUMORAL ET EVALUATION DE L'EFFICACITE DES
COMPLEXES

Soutenu le : 21 Janvier 2010, devant le jury composé de :

Pr. Ahmed Salaheddine MASMOUDI

Pr. Ali GARGOURI

Dr. Jean Marc SABATIER

Dr. Jacqueline BREARD

Pr. Abderraouf KENANI

Dr. Michel DE WAARD

Président

Rapporteur

Rapporteur

Membre

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Ce travail a été conçu et réalisé à l'Unité de recherche « Mécanismes Moléculaires et Pathologies 05/UR/09-09 » de la Faculté de Médecine de Monastir sous la direction du Professeur Abderraouf KENANI, au laboratoire « INSERM U836, Canaux calciques, Fonctions et Pathologie » à Grenoble sous la direction du Docteur Michel DE WAARD et au laboratoire « INSERM U749, Signalisation dans la prolifération cellulaire et l'apoptose » de la Faculté de Pharmacie à Chatenay-Malabry sous la direction du Docteur Jacqueline BREARD

« *Patience et longueur du temps font plus que force ni que rage* »

Proverbe français

A la mémoire de mon regretté père, ABDELHAMID AROUI, je te dois le peu que je suis, tu as toujours consolidé mes pats et tu m'as encouragé sans relâche dans mes études et particulièrement dans cette dernière aventure, qu'est la thèse, mais, tu es parti sans que je termine à bout... Si je suis arrivé c'est bien grâce à toi, mon cher. J'espère que tu es fière de ta fille là où tu es...

*A toi maman, pour le soutien et l'énergie apporté
A mon époux Ali et mon petit Mouhamed Dhiaa, pour avoir accepté et supporté tant de sacrifices durant ces dernières années. Grâce à toi Ali, j'ai gardé confiance en moi dans les moments de doute.*

*A mes frères Mouhamed Ali et Khaled,
A mes sœurs Asma, Imen et Kaoula,
A mon beau père et ma belle mère,
A mes beaux frères et belles sœurs,*

A toute ma famille,

Je vous aime tous

Recevez ce mémoire en guise de remerciement et témoignage de mon amour

REMERCIEMENTS

Voici donc le moment tant attendu des remerciements... Après quatre années de thèse où se sont alternés « des hauts » et « des bas », il est temps pour moi de dire haut et fort: « La recherche, c'est les sacrifices, c'est la patience! »

J'ai eu la chance d'avoir été accueilli dans trois laboratoires durant cette thèse, et d'avoir côtoyé des chercheurs de différents horizons qui m'ont énormément appris, tant sur le plan scientifique, que sur le plan humain. A moi à présent de remercier toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou de loin, à obtenir les résultats présentés dans ce manuscrit. J'espère ne pas en oublier !!!

Je tiens tout d'abord à exprimer tous mes remerciements à mon Directeur de thèse Monsieur Abderraouf KENANI, Professeur de Biochimie et de Biologie Moléculaire à la Faculté de Médecine de Monastir, et Directeur de l'Unité de recherche «Mécanismes Moléculaires et Pathologies» 05/UR/09-09. Son soutien, ses conseils, ses encouragements ainsi que sa gentillesse m'ont particulièrement aidé durant ces quatre années de thèse. Qu'il trouve dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Je remercie également mon directeur de thèse, le Docteur Michel DE WAARD, directeur du laboratoire INSERM U836, « Canaux calciques, Fonctions et Pathologie », à Grenoble pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je lui suis très reconnaissante d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de la première partie de ma thèse. Merci pour son soutien et ses conseils.

Je suis très reconnaissante envers le Professeur Ali GARGOURI et le Docteur Jean-Marc SABATIER, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail.

Je suis honorée que le Professeur Ahmed Salaheddine MASMOUDI, Professeur de Biochimie à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir (ISBM), préside le jury de cette thèse. Je lui exprime mes plus vifs remerciements.

Je souhaite remercier tous les membres présents et passés de l'unité U836 et particulièrement ceux qui ont participé à ma formation dans « mes débuts » : Michel RONJAT et Xavier ALTFAJ pour leur aides à la réalisation du couplage des peptides de pénétrations cellulaires à la doxorubicine, Florence APPAIX pour m'avoir familiarisée avec la FPLC, Sylvie BOISSEAU et Narendra RAM pour la culture cellulaire, l'utilisation de la microscopie confocale et les réglages du FACS, Fabienne PIRROLET pour son aide.

Les travaux présentés n'auraient pu aboutir sans la collaboration du laboratoire INSERM U749 «Signalisation dans la prolifération cellulaire et l'apoptose» de la Faculté de Pharmacie à Chatenay-Malabry. Je remercie le Docteur Jacques BERTOGLIO, Directeur de cette équipe pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Un grand merci au Dr Jacqueline BREARD pour m'avoir encadrée lors de mon stage effectué dans cette équipe. Sa

grande gentillesse, sa bonne humeur, sa disponibilité ainsi que les nombreuses discussions que nous avons eues m'ont beaucoup apportées et fait avancer durant mon travail de recherche. Je suis très heureuse que vous contribuez au jury de ma thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble du laboratoire U749 et un merci tout particulier au Docteur Jocelyne HAMELIN. Leur sérieux, leur gentillesse et leur gaieté ont fait de mon stage avec eux un réel plaisir.

Je souhaite remercier vivement le Dr Ali BETTAIEB pour sa gentillesse et pour les suggestions et les remarques qu'il m'a fournies pour l'avancement de la partie apoptose de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Abdelfettah ZAKHAMA, Chef du service d'anatomie et cytologie pathologiques à l'hôpital Fattouma-Bourguiba de Monastir, pour m'avoir permis d'accéder à la microscopie de fluorescence.

Je remercie Monsieur le Professeur Mahjoub AOUNI, directeur du laboratoire des « maladies transmissibles et substances biologiquement actives » de la faculté de Pharmacie de Monastir, pour m'avoir mis à ma disposition le FACS.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Abdelkarim ZBIDI, Doyen de la faculté de Médecine de Sousse pour m'avoir aidé à des occasions multiples.

Je remercie Madame Souhir BRAHIM pour son amitié et son aide durant les deux dernières années de ma thèse.

Je souhaite remercier Monsieur Mohamed SIOUD, chef de l'agence siège Tunisair de Tunis ainsi que Monsieur Hammadi NASRI, chef de l'agence Tunisair de Monastir pour leur gentillesse et les services qu'ils m'ont rendu.

Enfin, je remercie vivement les membres de l'équipe 05-UR-09-09, Mahmoud, Donia, Kaouthar et Manel pour leur amitié, je leur souhaite une bonne chance dans leurs travaux.

Je remercie notre Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Technologie et l'Université de Monastir pour le support financier de mes stages en France.

Enfin merci à l'ISBM, à l'Université de Monastir, à la faculté de Médecine de Monastir, à l'EDISCE et à l'UJF pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse.

Meri à tous ceux qui ne sont pas là aujourd'hui pour partager ce moment avec moi.

Résumé

Le transport de substances dotées de propriétés pharmacologiques au travers de la membrane plasmique ainsi que leur accès aux divers compartiments intracellulaires, en particulier le compartiment cytoplasmique et nucléaire, demeure un obstacle pour la recherche biotechnologique et biomédicale et pour l'industrie pharmaceutique. Parmi les moyens actuellement connus pour introduire des substances dans les cellules, les peptides de translocation également dénommés CPPs (Cell- Penetrating-Peptides) qui représentent des vecteurs particulièrement intéressants. Dans le présent travail, nous avons utilisé trois CPPs, Tat, pénétratine et un analogue de la maurocalcine (MCA_{Abu}) pour la délivrance de la doxorubicine (Dox), une drogue utilisée en chimiothérapie anticancéreuse et dont son effet est limité par la résistance des cellules tumorales. Afin d'évaluer l'efficacité des trois complexes formés (Dox-CPPs), deux modèles cellulaires du cancer mammaire ont été utilisés; les cellules MDA-MB 231 et les cellules MCF7 qui présentent une sensibilité différente à la drogue seule.

Notre étude nous a permis de montrer en premier lieu que les trois CPPs utilisés représentent de puissants vecteurs pour l'entrée de la Dox à l'intérieur des cellules et que la conjugaison de la drogue a contourné la résistance des cellules MDA-MB 231 à la Dox. Nous avons également montré que la distribution de la Dox est plutôt nucléaire à l'état libre et cytoplasmique lorsqu'elle est couplée aux CPPs. Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons montré que la Dox ainsi que les Dox-CPPs induisent l'apoptose des cellules MDA-MB 231 et que cet effet est observé en traitant les cellules avec une dose cinq fois plus faible de Dox-CPPs par rapport à la Dox. Cette mort est dépendante des caspases et implique la voie mitochondriale. De plus, l'apoptose induite par la Dox est médiée par les radicaux oxygénés (ROS). Ceux-ci sont en partie impliqués lors de l'apoptose induite par les Dox-CPPs puisque l'utilisation d'un inhibiteur de ROS inhibe partiellement l'apoptose induite par ces composés. Nous avons montré également que la surexpression de Bcl-2 protège l'apoptose induite par la Dox et partiellement par les Dox-CPPs, ce qui suggère qu'une autre voie est impliquée dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs et qui expliquerait la plus forte toxicité de ces composés. Concernant cette deuxième voie nous avons pu montrer que les récepteurs de mort TRAIL sont bien impliqués dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs via

la clustérisation membranaire des récepteurs de mort DR4 et DR5. Cette clustérisation modifie le taux d'expression de ces récepteurs membranaires et à l'origine d'une sensibilisation des cellules MDA-MB 231 au TRAIL endogène au cours de l'apoptose induite par les Dox-CPPs. Une telle sensibilisation au TRAIL est à l'origine de la génération de céramide, qui constitue une autre voie d'induction d'apoptose par les Dox-CPPs en plus de la voie mitochondriale.

L'ensemble de ces résultats devraient nous permettre à valoriser la stratégie de couplage des CPPs à des agents antitumoraux afin d'améliorer leur effet et de mieux comprendre les voies de signalisation de la mort induite suite au couplage. Ceci pourrait à terme conduire à la conception de nouveaux analogues d'index thérapeutique plus élevé.

Mots clés : Cell- Penetrating-Peptides, Doxorubicine, résistance cellulaire, apoptose, ROS, récepteurs de mort, céramide.

Abbreviations

ATP: Adénosine triphosphate
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
AIF: Apoptosis Inducing Factor
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messager
ARNt: Acide RiboNucléique de transfert
ASM: acide sphingomyelinase
Apaf-1: APoptosis Activating Factor-1
BSA: Serum Albumine Bovine
Bax: Bcl-2 Associated X protein
Bak: Bcl-2 Antagonist/Killer
Bid: BH3 interacting domain
BH: Bcl-2 Homology domain
Bad: Bcl 2-antagonist of cell death
BIR: Baculovirus IAP Repeat
Bcl-2: B-cell CLL/lymphoma 2
CAD: Caspase-Activated Deoxyribonuclease
CPAN: Caspase-Activated Nuclease
cyt c: cytochrome c
CARD: CAspase Recruitement Domain
c-FLIP: Flice Inhibitory Protein
CPP: Cell Penetrating peptide
DAG: diacylglycerol
DED: Death Effector Domain
DISC: Death-Inducing Signaling Complex
DD: Death Domain
Da: dalton
DMEM: milieu d'Eagle modifié par Dulbecco
DMSO: DiMéthylSulfOxyde
Dox: Doxorubicine
DR4/5: Death Receptor 4/5
DHE: dihydroethidium
FADD: Fas Associated Death Domain
FLIP: Flice-Like Inhibitory Protein
c-FLIPS: cellular-FLICE-Inhibitory Protein Short
FasL: Fas Ligand
FAK: Focal Adhesion Kinase
FPLC: Fast Protein Liquid Chromatography
FITC: isothiocyanate de fluoroscéine
h: heure
IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD: Inhibitor of CAD
ICK : Inhibitor Knot Motif

kDa: kilo-dalton
 Kb: kilo-base
 µl : micro-litre
 M: molaire
 MCa: Maurocalcine
 MCa_{Abu} : Analogue de la maurocalcine dont les résidus cystéine sont remplacés par l'acide L- α -aminobutyrique
 NADPH: Nicotinamide AdénineDinucléotide Phosphate réduit
 NAC: N-acétyl-cystéine
 NBD : nucleotide binding domain
 PARP : poly(ADP-ribose)polymérase
 PBS: Phosphate Buffer saline
 PS : phosphatidylsérines
 Pen: Penétratine
 PtdCho: phosphatidylcholine
 PVDF: difluorure de polyvinyle
 QD : Quantum Dots
 RPMI: Roswell Park Memorial Institute
 ROS: Reactive Oxygen species
 RyR1 : Ryanodine Receptor type I
 SDS: sodium dodécyl sulfate
 Smac/Diablo: Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI
 SM: sphingomyélines
 SMases: sphingomyelinases
 SVF: Sérum de Veau Fœtal
 tBid : Bid tronqué
 TNF: Tumor Necrosis Factor
 TRAIL: Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
 TRADD: TNFR-Associated Death Domain protein
 UBC: ubiquitine conjugating enzyme domain
 UV: Ultra-Violet
 XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
 XIAP (X-linked IAP)
 z-VAD-fmk : Benzoxo-xy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

Code des acides aminés

Alanine	Ala	A	Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D	Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	F	Glycine	Gly	G
Histidine	His	H	Isoleucine	Ile	I
Lysine	Lys	K	Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M	Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P	Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R	Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T	Valine	Val	V
Tryptophane	Try	W	Tyrosine	Tyr	Y

Table des Matières

INTRODUCTION GENERALE	-1-
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	-3-
I. Les peptides vecteurs	- 3 -
1. Généralités	- 3 -
2. Mécanisme d'entrée	- 3 -
3. Le peptide Tat.....	- 5 -
4. La pénétratine.....	- 6 -
5. La Maurocalcine	- 7 -
6. Autres peptides vecteurs	- 9 -
7. Application à la délivrance de biomolécules.....	- 10 -
8. Application à la délivrance des drogues.....	- 11 -
II. Doxorubicine ou Adriamycine.....	- 11 -
1. Généralités	- 11 -
1.1 Structure chimique	- 11 -
1.2 Indications et toxicités.....	- 12 -
2. Mécanisme d'action.....	- 12 -
2.1 Entrée dans la cellule	- 13 -
2.2 Intercalation dans l'ADN	- 13 -
2.3 Inhibition des Topoisomérases	- 14 -
2.3.1 Topoisomérases II.....	- 14 -
2.3.2 Mécanisme d'inhibition des topoisomérases	- 15 -
2.4 Génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS).....	- 17 -
2.4.1 Réactions d'oxydoréduction	- 17 -
2.4.2 Effets cellulaires de la production des ROS	- 18 -
2.5 Formation de liaisons covalentes avec l'ADN.....	- 19 -
2.6 Interaction directe avec les membranes	- 19 -
2.7 Induction de la mort cellulaire	- 20 -
3. Mécanismes de résistance à la doxorubicine.....	- 21 -
3.1 Surexpression de pompes membranaires	- 22 -
3.1.1 P-gp.....	- 22 -
3.1.2 Famille MRP.....	- 23 -
3.1.3 MXR	- 24 -
3.2 Enzymes de détoxication: Système dépendant du glutathion.....	- 24 -
3.3 Modification de la cible: Topoisomérase II	- 26 -
3. 3.1 Altérations quantitatives.....	- 26 -
3. 3.2 Altérations qualitatives.....	- 27 -

3.4 Réparation de l'ADN.....	27 -
III. La mort cellulaire.....	28 -
1. Généralités.....	28 -
2. La mort cellulaire par apoptose.....	29 -
2.1 Généralités.....	29 -
2.2 Modifications morphologiques de la cellule.....	31 -
2.3 Modifications nucléaires.....	31 -
3. Induction de l'apoptose.....	32 -
3.1 Les caspases.....	32 -
3.1.1 Structure et classification.....	32 -
3.1.2 Activation des caspases.....	33 -
3.1.3 Substrats des caspases.....	34 -
3.2 Les voies moléculaires conduisant à l'activation des caspases.....	36 -
3.2.1 La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque.....	36 -
* Le récepteur de mort TNF-R1.....	37 -
* Les récepteurs de mort TRAIL-Rs et leur ligand.....	38 -
3.2.2 La voie mitochondriale ou intrinsèque.....	41 -
3.2.3 Un dialogue entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque.....	42 -
4. Régulation de l'apoptose.....	43 -
4.1 Régulation des caspases.....	43 -
4.1.1 Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation du DISC.....	44 -
4.1.2 Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation de l'apoptosome.....	45 -
4.1.3 Régulation de l'activation des caspases par les IAPs.....	45 -
4.1.4 Régulation de l'activation et de l'activité protéolytique des caspases par des inhibiteurs exogènes.....	47 -
4.2 Régulation des protéines de la famille Bcl-2.....	48 -
4.2.1 Structure et classification.....	48 -
4.2.2 Régulation.....	49 -
5. Le stress oxydant.....	50 -
6. Les céramides.....	51 -
6.1 Le métabolisme des sphingolipides.....	52 -
6.2 Les voies enzymatiques de la formation des céramides dans l'apoptose.....	52 -
6.3 Les sites subcellulaires de la production de céramides pro-apoptotiques.....	53 -
6.4 Les cascades de signalisation activées par les céramides et leurs conséquences sur l'apoptose.....	54 -
I. Lignées cellulaires, culture et traitements.....	56 -
II. Synthèse et Purification des conjugués Dox-CPPs.....	57 -
III. Effet de la Dox et des Dox-CPPs sur la prolifération cellulaire.....	58 -
1. Test de cytotoxicité.....	58 -

2. Test de clonogénicité.....	58 -
IV. Etude de la pénétration et de la localisation cellulaire de la Dox et des Dox-CPPs.....	59 -
1. Analyse de la pénétration cellulaire par cytométrie en flux....	59 -
2. Analyse de la localisation cellulaire par microscopie confocale-	59 -
V. Analyse de l'apoptose induite par la Dox et les Dox-CPPs	60 -
1. Analyse morphologique après coloration de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342	60 -
2. Analyse morphologique après coloration au May-Grunwald-Giemsa.....	60 -
3. Quantification des cellules apoptotiques.....	61 -
3.1 Quantification par cytométrie en flux	61 -
3.2 Quantification par coloration avec le Hoechst 33342	62 -
4. Etude de la fragmentation de l'ADN.....	62 -
VI. Mesure de l'activation des caspases par inhibition	63 -
VII. Extraits cellulaires et Western-Blot	63 -
VIII. Etude de la libération du cytochrome c et de l'oligomérisation de Bax.....	65 -
VIII. Etude de l'implication des espèces réactives d'oxygènes (ROS) par la N-acétyl-cystéine (NAC) en cytométrie en flux.....	65 -
X. Etude de l'expression des récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5).....	66 -
1. Analyse de l'expression des récepteurs DR4 et DR5 par cytométrie en flux.....	66 -
2. Détection des agrégats de DR4 et DR5 et leurs co-localisation avec les rafts par immunofluorescence.....	66 -
3. Etude de l'effet d'antagonistes de récepteurs TRAIL (TRAIL-R1-Fc et TRAIL-R2-Fc).....	67 -
4. Etude de la sensibilité au ligand TRAIL	67 -
XI. Etude de l'expression du ligand TRAIL	67 -
1. Analyse de l'expression de l'ARNm par transcription inverse-Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR)	67 -
1.1 Extraction des ARN totaux	67 -
1.2 Synthèse d'ADN complémentaire (RT).....	68 -
1.3 Amplification de l'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	68 -
2. Analyse de l'expression du ligand TRAIL par immunofluorescence	69 -
XII. Etude de l'implication des céramides dans l'apoptose	69 -
1. Etude de la sensibilité au C2-céramide.....	69 -
2. Détection de céramides totale par cytométrie en flux.....	70 -

3. Analyse de l'expression des céramides membranaires et détection de leur co-localisation avec les rafts par immunofluorescence	- 70 -
--	--------

RESULTATS ET DISCUSSION.....	-74-
------------------------------	------

CHAPITRE I : Etude du mécanisme d'internalisation cellulaire de la maurocalcine (MCa).....	-74-
---	------

ARTICLE I: Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine.....	-76-
---	------

CHAPITRE II : Conception d'un analogue de la maurocalcine pour la délivrance de différents cargos à l'intérieur des cellules.....	-89-
--	------

ARTICLE II: Design of a disulfide-less, pharmacologically inert, and chemically competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells.....	-91-
---	------

ARTICLE III: Maurocalcine as a Non Toxic Drug Carrier Overcomes Doxorubicin Resistance in the Cancer Cell Line MDA-MB 231.....	-113-
---	-------

CHAPITRE III : Etude du type de mort induite par la Dox et les conjugués Dox-CPPs dans les cellules MDA-MB231.....	-128-
---	-------

ARTICLE IV: Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell penetrating peptides compared to	
---	--

unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231.....	-130-
---	-------

ARTICLE V: Conjugation of doxorubicin to cell penetrating peptides sensitizes human breast MDA-MB 231 cancer cells to endogenous TRAIL-induced apoptosis	-142-
---	-------

CONCLUSION GENERALE	-161-
---------------------------	-------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	-165-
----------------------------------	-------

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer est un problème majeur de santé publique dans le monde. La lutte contre le cancer est une priorité du secteur santé et fait l'objet de nombreux projets au niveau mondial notamment avec l'approbation des « Resolutions on Cancers Control » (OMS). Les moyens de diagnostic disponibles à l'heure actuelle ne permettent pas souvent le dépistage précoce des tumeurs. Sur le plan thérapeutique, les traitements conventionnels cytostatiques et cytotoxiques n'ont qu'une sélectivité imparfaite vis-à-vis des cellules tumorales. Ils entraînent des effets secondaires, parfois sévères, qui limitent les doses auxquelles ils peuvent être administrés. La cancérologie clinique réclame donc le développement conjoint de nouvelles méthodes diagnostiques plus sensibles et plus performantes, ainsi que de nouvelles thérapeutiques plus efficaces mais aussi mieux tolérées.

Pour répondre à ces besoins, la recherche sur le cancer se tourne vers la vectorisation. Celle-ci correspond à l'utilisation de nouvelles molécules directement issues des connaissances de la biologie et visant à agir sur la cellule cancéreuse.

Il est aussi important de comprendre le mode d'action moléculaire de ce concept de « vecteurs » synthétiques afin de mieux le caractériser et d'établir de nouveaux médicaments d'indice thérapeutique plus élevé (augmentation de l'activité principale recherchée, diminution des propriétés secondaires néfastes).

Les recherches intensives au cours de ces dernières années ont montré que de nombreux agents cytotoxiques, en particulier de nombreux agents antitumoraux (anthracyclines, epipodophyllotoxines, poisons des microtubules) ont la possibilité d'induire une mort par apoptose (mort cellulaire programmée).

L'apoptose est une mort essentielle au cours de la morphogenèse, par exemple pour sculpter les espaces interdigitaux. Dans l'organisme adulte, pour l'élimination de certaines

cellules indispensables au maintien de l'homéostasie tissulaire, non seulement pour compenser la prolifération, mais aussi pour éliminer les cellules non fonctionnelles, altérées ou potentiellement dangereuses pour les tissus avoisinants, par exemple les cellules infectées par un virus. Ces réponses permettent également, la mise en place de réponses adaptatives, par exemple la résistance aux agressions extérieures comme les agents environnementaux. A l'inverse, lorsque la cellule n'est plus capable d'intégrer correctement ces signaux extracellulaires, elle peut proliférer de façon anarchique et devenir cancéreuse. L'apparition d'une tumeur a longtemps été considérée comme la conséquence d'une prolifération cellulaire anarchique. Il apparaît maintenant qu'un défaut d'élimination de cellules, devenues insensibles aux signaux de mort, est souvent impliqué dans la physiopathologie des tumeurs. C'est pourquoi l'étude des voies de signalisation intracellulaire représente une étape indispensable à la compréhension des mécanismes du développement tumoral. En outre, de nombreux agents antitumoraux peuvent induire la mort de cellules par apoptose. La connaissance des voies d'induction de l'apoptose générées par les médicaments anticancéreux peut permettre d'identifier les molécules qui rétablissent le programme d'apoptose réprimé dans les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines et d'imaginer de nouvelles stratégies de traitement du cancer par l'utilisation d'un médicament qui induit facilement et plus rapidement la mort des cellules tumorales.

Dans ce contexte, notre travail de recherche s'intéresse à l'utilisation de vecteurs peptidiques qui pourront augmenter l'entrée de molécules imperméables et contourner la résistance cellulaire aux traitements anticancéreux. L'agent antitumoral choisi comme cargo dans cette étude est la doxorubicine (Dox). Cette drogue est largement utilisée en chimiothérapie et dont son utilisation est limitée par l'éventuelle cardiotoxicité. Les vecteurs synthétiques utilisés au cours de cette étude sont un analogue de la MCa (MCa_{Abu}) et deux autres peptides largement décrits dans la littérature à savoir le peptide tat et la pénétratine. L'internalisation, l'efficacité antitumorale et la biodistribution des complexes cargo-vecteurs synthétisés ont été testés. Nous nous sommes également intéressés au type de mort et aux processus intracellulaires conduisant à cette mort médiée par ces complexes.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I: Séquences et propriétés de quelques peptides vecteurs

	Peptide vecteur	Origine	Séquence	Référence
Peptides vecteurs naturels	Pénétratine (pAntp)	Protéine Antennapedia de la Drosophile	RQIKIWFQNRRMKWKK	(Derossi <i>et al.</i> , 1994)
	Tat (48-60)	Protéine Tat du VIH	GRKKRRQRRRPPQ	(Vives <i>et al.</i> , 1997)
	MCa	Toxine du « <i>Scorpio maurus palmatus</i> »	GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRR GTNIEKRCR	(Estève <i>et al.</i> , 2005)
	VP22	Protéine de l'enveloppe du Virus Herpès Simplex	DAATATRGRSAARPTERPRAPARS ASRPRRPVE	(Elliott et O'Hare 1997)
	hCT(9-32) C	alcitonine humaine	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP -amide	(Schmidt <i>et al.</i> , 1998)
	PrP	Protéine du prion de souris	MANLGYWLLALFVTMWTDVGLC KKRPKP	(Lundberg <i>et al.</i> , 2002)
Peptides vecteurs synthétiques	Transportan	Galanin(1-12)-Lys-Mastoparan	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALA KKIL-amide	(Pooga <i>et al.</i> , 1998)
	TP10	Transportan tronqué	AGYLLGKINLKALAALAKKILamide	(Soomets <i>et al.</i> , 2000)
	MAP	Peptide Amphipathique modèle	KLALKLALKALKKAALKLA-amide	(Oehlke <i>et al.</i> , 1998)
	Pep-1	Séquence NLS + Séquence hydrophobe	KETWWETWWTEWSQPKKKRKVcys amide	(Morris <i>et al.</i> , 2001)
	MPG	Séquence NLS + Séquence hydrophobe	GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKR KV-cysamide	(Morris <i>et al.</i> , 1997)
	Oligoarginine		(R)_n	(Rothbard <i>et al.</i> , 2000)
Peptides vecteurs dérivant de peptides antibactériens	Magainin 2	Protéine de la peau du grenouille griffés africaine « <i>Xenopus laevis</i> »	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	(Kim <i>et al.</i> , 2009)
	Buforin 2	Isolé du tissu d'estomac d'un crapaud asiatique, « <i>gargarizans Bufo bufo</i> »	TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK	(Hao <i>et al.</i> , 2009)

I. Les peptides vecteurs

1. Généralités

Il a été montré récemment que des peptides à caractère basique peuvent franchir la membrane plasmique et rentrer dans la cellule. Ces peptides sont dénommés Cell Penetrating Peptides (CPPs), 'Protein Transduction Domain' (PTD) ou même 'Trojan Peptides' (**tableau I**). Il s'agit de peptides de séquence d'acides aminés courte (7 à 30 acides aminés), naturels ou synthétiques et capables de délivrer des biomolécules, de toutes tailles depuis des drogues anticancéreuses de petits poids moléculaires jusqu'à des nanoparticules ou des liposomes. Les CPPs traversent les membranes plasmiques de façon non spécifique, ce qui rend ce processus un désavantage dans le cas où un ciblage est souhaité (Niesner *et al.*, 2002 ; Mai *et al.*, 2002). Une telle internalisation cellulaire de ces CPPs n'est pas totalement non spécifique mais dépend du type cellulaire utilisé (Mai *et al.*, 2002; Violini *et al.*, 2002 ; Kelly *et al.*, 2008). De plus, des stratégies associant des CPPs à un ciblage sont envisageables.

2. Mécanisme d'entrée

La question du mécanisme d'entrée de ces CPPs dans les cellules suscite toujours un vif débat entre plusieurs équipes de recherches. Actuellement, les travaux sur le mécanisme

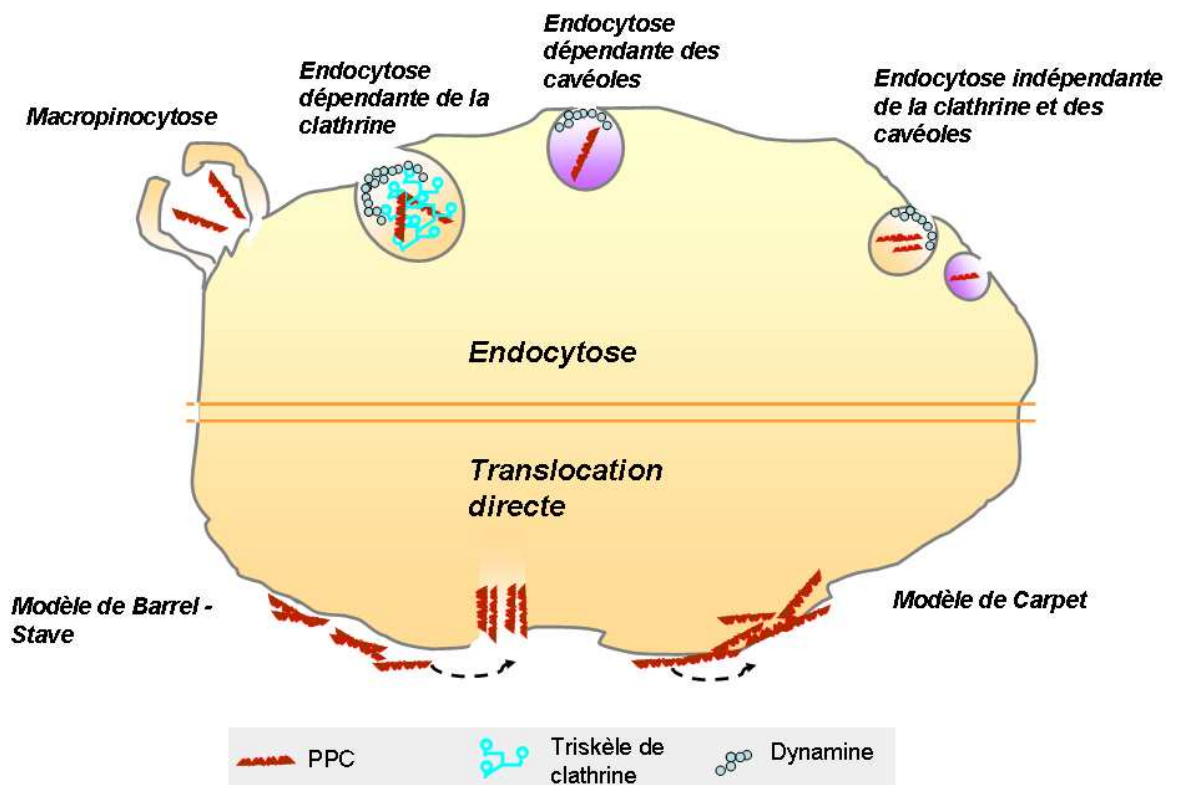


Figure 1 : Mécanismes d'entrée des CPPs

Deux mécanismes d'internalisation des CPPs ont été décrits: l'endocytose et la translocation directe. Quatre voies d'endocytose peuvent être distinguées d'un point de vue morphologique et moléculaire. La macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose dépendante des cavéoles et l'endocytose indépendante de la clathrine et des cavéoles. Les cavéoles sont enrichies en cholestérol et en sphingolipides. La cavéoline est un marqueur spécifique qui permet de distinguer cette voie des autres microdomaines. Le passage par les endosomes précoces, également appelés endosomes de tri, est l'étape essentielle et commune à toutes les voies d'endocytoses. La sortie des endosomes est le facteur limitant principal.

d'internalisation des CPPs indiquent que les deux types, translocation directe de la bicouche lipidique et par endocytose, peuvent être observés (**figure 1**) (Richard *et al.*, 2003; Simeoni *et al.*, 2003 ; Richard *et al.*, 2005), selon les CPPs et les concentrations expérimentales utilisées.

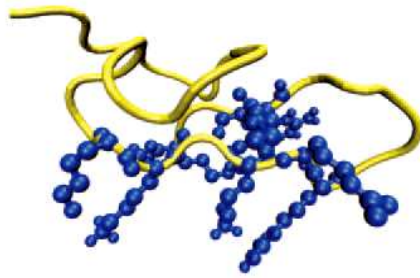
La translocation directe des CPPs est un processus énergie-indépendant (Pooga *et al.*, 1998 ; Christiaens, 2004 ; Kelly *et al.*, 2008). Les CPPs qui empruntent une pénétration directe obéissent à un transport sensible aux changements des propriétés membranaires tel que la fluidité et le potentiel membranaire. En effet, l'interaction avec la membrane cytoplasmique se fait selon des modèles biophysiques relevant de la pénétration des peptides antimicrobiens et qui provoquent une déstabilisation de la structure membranaire.

Deux modèles ont été décrits ; le modèle de 'barrel-Stave' ou 'Douve de Tonneau' et le modèle de 'Carpet' ou 'tapis' (Herbig *et al.*, 2005; Yandek *et al.*, 2007). Dans le premier modèle, les CPPs s'orientent perpendiculairement à la membrane afin de mettre leurs résidus hydrophobes en contact avec les lipides. Par suite, les CPPs se regroupent dans la membrane lorsqu'un certain seuil est atteint, forment un canal sous forme de tonneau et se trouvent enfin dans le cytoplasme (Yeaman et Yount, 2003 ; Sanderson, 2005). Le deuxième modèle, est un mécanisme souvent décrit du type détergent qui se réalise sans formation de pores dans la membrane. Les peptides s'alignent et s'accumulent à la surface de la membrane, induisant une perturbation locale, puis des perforations entraînant l'entrée dans le cytoplasme (Yeaman et Yount, 2003 ; Sanderson, 2005).

L'endocytose est un processus régulé utilisé par les cellules pour internaliser les solutés et les fluides dans la matrice extracellulaire, il inclut aussi la phagocytose et la pinocytose (Conner et Schmid, 2003). La phagocytose est un processus complexe utilisé pour englober de larges particules et il est réservé à des cellules spécialisées telles que les macrophages et les neutrophiles (Aderem et Underhill, 1999, Champion et Mitragotri, 2006). La pinocytose apparaît dans tous les types cellulaires et peut être classée en quatre voies diverses ; macropinocytose, endocytose clathrine-dépendante, endocytose dépendante des cavéoles/rafts lipidiques et endocytose clathrine, cavéole-indépendante (Conner et Schmid, 2003). Bien que le mécanisme exact de chaque processus pinocytaire diffère tout en dépendant de la structure vésiculaire et la machinerie utilisée, ces processus partagent tous un nombre de critères communs. En effet, les molécules extracellulaires sont encapsulées dans des vésicules lipidiques, qui sont internalisées après le refermement de la membrane plasmique

Maurocalcine

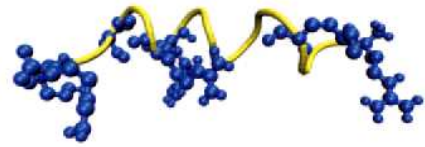
Maurus palmatus



1-GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIEKRCR-33

Penetratin 1

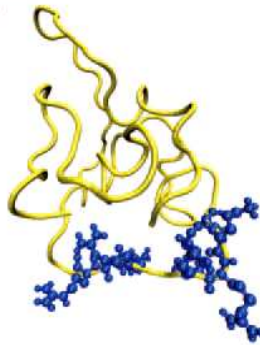
Drosophila antennapedia



1-RQIKIWFQNRRMKWKK-16

TAT protein

HIV1



1-MDPVDPNIEPWNHPGSQPKTACNRCHCKKCCYHCQVCFIKKGL
GISYGRRKRRRRPSQGGQTHQDPIPKQPSSQPRGDPTGPKE-86

Figure 2: Structure tridimensionnelle des peptides Tat, Pen et MCa (modifiée d'après

Estève et al., 2005)

Les chaînes latérales des acides aminés basiques sont représentées en bleu dans les structures tridimensionnelles. La structure primaire de chaque peptide a été aussi donnée (R : Arginine ; K : Lysine)

(Conner et Schmid, 2003). Le destin de ces molécules dépend de leur capacité à échapper aux vésicules lipidiques encapsulantes avant de retourner vers la membrane plasmique pour le recyclage ou leur réunion avec les lysosomes. Il est important de savoir que ce type d'échappement vésiculaire peut limiter l'efficacité des CPPs à atteindre leurs sites intracellulaires désirés. Plusieurs études suggèrent que le mécanisme de délivrance par endocytose adopté par les CPPs, est très dépendant du cargo attaché (Maiolo *et al.*, 2005). Par exemple, il a été prouvé que le mécanisme d'entrée de la Tat conjuguée à une protéine, est l'endocytose dépendante des rafts lipidiques (Fittipaldi *et al.*, 2003) par contre, lorsqu'elle est couplée à un fluorochrome, il s'agit de l'endocytose dépendante de la clathrine (Richard et al., 2005). La macropinocytose a été impliquée dans la pénétration d'une variété de conjugués CPP-cargo, suggérant que le repliement membranaire aide à l'internalisation des CPP (Wadia *et al.*, 2004 ; El-Andaloussi *et al.*, 2007 ; Jones, 2008). En plus, l'interaction des CPPs avec les protéoglycanes membranaires a été démontrée responsable de leurs translocation dans la cellule (Barany-Wallje *et al.*, 2005; Nakaseet *et al.*, 2007; Poon et Gariépy, 2007).

3. Le peptide Tat

Le peptide Tat est le plus connus des CPPs pour la délivrance de biomolécules variées (Jehangir *et al.*, 2005). En 1988, des travaux ont rapporté que la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humain (HIV-1) traverse la membrane par un mécanisme indépendant de l'énergie (Frankel et Pabo 1988; Green et Loewenstein 1988).

Il a été démontré récemment que la protéine Tat entre les cellules par endocytose et ce via des vésicules à clathrine (Vendeville *et al.*, 2004). Des études de la protéine Tat ont indiqué qu'un fragment d'environ 9 acides aminés, fragment 49-57, est responsable de l'internalisation de la protéine Tat (Wender *et al.*, 2000 ; Brooks *et al.*, 2005) (**figure 2**). Les données initiales semblaient indiquer que l'internalisation cellulaire du peptide Tat est rapide et indépendante de la température (Vivès *et al.*, 1997).

De même, Suzuki et ses collègues ont montré que les inhibiteurs d'endocytose n'affectent pas l'entrée du peptide Tat dans les cellules (Suzuki *et al.*, 2002). Ces données montrent que la pénétration de ce peptide dans les cellules était indépendante de l'endocytose (Futaki, 2002). Plus tard, en 2003, Richard et ses collègues ont remis en question les données

initiales et démontré que le processus utilisé par le peptide Tat pour entrer dans les cellules est bien l'endocytose (Richard *et al.*, 2003) et que les protocoles utilisés initialement sont dues à des artefacts expérimentaux. Ce mécanisme est dépendant de l'énergie, de la température et des héparines sulfates membranaires. L'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose ou de mutants affectés dans l'expression des glycoprotéoglycanes diminue significativement l'internalisation du peptide Tat (Richard *et al.*, 2003 ; Richard *et al.*, 2005;). La microscopie de fluorescence a révélé une co-localisation vésiculaire entre le peptide Tat et la transferrine (marqueur de l'endocytose clathrine dépendante) (Richard *et al.*, 2005 ; Abes *et al.*, 2007).

4. La pénétratine

La pénétratine (Pen) est un peptide vecteur dérivant de l'homéodomaine d'Antennapedia (43-58), une homéoprotéine de drosophile. Ce facteur de transcription interagit avec l'ADN via les 60 acides aminés conservés de l'homéodomaine (Gehring *et al.*, 1994). Les aminoacides de ce domaine adoptent une structure en hélice, l'homéodomaine étant formé de 3 hélices- α (**figure 2**). Ce peptide entre dans les cellules d'une manière énergie indépendante (Joliot *et al.*, 1991) et de manière indépendante de l'endocytose (Derossi *et al.*, 1996; Prochiantz, 1996). Derossi et ses collaborateurs ont mis en évidence l'importance de la troisième hélice longue de 16 acides aminés, dans l'entrée de cet homéodomaine (Derossi *et al.*, 1994).

Trois résultats particulièrement importants ont été obtenus :

- * Le premier indique le rôle du résidu tryptophane 48 (W₄₈) qui ne peut être remplacé par aucun autre acide aminé hydrophobe sans diminution considérable de l'internalisation de l'homéodomaine.
- * Le second montre qu'il n'y a pas de récepteur chirale qui assure l'entrée cellulaire du peptide dans la mesure où le peptide en série dextrogyre entre d'une manière aussi efficace dans les cellules.
- * Le troisième révèle l'importance de la structure en hélice α pour l'internalisation. Une mutation (Q₅₀-P) déstabilise la structure en hélice et diminue dramatiquement l'efficacité d'entrée cellulaire de la pénétratine (Derossi *et al.*, 1994; Derossi *et al.*, 1996).

Un autre modèle a été proposé par l'équipe de Prochiantz pour expliquer l'internalisation de la pénétratine. Dans ce modèle, le peptide interagirait grâce à ses charges cationiques avec les charges négatives présentes au niveau de la membrane plasmique. Les résidus tryptophanes (W48 et W56) assurent des interactions hydrophobes avec les phospholipides membranaires. La concentration du peptide au niveau de la membrane provoquerait une invagination de la membrane conduisant à la formation d'une micelle inverse suivie d'une libération dans le milieu intracellulaire (Derossi *et al.*, 1996). Cependant, des travaux sur l'importance de ces résidus tryptophanes ont montré que leur mutation par des phénylalanines n'influe pas sur l'efficacité d'internalisation, résultat qui contredit ceux de Derossi. Par contre, la mutation des deux arginines en lysines abolit complètement l'entrée cellulaire de la pénétratine (Thoren *et al.*, 2003). Récemment, il a été montré que la pénétratine empreinte, également, la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine et l'endocytose médiée par les cavéoles et les rafts lipidiques pour entrer les cellules Hela (Duchardt *et al.*, 2007).

Le consensus initial concernant un mécanisme d'internalisation indépendant de l'endocytose a été remis en question à la suite de travaux mettant en évidence des artefacts expérimentaux liés à l'utilisation de ces peptides fortement chargés. Par exemple, la fixation des cellules provoque une redistribution des CPPs (Richard *et al.*, 2003). De même, l'association forte des ces peptides basiques à la surface cellulaire biaise l'interprétation des données de cytométrie de flux (Richard *et al.*, 2003)

5. La Maurocalcine

La maurocalcine (MCA) est un peptide de 33 acides aminés, isolé du venin d'une espèce tunisienne de scorpion « *Scorpio maurus* ». Il s'agit d'un peptide hautement basique puisque 12 acides aminés sur 33 sont basiques (Fajloun *et al.*, 2000). Le peptide contient également trois ponts disulfures qui le structurent selon un motif ICK. La MCA peut être produit chimiquement par la technique de synthèse en phase solide de Merrifield et sa structure 3-D a pu être résolue par 1H-RMN. Il a été démontré par deux preuves que la MCA est capable de traverser la membrane plasmique vers l'espace intracellulaire. Premièrement, la cible naturelle de cette toxine, lorsqu'elle est additionnée au milieu extracellulaire, est le

récepteur à la ryanodine, un canal calcium intracellulaire, responsable de la mobilisation de calcium de stocks internes du réticulum endoplasmique (RE). Une fois fixé sur son récepteur, la toxine induit un état de sous-conductance prolongé qui produit la libération du calcium du RE. Cet effet peut être observé sur des myotubes en culture par le biais d'une technique d'imagerie calcique. L'effet de la maurocalcine sur le récepteur ryanodine implique donc deux événements majeurs : (i) une pénétration cellulaire puisque la cible de la toxine est intracellulaire, et (ii) une fixation sur un site défini du récepteur ryanodine. (Mosbah *et al.*, Fajloun *et al.*, 2000 ; Pouvreau *et al.*, 2006). Deuxièmement, l'analyse structurale du peptide révèle un Protein Transduction Domain (PTD) qui est réminiscent de celui retrouvé chez les peptides Tat, Pen, VP22. Le site de fixation et le mode d'action du peptide sont parfaitement identifiés. Le peptide ne présente aucune toxicité cellulaire dans l'état actuel de connaissance. Il a été démontré que ce peptide possède la propriété de traverser la membrane plasmique sans nécessiter de processus d'endocytose ou mobiliser des ressources métaboliques cellulaires (Estève *et al.*, 2005). Bien que le mécanisme exact de pénétration cellulaire de la MCa ne soit pas déterminé, il semble toutefois que les acides aminés basiques joueraient un rôle prépondérant. Cette propriété, appelée translocation, est vraie non seulement pour le peptide, mais également pour le peptide en complexé avec des protéines non perméables. Les derniers travaux montrent à l'évidence que la MCa pénètre dans tous types de cellules, et au cours d'un processus relativement rapide (1 à 2 min). En terme de distribution intracellulaire, le peptide se retrouve dans un premier temps majoritairement dans le cytoplasme et partiellement dans le noyau. Puis, avec le temps, elle semble capable de se concentrer dans le noyau. Les organelles comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique ne semblent pas concernés (Estève *et al.*, 2005 ; Boisseau *et al.*, 2006).

Parmi les composés que la MCa est capable de faire pénétrer, citons une protéine de 60 kDa et des nanoparticules fluorescentes de 15 nm de diamètre (quantum dots). La récente production d'analogues dépourvues d'effets pharmacologiques, mais conservant la propriété vecteur de translocation, garantie un usage non toxique de ce peptide (Mabrouk *et al.*, 2007). Trois propriétés originales, pas nécessairement décrites pour d'autres PPC sont apparues : 1- une pénétration contre le gradient de concentration (l'accumulation est unidirectionnelle, la cellule continuant à se charger en MCa alors même que la concentration extracellulaire est très faible), et 2- l'entrée de la toxine est beaucoup plus rapide que son exit (qui se produit probablement par des voies de dégradation cellulaire) et 3- une grande efficacité à faible concentration (10-300 nM). L'ensemble de ces propriétés, combinées à l'absence de toxicité

cellulaire, indique que la MCa est un CPP d'intérêt potentiellement supérieur à ses concurrents directs tel que le peptide TAT.

6. Autres peptides vecteurs

Autres peptides vecteurs issus de protéines naturelles ont été caractérisés, comme par exemple le Transportan, un peptide chimère dont la séquence est composée de la partie N terminale du neuropeptide galanine liée via une lysine à un peptide du venin de guêpe, le mastoparan. Il a été démontré que l'internalisation du Transportan soit indépendante de la température, de l'énergie et de récepteur (Zorko *et al.*, 1998 ; Pooga *et al.*, 2001). A l'origine le transportan est issu d'une étude sur de nouveaux ligands pour le récepteur de la galanine. En 1996, Langel et ses collègues produisent un ligand chimère nommé galapran (Langel *et al.*, 1996).

Les travaux de Zorko ont révélé que le galapran entre dans les cellules d'une manière récepteur-indépendante et active la protéine G (Zorko *et al.*, 1998). La seule différence entre le Transportan et le galapran est la substitution de la proline 13 par une lysine (Pooga *et al.*, 1998). Des analogues du Transportan n'activant pas les protéines G ont été produits, comme le TP10 (Soomets *et al.*, 2000). D'autres CPPs dérivés de protéines ont été proposés comme le peptide 9-32 de la calcitonine humaine ou le peptide VP22 dérivant de la protéine de l'enveloppe du virus Herpès Simplex (Elliott et O'Hare 1997; Schmidt *et al.*, 1998). Une autre catégorie de peptides vecteurs issus de peptides antimicrobiens, comme la série SynB, dérivée de la protégrine (Drin *et al.*, 2003; Drin et Temsamani 2002; Rousselle *et al.*, 2003), peuvent traverser efficacement les membranes plasmiques. D'autres peptides vecteurs synthétiques ont été développés sur la base de l'importance des charges cationiques dans l'internalisation cellulaire. Parmi ces peptides, citons les oligoarginines (Rothbard *et al.*, 2000; Wender *et al.*, 2000), les oligolysines (Siwkowski *et al.*, 2004) et les polyhistidines (Pichon *et al.*, 2001). Une autre catégorie de vecteurs peptidiques regroupe les peptides amphipathiques dont il existe deux types: amphipathiques primaires et secondaires. Les amphipathiques primaires sont composés de deux domaines bien distincts, une partie hydrophobe liée par un bras espaceur à une partie hydrophile. Celle-ci, riche en lysine, est composée de la séquence de localisation nucléaire de l'antigène T du virus simien (SV40), et est responsable de l'adressage nucléaire de la molécule à délivrer. Quant à la partie hydrophobe qui assure

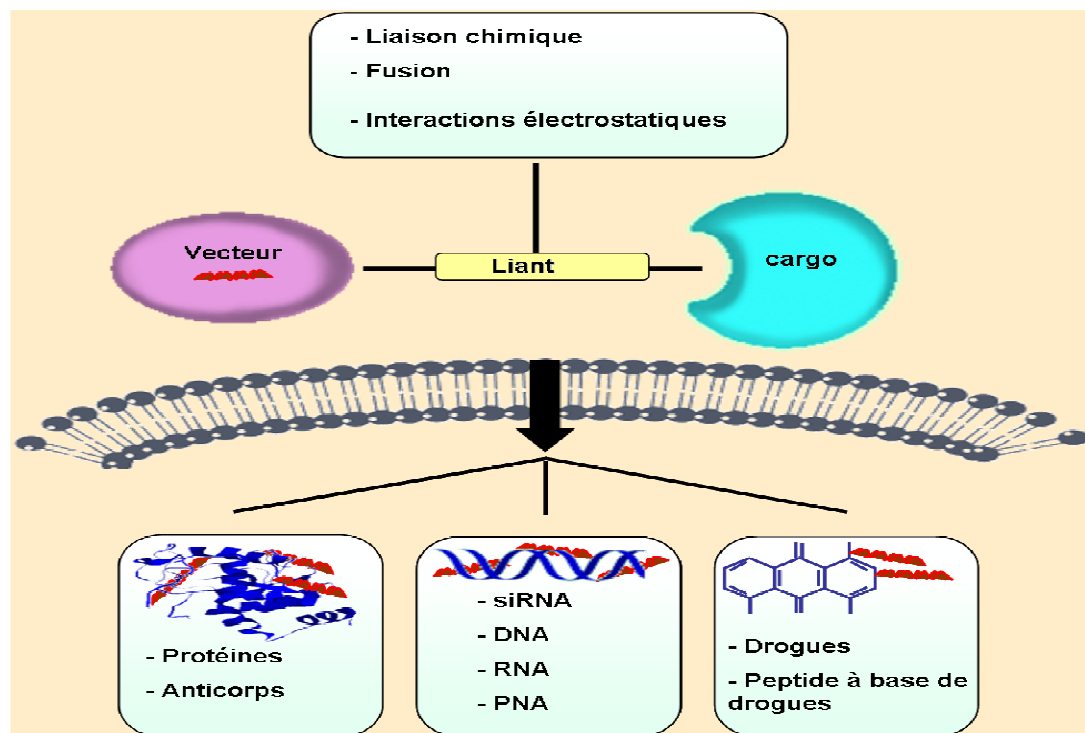


Figure 3 : Schémas de couplage CPPs-cargos

Les CPPs sont capables d'internaliser plusieurs biomolécules au travers de la membrane plasmique et/ou nucléaire des cellules.

l'interaction avec la membrane plasmique ainsi que l'internalisation, elle est composée soit de la séquence hydrophobe de la protéine gp41 du VIH pour le peptide MPG, soit d'une séquence riche en tryptophane (W) pour le peptide Pep-1 (Morris *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1997). Le bras espaceur assure une certaine flexibilité entre les deux domaines. Les amphipathiques secondaires possèdent une structure en hélice- α . On peut citer le peptide MAP (Oehlke *et al.*, 1998), le peptide GALA (Li *et al.*, 2004) et son dérivé KALA (Wagner, 1999), JST1 (Wagner, 1999) ainsi que des peptides vecteurs dont la séquence est riche en prolines (Pujals *et al.*, 2006).

7. Application à la délivrance de biomolécules

Un obstacle majeur au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est l'inefficacité de la majorité des biomolécules à traverser les membranes cellulaires. Dès la découverte des CPPs, de nombreux travaux se sont focalisés sur leur utilisation comme vecteurs pour l'internalisation de protéines, de peptides et d'oligonucléotides à visée thérapeutique (Dietz et Bahr, 2004). Différentes stratégies d'association entre le peptide vecteur et la molécule transportée ont été proposées: par liaisons chimiques en utilisant des liens chimiques entre deux fonction thiols ou deux fonctions amines ou bien entre une fonction thiol et une fonction amine, par fusion, ou bien association par interactions électrostatiques (**figure 3**). Chacune de ces stratégies a ses avantages et ses inconvénients. Par exemple, la molécule à transporter peut défavoriser l'internalisation du vecteur peptidique, ou le CPP peut inhiber l'effet biologique de la biomolécule vectorisée. Le choix du type de lien et du vecteur peptidique à utiliser est donc essentiel et doit être adapté à chaque cas. Dans certain cas, des interactions électrostatiques entre le peptide vecteur et l'entité biologique à vectoriser suffisent, comme par exemple pour la vectorisation de plasmides (Morris *et al.*, 1999), de protéines (Morris *et al.*, 2001) ou de siRNAs (Simeoni *et al.*, 2003), par des peptides de la famille MPG et Pep1. Le couplage covalent a été généralement utilisé pour la délivrance de peptides (Chen *et al.*, 1999) et la production de protéines recombinantes fusionnées au peptide vecteur pour celle des protéines (Peitz *et al.*, 2002).

8. Application à la délivrance des drogues

L'efficacité de plusieurs drogues de faible poids moléculaire a été améliorée par l'utilisation des CPPs comme véhicules de délivrance (Rothbard *et al.*, 2000 ; Goun *et al.*, 2006). La conjugaison du polyarginine à une drogue hydrophobe, la Paclitaxel a amélioré considérablement la solubilité dans l'eau et la translocation cellulaire de ce puissant agent thérapeutique (Goun *et al.*, 2006). La conjugaison des CPPs à la cyclosporine A a montré des effets bénéfiques dans le traitement du psoriasis et d'autres pathologies dermatologiques (Rothbard *et al.*, 2000). L'entrée du 5-aminolevulinique qui est une drogue active une fois converti dans la voie de biosynthèse de l'hème a été rendue possible par le couplage à la pénétratine (Dixon *et al.*, 2007). Par conséquent, les CPPs peuvent être utilisés pour améliorer les propriétés thérapeutiques des drogues, en augmentant leurs lipophilicité et leur faible trafic cellulaire, facteurs limitants de leurs utilisations. Les CPPs peuvent aussi être utilisés pour surmonter la résistance des cellules cancéreuses qui se manifeste par le refoulement de la drogue par les efflux membranaire ou bien par d'autres mécanismes tels que l'altération de la cible de la protéine et la diminution de la perméabilité membranaire ainsi que le métabolisme de la drogue (Longely, 2005). Par exemple, la doxorubicine conjuguée au peptide Tat (Liang *et al.*, 2005) et à la transferrine (Mazel, 2001 ; Fritzer *et al.*, 1996) a contourné la résistance dans des modèles cellulaires doxorubicine-résistantes. Les CPPs ont amélioré la translocation de la méthotrexate dans des lignées cellulaires résistantes à cet agent chimiothérapeutique, ce qui illustre encore le bénéfice thérapeutique des CPPs conjuguées à des drogues (Kelly *et al.*, 2008). Quoique ces drogues soient perméables à la cellule, de nature, leur conjugaison aux CPPs, les protègent contre les pompes de refoulement et assure un moyen effectif pour remédier à la résistance cellulaire.

II. Doxorubicine ou Adriamycine

1. Généralités

1.1 Structure chimique

La doxorubicine appartient à la famille des anthracyclines qui sont des antibiotiques issus de la fermentation de *Streptomyces peucetius*. Les premières anthracyclines identifiées

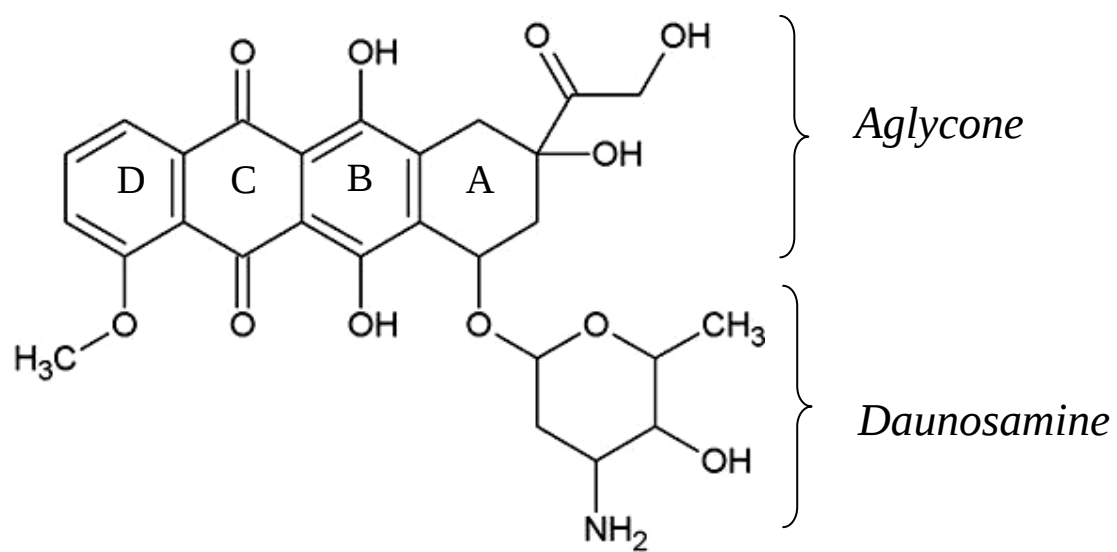


Figure 4 : Structure chimique de la doxorubicine

furent la daunorubicine, isolée en 1963 en Italie (Dimarco *et al.*, 1963) et en France (Dubsot *et al.*, 1963), puis l'adriamycine en 1969, à partir d'une souche mutante (Di Marco *et al.*, 1969). La structure des anthracyclines comprend deux parties (**figure 4**):

- * Une aglycone (Adriamycinone) composée d'un noyau tétracyclique hydrophobe quasi-plan portant des fonctions quinones et hydroquinones, et d'une chaîne latérale.

- * Un sucre (Daunosamine) lié au carbone C7 de l'aglycone.

La structure particulière des anthracyclines, en l'occurrence la doxorubicine, leur permet d'interagir avec l'ADN et de s'insérer entre deux paires de bases de la double hélice, ainsi qu'avec les lipides pour lesquels elles ont une forte affinité. Ces molécules réactives sont sensibles aux oxydoréductions cellulaires.

1.2 Indications et toxicités

La doxorubicine est active sur de nombreux carcinomes, lymphomes et sarcomes, et totalement inefficace sur les cancers du colon et du rein, les mélanomes, et les leucémies chroniques (Weiss, 1992). Un des problèmes majeur posé par les anthracyclines vient de leur capacité à induire de très fortes résistances en cas de rechute tumorale, qui sont généralement croisées avec d'autres anticancéreux d'origine naturelle. Le second problème est posé par l'induction de toxicités, en particulier cardiaque. L'administration de la doxorubicine est limitée à une dose cumulée de 550 mg/m² afin de prévenir les insuffisances cardiaques (Minotti *et al.*, 1999). Les anthracyclines sont mutagènes et carcinogènes, et en association avec le cyclophosphamide, la doxorubicine peut provoquer des cancers secondaires (Doroshov *et al.*, 2001; Benedic *et al.*, 1977).

2. Mécanisme d'action

L'action de la doxorubicine fut initialement attribuée à son intercalation dans l'ADN. Plusieurs autres mécanismes ont été décrits depuis pour expliquer les effets délétères observés aussi bien au niveau cellulaire que clinique après un traitement: inhibition de l'activité topoisomérase II, induction d'un stress oxydatif suite à la formation d'espèces radicalaires oxygénées (ROS), interférence avec l'action des hélicases, liaison covalente avec l'ADN, effets directs sur les membranes... La doxorubicine conduit finalement à la mort de la cellule (Gewirtz *et al.*, 1999).

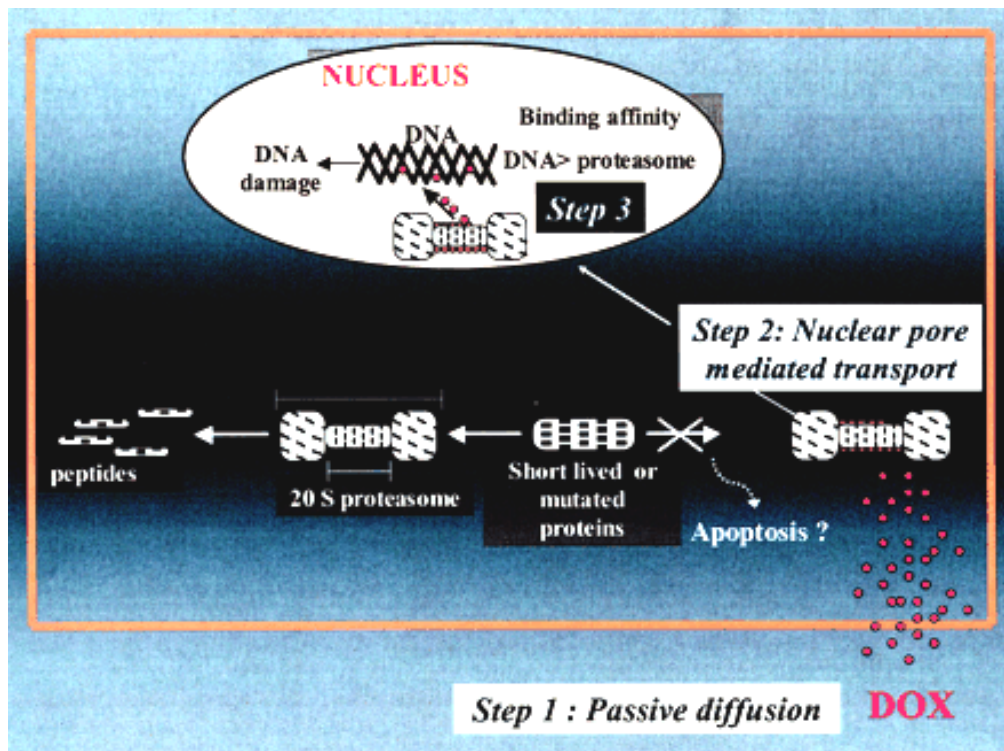


Figure 5: Représentation schématique des trois étapes du mécanisme de translocation nucléaire du complexe Doxorubicine-Protéasome (D'après Minotti et al., 2004).

La doxorubicine entre dans les cellules cancéreuses par une simple diffusion, un complexe Doxorubicine-protéasome se forme et migre du cytoplasme au noyau.

La cytotoxicité de la doxorubicine est complexe et l'importance de ses différentes actions dépend du type cellulaire étudié et de la dose de médicament employée. Son activité antitumorale est principalement attribuée à l'inhibition de la topoisomérase II qui induit des coupures double brin de l'ADN. Cet effet est obtenu à des concentrations cliniques alors que la production des ROS est observée pour des concentrations supracliniques (Gewirtz *et al.*, 1999). Cependant, même si la concentration plasmatique descend rapidement à 25-250 nM après l'administration de la doxorubicine, la concentration intracellulaire peut avoisiner 5 μ M et se maintenir ainsi pendant 4 à 5 jours (Gewirtz *et al.*, 1999; Cullinane *et al.*, 2000). La cardiotoxicité de la doxorubicine est quant à elle davantage attribuée à la génération des ROS dans les cellules cardiaques qui possèdent peu d'enzymes de détoxication, et à leur forte affinité pour la cardiolipine, un phospholipide prédominant de la membrane mitochondriale des cellules cardiaques (Jung et Reszka, 2001). Le doxorubicinol, métabolite majeur de la doxorubicine, semble également jouer un rôle très important dans ce phénomène (Minotti *et al.*, 2004).

2.1 Entrée dans la cellule

L'hydrophobicité de la doxorubicine associée à sa nature de base faible non chargée au pH physiologique lui permet de diffuser passivement à travers la membrane plasmique par un mouvement de flip-flop du feuillet externe au feuillet interne (Regev et Eytan, 1997; Ferte, 2000). Elle atteint vraisemblablement le noyau toujours par diffusion pour enfin se lier à l'ADN. Une liaison de forte affinité entre la doxorubicine et le protéasome a été récemment décrite. Un modèle d'interaction a même été proposé, où celui-ci joue le rôle de transporteur jusqu'au noyau, avec une translocation du complexe doxorubicine-protéasome par les pores nucléaires (**figure 5**). La plus forte affinité de la drogue pour l'ADN permettrait la dissociation du complexe (Kiyomiya *et al.*, 1998 ; Kiyomiya *et al.*, 2000 ; Kiyomiya *et al.*, 2001).

2.2 Intercalation dans l'ADN

La nature de l'intercalation de la doxorubicine dans l'ADN a été étudiée par diffraction des rayons X sur des cristaux de complexes ADN-doxorubicine. Les cycles B, C et D de

l'aglycone constituent la partie intercalée entre deux paires de bases successives de l'ADN. Le cycle A et le sucre se trouvent dans le petit sillon de l'ADN et sont associés à une fonction d'ancrage et de stabilisation sans former de liaison covalente. La doxorubicine s'intercale préférentiellement dans un doublet GC, précédé d'une Adénine ou d'une Thymine (Wang et Kang, 1999). Elle induit un déroulement du pas de la double hélice de 8° de part et d'autre du site d'intercalation et constitue une gêne directe pour les enzymes utilisant l'ADN comme matrice (Wang *et al.*, 1987; Quigley *et al.*, 1980).

2.3 Inhibition des Topoisomérases

Les topoisomérases sont des enzymes essentielles des cellules procaryotes et eucaryotes impliquées dans la régulation de la topologie de l'ADN au cours des nombreux processus du métabolisme de l'ADN (réplication, transcription, recombinaison, réparation, remodelage de la chromatine, condensation et ségrégation des chromosomes...) (Wang, 1996; Osheroff, 1998; Champoux, 2001; Wang, 2002). Il existe deux types de topoisomérases :

* Les topoisomérases de type I clivent transitoirement un brin d'une molécule d'ADN pour réaliser la rotation du brin intact autour du brin coupé. Elles contrôlent ainsi l'enroulement de l'ADN double brin, et sont impliquées dans la séparation des brins d'ADN parentaux avant la réplication. Trois topoisomérases de type I coexistent chez les mammifères, la topoisomérase I, et les topoisomérases II α et II β .

* Les topoisomérases de type II clivent transitoirement un ADN double brin pour permettre le passage d'une seconde molécule d'ADN à travers la coupure formée. Elles modulent aussi l'enroulement de l'ADN double brin, et sont impliquées plus particulièrement dans la séparation des enchevêtrements de chromosomes au cours de la réplication.

Les topoisomérases I et II sont la cible de nombreux agents cytotoxiques, qui agissent comme des poisons ou des inhibiteurs compétitifs.

2.3.1 Topoisomérases II

Chez les mammifères, la topoisomérase II existe sous deux isoformes α et β , codées par deux gènes situés sur les chromosomes 17 et 3 respectivement. Leur structure primaire est similaire. L'isoforme α a un poids moléculaire de 180 kDa, et l'isoforme β de 170 kDa (Wang,

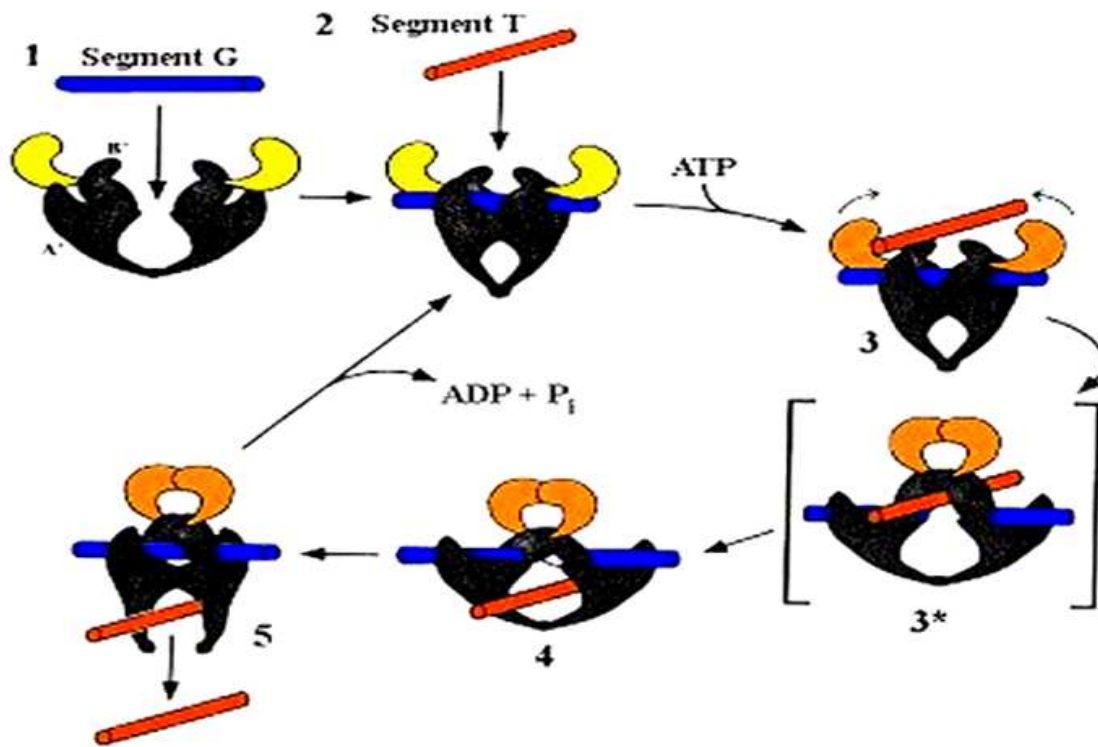


Figure 6: Mécanisme d'action des Topoisomérases II

L'enzyme correspond à l'objet symétrique noir avec une partie mobile jaune ou noire. Dans la configuration initiale (1) l'enzyme s'ouvre pour accueillir une première molécule d'ADN G (segment G bleu) puis une seconde (segment T rouge). Une fois les deux molécules en place, l'enzyme accroche deux molécules d'ATP et coupe le segment G (gate) qui laisse alors passer le segment T (transporté) au travers de cette brèche. La topoisomérase recolle alors la molécule bleue avant de relâcher les deux molécules. Le bilan global de cette réaction enzymatique est ainsi d'inverser le sens du croisement des molécules bleue et rouge (D'après Champoux, 2001).

1996 ; Champoux, 2001 ; Li et Liu, 2001). Le gène de la topoisomérase II β est soumis à un épissage alternatif donnant les formes II β -1 et II β -2 (Davies *et al.*, 1993).

Les topoisomérases II fonctionnent sous forme de dimères, chaque monomère possédant un site de liaison à l'ATP et à l'ADN. La catalyse du passage d'un brin d'ADN à travers le second se déroule en 4 étapes (Champoux, 2001 ; Capranico et Binaschi, 1998 ; Berger *et al.*, 1996 ; Wang, 1996) (**figure 6**)

- * L'enzyme se lie à une première molécule d'ADN, l'ADN-G.

- * Un complexe de clivage est formé par liaison covalente entre un résidu tyrosine du site catalytique de chacune des sous-unités de l'enzyme et les extrémités 5'-P générées lors de la coupure double brin de l'ADN-G. Ce complexe est transitoire, et la coupure générée présente des extrémités cohésives de 4 pb.

- * La liaison des deux ATP induit un changement de conformation de la topoisomérase permettant d'éloigner les extrémités de l'ADN-G coupé et de créer une ouverture à travers de laquelle le second brin d'ADN est transporté.

- * La dernière étape consiste à ressouder les extrémités de l'ADN-G, puis à le libérer. L'hydrolyse des 2 molécules d'ATP redonne sa conformation initiale à l'enzyme.

En plus de son rôle enzymatique, la topoisomérase II est une composante dynamique majeure de l'architecture nucléaire. Elle fait partie de la matrice nucléaire à l'interphase, et de l'échafaudage chromosomique durant la mitose, et serait impliquée dans l'ancrage des boucles de chromatine sur ces structures nucléaires (Christensen *et al.*, 2002 ; Null *et al.*, 2002 ; Wang, 2002 ; Agostinho *et al.*, 2004).

2.3.2 Mécanisme d'inhibition des topoisomérases

La doxorubicine stabilise le complexe de clivage sous forme d'un complexe ternaire dans lequel les brins d'ADN sont clivés et liés de façon covalente à l'enzyme. IL inhibe ainsi l'activité de re-soudure du brin d'ADN catalysée par les topoisomérases II et induisent la formation de coupures simple et double brin de l'ADN (Capranico *et al.*, 1997). La cytotoxicité des inhibiteurs de topoisomérases II dépend du nombre, de la persistance et de la position des lésions créées dans le génome.

La gestion par la cellule des complexes de clivage stabilisés et la façon dont les lésions irréversibles se forment ne sont pas complètement connues (Kaufmann, 1998). Les coupures de l'ADN sont en effet "cachées" par la topoisomérase II, et les complexes de clivage

stabilisés ne diffèrent pas des complexes normaux sauf par leur longévité (Larsen et Skladanowski, 1998). L'efficacité du médicament est en partie liée à la durée de vie des complexes stabilisés (Li et Liu, 2001 ; Errington *et al.*, 2004). Les poisons de topoisomérases II sont plus toxiques pendant la phase S. Les coupures de l'ADN sont réversibles après le retrait du médicament, particulièrement lorsqu'elles touchent des loci silencieux du génome plutôt qu'un gène dont la transcription est active (Capranico et Binaschi, 1998).

Il est probable que les lésions de l'ADN deviennent irréversibles à la suite d'interférences entre un complexe de clivage stabilisé et les "machineries" cellulaires nécessitant une matrice ADN comme la fourche de réplication, le complexe de transcription et les activités hélicases dont la fonction est de séparer les deux brins d'ADN avant la réplication et la transcription (Bachur *et al.*, 1998 ; Kaufmann *et al.*, 1998 ; Larsen et Skladanowski, 1998 ; Bachur *et al.*, 1992 ; Li et Liu, 2001). La dégradation par le protéasome 26S de la topoisomérase II β stabilisée et ubiquitinée a pu être montrée en présence de poisons des topoisomérases II. Cette dégradation pourrait représenter une des réponses de la cellule à la présence de complexes de clivage stabilisés sur l'ADN au moment du passage du complexe de transcription (Li et Liu, 2001 ; Mao *et al.*, 2001 ; Xiao *et al.*, 2003).

Une spécificité des anthracyclines pour l'une ou l'autre des isoformes n'a pas été clairement mise en évidence, car même si la doxorubicine présente une préférence pour l'isoforme α , la distribution cellulaire de la topoisomérase II β en fait également, une cible importante (Sandri *et al.*, 1996 ; Turley *et al.*, 1997 ; Palumbo *et al.*, 2002). L'inhibition des topoisomérases II est fortement sensible au ratio cellulaire ATP/ADP, et la doxorubicine agit avec les enzymes sous une conformation liée à l'ATP (Li et Liu, 2001; Wang *et al.*, 2001). Il est probable qu'elle s'intercale lorsque l'ADN est déjà clivé, d'autant plus que les coupures engendrées portent spécifiquement sur le trinuécléotide TAA qui ne correspond pas à leur site d'intercalation (Capranico *et al.*, 1997). Cette drogue est également, capable d'inhiber plus faiblement la topoisomérase I, et cette inhibition pourrait représenter un mécanisme d'action auxiliaire (Binaschi *et al.*, 2001 ; Foglesong *et al.*, 1992).

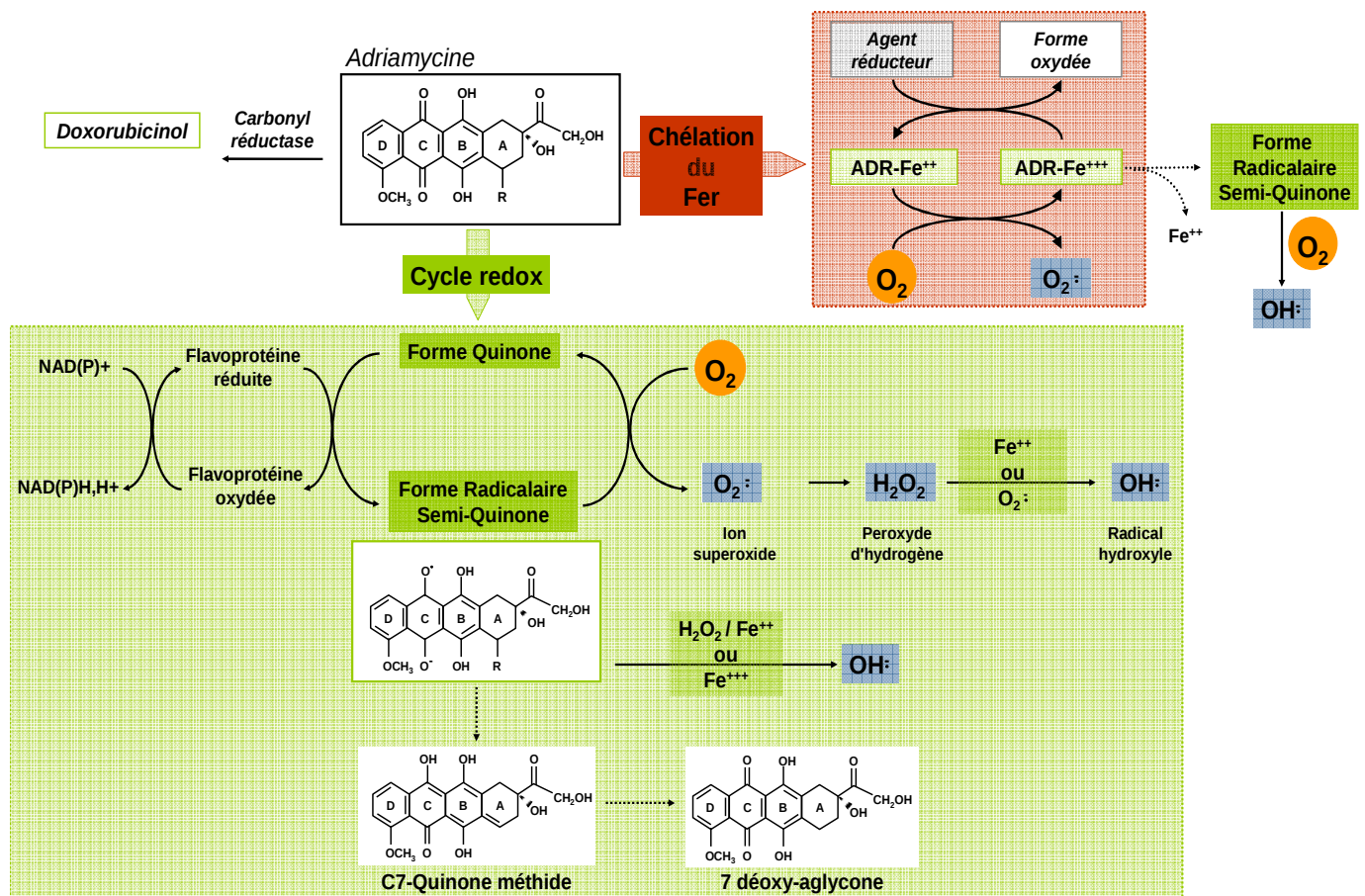


Figure 7: Représentation schématique des voies d'oxydoréduction de la doxorubicine

Deux voies principales conduisent à la formation des ROS par la doxorubicine; (i) Une réaction de réduction monoélectrique enzymatique et (ii) une chélation d'ions métalliques.

2.4 Génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS)

2.4.1 Réactions d'oxydoréduction

La doxorubicine est susceptible de conduire à la production des ROS variées au sein de la cellule par deux voies (**figure 7**):

- * Une réaction de réduction monoélectrique enzymatique (cycle rédox)
- * La chélation d'ions métalliques

Cette production des ROS est très étudiée dans la mesure où elle est à l'origine de la cardiotoxicité de la drogue puisque les cellules cardiaques possèdent peu d'enzymes de détoxification. Cependant, son implication dans l'activité antitumorale de la drogue n'est probablement pas négligeable.

* Réduction monoélectrique enzymatique

La réduction monoélectrique de la forme quinone en semiquinone radicalaire est catalysée par différentes réductases NADPH-dépendantes mitochondriale, nucléaire ou microsomale (Minotti *et al.*, 2004). Cette semiquinone instable réagit avec différentes molécules en fonction de l'état d'oxygénation de la cellule. En conditions aérobies, elle réduit l'O₂ pour former un ion superoxyde (O₂^{•-}) et redonner la quinone parentale. La dismutation de O₂^{•-} conduit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), qui donne un radical hydroxyle (OH[•]) sous l'action de O₂^{•-} ou d'un catalyseur métallique comme Fe²⁺ ou Cu²⁺ (Bachur *et al.*, 1978 ; Bachur *et al.*, 1982 ; Doroshov, 1983). En conditions anaérobies, la semiquinone réduit une seconde molécule d'anthracycline qui perd son sucre, formant ainsi une quinone-méthide très réactive et rapidement réduite en aglycone (Fisher *et al.*, 1985). La semiquinone peut également réagir avec H₂O₂/Fe²⁺ ou Fe³⁺ pour former la quinone parentale et OH[•] (Jung et Reszka, 2001)

* Chélation du fer

La Doxorubicine a d'autre part une forte affinité pour les cations di- ou trivalents avec lesquels elle forme des complexes très réactifs. En particulier, les complexes Dox-Fe²⁺ peuvent réduire l'O₂ pour donner O₂^{•-} et un complexe Dox-Fe³⁺ (Gianni *et al.*, 1985 ; Zweier *et al.*, 1984). Le cycle est complété *via* un agent réducteur comme le glutathion, une seconde molécule d'anthracycline, H₂O₂, O₂ (Minotti *et al.*, 1999 ; Jung et Reszka, 2001).

2.4.2 Effets cellulaires de la production des ROS

Les ROS sont naturellement formées au cours du métabolisme cellulaire. La cellule possède deux importants mécanismes lui permettant de se défendre contre un stress oxydatif et de maintenir le statut redox intracellulaire, à savoir un milieu réducteur composés de peptides possédant une fonction thiol (le glutathion (GSH) et la thiorédoxine (TRX)) et un système enzymatique de détoxification (Thannickal et Fanburg, 2000 ; Davis *et al.*, 2001). Cependant, en présence de la doxorubicine, les ROS sont formées au dessus des concentrations pouvant être prises en charge par les systèmes de détoxification, d'autant plus que les cellules tumorales ont déjà un métabolisme oxydatif basal accru (Pelicano *et al.*, 2004).

Que ce soit sous forme d'anthracyclines radicalaires, de H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$, ou autres, les ROS induisent l'oxydation des constituants cellulaires (lipides, protéines, ADN) altérant leurs structures et leurs fonctions. De plus, comme les formes radicalaires conservent une affinité pour l'ADN et les membranes, les ROS se forment à proximité des macromolécules biologiques cible (Gewirtz *et al.*, 1999). La peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés altère la physiologie des membranes cellulaires en induisant une diminution de leur fluidité membranaire, modifie leur perméabilité aux ions, entraîne l'inactivation d'enzymes et de récepteurs... L'oxydation des acides aminés modifie les structures secondaires et tertiaires des protéines, et entraîne des dénaturations, des fragmentations, et la formation d'agrégats. Les protéines oxydées subissent une dégradation protéolytique accrue, le plus souvent par le protéasome. Les ROS induisent des cassures des ADN et ARN, la modification de nucléotides, la formation de sites abasiques, de pontage ADN-protéine, ou d'adduits par addition de produits issus de la peroxydation lipidique comme le Malondialdéhyde (MDA). Bien qu'au niveau physiologique la mise en évidence de dommages dus aux ROS soit difficile (Gewirtz *et al.*, 1999 ; Minotti *et al.*, 2004), la présence de bases nucléotidiques oxydées de l'ADN issus de monocytes de patients traités à la doxorubicine a été rapportée (Doroshov *et al.*, 2001).

Les ROS, H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ et $\text{OH}^{\cdot}$ plus particulièrement, sont également des déterminants clefs de la signalisation cellulaire dans la réponse à de nombreux stress et de la régulation de fonctions cellulaires impliquant la prolifération, l'apoptose et la sénescence (Adler *et al.*, 1999 ; Thannickal et Fanburg, 2000). Leur action peut être directe, par altération de la

conformation et donc de l'activité de différentes protéines, ou bien indirecte suite aux variations du statut redox de la cellule (Adler *et al.*, 1999). Les ROS modulent l'activité de nombreuses protéines kinases (activation de JNK^{MAPK} (*c-Jun N-terminal Kinase*) et p38^{MAPK}, de protéines kinases; inhibition de tyrosine phosphatases...), et facteurs de transcription (NFκB, AP-1, ASK1 (*apoptosis signaling regulating kinase*)...) impliqués dans les voies de transduction et de régulation du cycle cellulaire et des réseaux pro ou anti-apoptotique (Adler *et al.*, 1999 ; Thannickal et Fanburg, 2000 ; Droge *et al.*, 2002 ; Minotti *et al.*, 2004). Elles induisent également, la production de seconds messagers comme les céramides en activant l'hydrolyse de la sphingomyéline (SM) par les sphingomyélinases acides (SMA) membranaires (Dumitru, 2007).

2.5 Formation de liaisons covalentes avec l'ADN

La doxorubicine réduite peut se lier de façon covalente à l'ADN pour former des adduits ou des ponts (*crosslink*) *in vitro* comme *in vivo* (Gewirtz *et al.*, 1999 ; Minotti *et al.*, 2004). Ces liaisons se font principalement sur les résidus Guanine de l'ADN et sont réversibles (Cullinane *et al.*, 1994 ; van Rosmalen *et al.*, 1995). Ces adduits ont une structure particulière et sont appelés "*virtual crosslink*". L'anthracycline se lie sur un résidu guanine de l'ADN *via* une molécule de formaldéhyde (CH₂O) préalablement fixée sur le sucre. La formation de liaisons hydrogènes stabilise la structure avec le second brin d'ADN (Zeman *et al.*, 1998; Yang et Wang, 1999). La production de CH₂O est observée naturellement dans les cellules, en particulier suite à un stress oxydatif. La doxorubicine crée ainsi des contraintes stériques et des courbures de l'ADN, voire même des mutations, qui vont inhiber les reconnaissances entre protéines et ADN, ou bien le passage de polymérases. La formation de ces adduits est spécifique des dinucléotides GC et GG, et certaines séquences régulatrices de facteurs de transcription, les télomères (TTAGGG)_n ou les quadruplex GGGG pourraient constituer des parties du génome plus fortement touchées par l'action de la drogue (Cutts *et al.*, 1996 ; Zeman *et al.*, 1998 ; Yang et Wang, 1999 ; Cutts *et al.*, 2003).

2.6 Interaction directe avec les membranes

La doxorubicine et les anthracyclines en général ont une très forte affinité pour les membranes lipidiques à travers lesquelles elles diffusent passivement. Elles s'associent directement avec les phospholipides par interactions de type ionique (Lavelle *et al.*, 1987). La présence d'anthracyclines au sein de la bicouche lipidique peut altérer la structure et la

fonction membranaire en modifiant les interactions lipides-lipides et lipides-protéines, notamment des protéines membranaires impliquées dans les voies de signalisation cellulaires (Escriba et al, 1995). La quantité de doxorubicine liée aux lipides corrèle avec la sensibilité des cellules (Awasthi *et al.*, 1992), et la doxorubicine couplée à des billes d'agarose l'empêchant d'entrer dans la cellule est d'ailleurs cytotoxique, probablement par simple interaction avec la membrane plasmique (Triton et Yee, 1982 ; Tokes *et al.*, 1982 ; Maestre *et al.*, 2001).

2.7 Induction de la mort cellulaire

Les voies de signalisations activées et les réponses de la cellule tumorale à la doxorubicine varient selon le contexte et le type cellulaire, la dose et la durée du traitement. L'élucidation des voies conduisant à la reconnaissance des dommages cellulaires engendrés par la doxorubicine et à l'induction finale de la mort cellulaire n'est pas complète. Elle est de plus compliquée par le fait que la doxorubicine peut avoir un effet toxique sans entrer dans la cellule, ni interagir avec l'ADN (Laurent et Jaffrezou, 2001; Minotti, 2004 ; Kim et al., 2009).

De manière générale, la cytotoxicité des anthracyclines est principalement attribuée aux lésions de l'ADN, qu'elles soient engendrées par l'inhibition des topoisomérases II, l'oxydoréduction des fonctions quinones ou l'intercalation dans l'ADN, et l'induction de la mort cellulaire par apoptose (Laurent et Jaffrezou, 2001 ; Gewirtz *et al.*, 1999). Les lésions double-brin de l'ADN vont induire un ensemble de réponse dont l'activation de la protéine P53, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN suite à leur reconnaissance par des protéines comme par exemple la kinase ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*). Elles sont extrêmement toxiques pour la cellule eucaryote, et sont prises en charge par deux systèmes de réparation, RH (*Homologous Recombination*) et NHEJ (*Non-homologous end-joining*) (Slupphaug *et al.*, 2003). Cependant, ces systèmes de réparation ne sont pas totalement fiables, et peuvent conduire à des translocations et des délétions chromosomiques, permettant également d'expliquer le potentiel carcinogène de la doxorubicine (Nitiss et Beck, 1996). Finalement, si les lésions de l'ADN ne sont pas réparées, l'apoptose peut être induite *via* la diminution de Bcl-2 et la voie mitochondriale (Kaina, 2003; Valkov et Sullivan, 2003). L'emplacement des lésions constituerait un facteur critique de l'action des anthracyclines. En fonction des gènes touchés, les réponses seraient plus ou moins délétères pour la cellule, cette

hypothèse permettant d'expliquer qu'un faible nombre de coupures puisse être cytotoxique (Binaschi *et al.*, 2001 ; Gewirtz, 1999).

Ce sont des doses relativement fortes de doxorubicine, qui induiraient l'apoptose plutôt que de faibles doses (Hanun *et al.* 1997 ; Los *et al.*, 1997 ; Roninson *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003 ; Eom *et al.*, 2005) même si la situation inverse a été rapportée (Gewirtz, 1999; Muller *et al.*, 1997).

Les cellules peuvent également mourir par sénescence, déclenchement d'une catastrophe mitotique (Kotamraju *et al.*, 2000 ; Eom, *et al.*, 2005), ou nécrose (Maestre *et al.*, 2001) en présence de la doxorubicine. Il a été démontré que l'apoptose induite par cette drogue dans différentes lignées cellulaires est médiée par les ROS via la voie intrinsèque mitochondriale et l'activation des caspases (Collins *et al.*, 2006). L'effet synergique de faibles dose de doxorubicine avec d'autres drogue pour induire un effet apoptotique dans différents carcinomes a été aussi élucidé (Keane *et al.*, 1999; Muzutani *et al.*, 1999; Yamanaka *et al.*, 2000; Lacour *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2009 ; Du *et al.*, 2009). L'apoptose est accompagnée dans certains cas de l'augmentation de l'expression des récepteurs "à domaine de mort" Fas et TRAIL-Rs en présence de la doxorubicine et de l'un des ligands TRAIL ou FasL qui participeraient à une amplification du signal (Kaufmann, 1998 ; Debatin, 2000; Kaina, 2003). L'expression de ces récepteurs peut aussi être augmentée par les céramides exogènes (Dumitru, 2007). Il a été démontré que la doxorubicine active de nombreuses protéines comme les facteurs de transcription NFκB, AP-1, les kinases p38^{MAPK} et JNK^{MAPK} et la voie PI3K/Akt, ainsi que les sphingomyélinases générant les céramides. L'activation de ces facteurs peut conduire à des réponses cellulaires tout à fait différentes, et son rôle dans l'induction de la mort cellulaire en réponse à l'adriamycine reste à déterminer (Osborn *et al.*, 1996 ; Laurent *et al.*, 2001 ; Broxterman *et al.*, 2003 ; Minotti *et al.*, 2004 ; Dumitru *et al.*, 2007).

3. Mécanismes de résistance à la doxorubicine

Les résistances aux anthracyclines sont de deux sortes (Nielsen, 1996) :

*Accompagnées d'une diminution de la concentration intracellulaire du médicament, elles sont dues à la surexpression de P-gp ou d'autres pompes membranaires.

*Non accompagnées d'une diminution de l'entrée du médicament, il s'agit au contraire d'une tolérance de la présence d'anthracyclines dans la cellule par augmentation des mécanismes de détoxification, altérations de la topoisomérase II, augmentation de la réparation de l'ADN, inhibition du processus d'apoptose...

Selon les études, ces différents mécanismes sont impliqués dans la résistance à la doxorubicine à des degrés très divers. L'évaluation de la valeur pronostique de chacun de ces mécanismes est compliquée par les modèles cellulaires et les conditions expérimentales utilisés, ainsi que la multifactorialité des mécanismes développés par la cellule.

3.1 Surexpression de pompes membranaires

Dès 1973, Dano et al montrent que des cellules résistantes à la daunorubicine excrètent activement le médicament diminuant ainsi sa concentration intracellulaire (Dano, 1973). La première protéine associée à ce phénotype fut la glycoprotéine membranaire P-gp (Juliano et Ling, 1976), et de nombreuses autres pompes membranaires ont été depuis caractérisées. Ces pompes membranaires appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette*) retrouvée chez les eucaryotes et les procaryotes. Dans le cas de la doxorubicine, la résistance des cellules tumorales implique principalement P-gp, les membres MRP1 et MRP2 de la famille MRP, ainsi que le semi-canal MXR. P-gp reste le transporteur ABC le plus étudié, dont le rôle est le mieux établi. La mise en évidence des transporteurs MRP et MXR est en revanche récente et les démonstrations de son implication dans le phénomène de résistance sont encore très partielles.

3.1.1 P-gp

Le gène MDR1 (ou ABCB1) localisé sur le chromosome 7, code une glycoprotéine de 170 kDa composée de deux domaines membranaires de 6 boucles transmembranaires chacune, et de deux boucles intracellulaires comportant deux sites de liaisons à l'ATP. Les extrémités terminales sont intracellulaires. Chez l'homme, l'expression de P-gp est restreinte à des organes spécifiques (intestin, reins, foie, placenta, barrière hémato-encéphalique). La P-gp a pour substrats des composés naturels très variés de structure hydrophobe, neutre ou cationique.

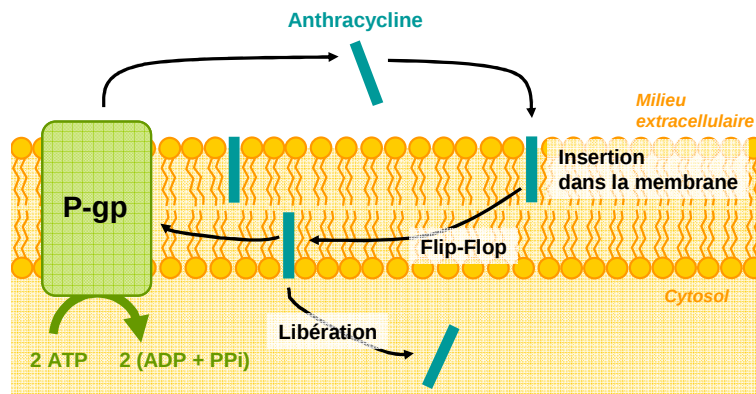


Figure 8 : Modèle de transport d'une molécule d'anthracycline par P-gp
 (d'après Borst et al., 2000)

Le mécanisme d'action de P-gp n'est pas complètement élucidé. Cependant elle ne semble pas fonctionner comme une réelle pompe, mais plutôt comme une flippase dont les substrats lui sont présentés directement à partir du feuillet interne de la bicouche lipidique. La reconnaissance du substrat impliquerait les domaines transmembranaires, et le transport d'une molécule nécessite l'hydrolyse de 2 ATP (**figure 8**). La liaison du substrat induit l'hydrolyse d'un ATP et un changement de conformation de P-gp qui permet le rejet direct du substrat dans le milieu extracellulaire ou bien dans le feuillet externe de la membrane d'où il peut diffuser vers l'extérieur. L'hydrolyse du second ATP permet à la P-gp de retrouver sa conformation initiale. Les modulateurs de l'action de P-gp entreraient en compétition avec le site de liaison du substrat. La P-gp est à l'origine de la faible biodisponibilité de nombreux médicaments au niveau des intestins et du cerveau. De manière relativement récente, il a été montré que les fonctions de P-gp ne s'arrêtent pas à son rôle de transport et de protection de l'hôte. Elle pourrait également être impliquée dans la régulation du pH intracellulaire, présenter une fonction de canal chlore et jouer un rôle dans la régulation du volume cellulaire. Il a même été montré que P-gp conférerait une résistance à la mort de la cellule passant par la dérégulation des voies d'induction de l'apoptose (Schinkel, 1997; Sharom *et al.*, 1999; Johnstone *et al.*, 1999; Kantharidis *et al.*, 2000; Borst *et al.*, 2000; Gottesman *et al.*, 2002 ; Ambudkar *et al.*, 2003 ; Ambudkar *et al.*, 2006)

La P-gp entraîne des résistances croisées aux vinca-alkaloïdes, anthracyclines, épipodophyllotoxines, taxanes et camptothécines. L'association entre la surexpression de P-gp et la résistance cellulaire à la doxorubicine a été observée sur des lignées tumorales d'origines diverses, transfectées ou sélectionnées par un anticancéreux. La P-gp est exprimée chez 30% des patients au moment du diagnostic, et dans plus 50% de cellules leucémiques au moment de la rechute. Dans les tumeurs solides, l'expression de P-gp est très variable, mais pourrait être impliquée dans la résistance des cancers du sein, des ovaires, des poumons non à petites cellules, et les sarcomes (Goldstein, 1996; Ueda *et al.*, 1999 ; Kantharidis *et al.*, 2000 ; Gottesman *et al.*, 2002 Ambudkar *et al.*, 2003).

3.1.2 Famille MRP

Le premier membre de la famille MRP a été caractérisé à partir d'une lignée résistante à la doxorubicine présentant une diminution de l'accumulation intracellulaire du médicament sans surexpression de P-gp. Neuf MRP différentes ont été décrites à ce jour. Contrairement à

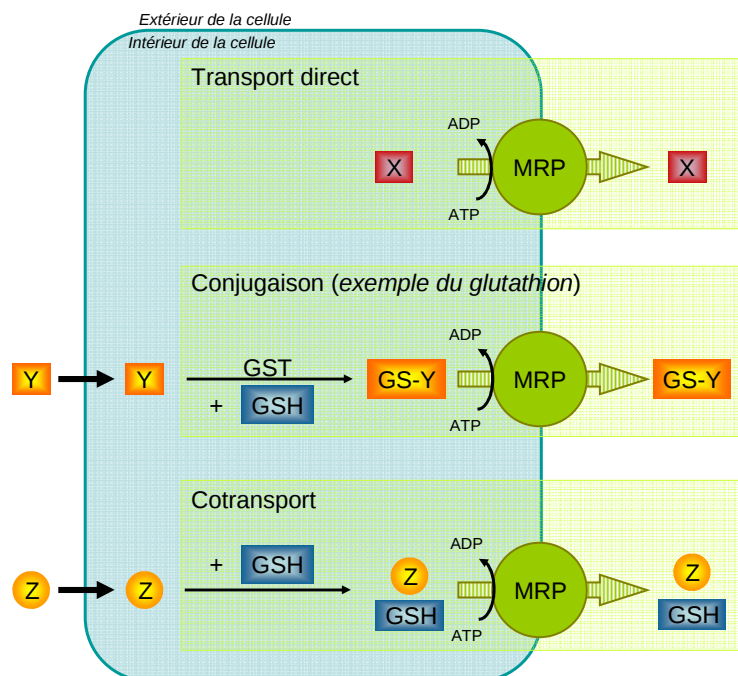


Figure 9 : Fonctionnement des MRP

MRP permet également l'efflux de nombreuses molécules seules (X). Certains médicaments (Y) sont conjugués au GSH par une GST (la conjugaison peut également se faire sous forme de composés glucuronides ou sulfates). D'autres médicaments (Z) sont cotransportés avec le GSH (D'après (Borst et al., 2000). GSH : glutathion ; GST : glutathion-S transférase ; MRP : Multidrug Related Protein

P-gp, les substrats des MRP peuvent être des composés organiques anioniques conjugués. Les MRP réalisent le transport à partir du cytoplasme de façon directe, que le substrat soit conjugué ou non, ou par un co-transport avec une molécule de GSH et confèrent ainsi la résistance aux anthracyclines (**figure 9**) (Kruh et Belinsky, 2003 ; Ambudkar *et al.*, 2000 ; Borst *et al.*, 2000).

3.1.3 MXR

Ce transporteur a été cloné simultanément par plusieurs équipes, à partir d'une lignée de carcinome mammaire résistante à la daunorubicine (Doyle *et al.*, 1998) et porte 3 noms : BCRP (*breast cancer resistance protein*), MXR (*mitoxantrone resistance protein*), et ABC-P (*placenta ABC protein*). Le gène ABCG2 codant MXR est situé sur le chromosome 4. MXR est un demi-transporteur, avec un domaine membranaire et un domaine ATPase intracellulaire, et fonctionne sous forme d'homodimère. MXR est exprimée dans de très nombreux tissus, et fortement par les cellules du placenta, intestin, foie, et certaines cellules souches hématopoïétiques. Il semble exclusivement exprimée à la membrane plasmique (Abbott, 2003 ; Ambudkar *et al.*, 2003 ; Doyle et Ross, 2003).

Dans des cellules sélectionnées par traitement à la doxorubicine, MXR est surexprimé par amplification ou translocation chromosomique du gène (Allen et Schinkel, 2002 ; Gottesman *et al.*, 2002).

3.2 Enzymes de détoxification: Système dépendant du glutathion

La surexpression des enzymes de détoxification permet aux cellules tumorales de résister aux anthracyclines en éliminant les dégâts cellulaires et les espèces radicalaires générées au cours du stress oxydatif plutôt que de l'anthracycline elle-même. La résistance à l'adriamycine n'est pas toujours corrélée à une augmentation de tous les systèmes de détoxification, mais ces enzymes peuvent avoir des rôles multiples dans la cellule et il est probable qu'une balance existe entre ces systèmes redondants.

Le GSH, la forme réduite du glutathion est un antioxydant intracellulaire essentiel au maintien du statut redox de la cellule, à la détoxification de composés électrophiles, l'élimination de radicaux libres et la réduction de peroxydes. Il réagit avec ses substrats

endogènes et exogènes spontanément ou par catalyse par les GST et les glutathion peroxydases (GPx) (McLellan et Wolf, 1999).

Le système GSH/GST est impliqué dans la résistance tumorale à de nombreux anticancéreux (moutardes azotées, nitrosourées, cisplatine, anthracyclines) en permettant à la cellule d'atténuer leur activité par conjugaison et/ou de lutter contre leurs effets cellulaires.

La quantité intracellulaire de GSH est un facteur important de l'efficacité de la doxorubicine. L'inhibition de la γ -GCS, l'enzyme limitante de la synthèse du GSH, par le BSO (L-buthionine-S-sulphoximine) induit la déplétion en GSH et sensibilise les cellules à l'adriamycine. L'augmentation de la sous-unité catalytique de la γ -GCS (Tipnis *et al.*, 1999 ; Kigawa *et al.*, 1998) ou de façon plus ponctuelle de la GR (Zhang *et al.*, 1999), est associée à une augmentation du taux intracellulaire de GSH et à la résistance de nombreux types de cellules. L'augmentation des taux de GSH et/ou de GST est souvent observée après sélection de lignées tumorales par des agents anticancéreux. La surexpression des GST est également associée à un phénotype de résistance, et retrouvée dans des cellules tumorales provenant de patients résistants aux traitements.

L'ensemble des enzymes de détoxification et de leurs interactions doit être pris en compte lors de l'évaluation de leur contribution dans un phénomène de résistance. Il est en effet probable qu'une augmentation de GST n'entraîne pas d'augmentation de la conjugaison en présence d'un taux limité de GSH par exemple. De la même façon, le niveau d'expression des transporteurs, comme MRP1, impliqués entre autre dans l'efflux de molécules conjuguées, est également critique (McLellan et Wolf, 1999). La transfection simultanée de MRP1, GST π et γ -GCS, par exemple, augmente la résistance à l'adriamycine (ou d'autres anticancéreux) par rapport à une transfection simple (O'Brien *et al.*, 2000 ; Morrow *et al.*, 1998). La corrélation de l'expression et/ou la co-surexpression de plusieurs enzymes du système de détoxification a également été rapportée, en particulier celle de γ -GCS et MRP1, dans de nombreux types cellulaires (Kuo *et al.*, 1998 ; Ogretmen *et al.*, 1998).

3.3 Modification de la cible: Topoisomérase II

L'événement critique de l'action des anthracyclines est la formation, puis la stabilisation, du complexe de clivage topoisomérase II-ADN-anthracycline. Toute diminution de l'interaction des trois partenaires peut entraîner une résistance: changement de la structure de l'ADN, diminution de la quantité d'enzyme, altération de la localisation cellulaire ou des modifications post transcriptionnelles, mutations... (Larsen et Skladanowski, 1998). L'altération des topoisomérases II induit des résistances croisées (épipodophyllotoxines, aminoacridines, anthracyclines classiques), et les cellules conservent une sensibilité aux antimitotiques, antimétaboliques et inhibiteurs de topoisomérases I si elles ne présentent pas d'autres mécanismes de résistances (Nitiss et Beck, 1996).

3. 3.1 Altérations quantitatives

Le taux de topoisomérase II dans la cellule corrèle avec la sensibilité au médicament, et la diminution de l'activité, de l'expression des ARNm ou de la protéine est souvent observée dans les cellules résistantes à l'adriamycine (Dingemans *et al.*, 1998 ; Larsen et Skladanowski, 1998). Le rôle de chacune des deux isoformes de topoisomérases II α et β dans la résistance aux anthracyclines n'est pas clairement établi, et les études ont souvent porté plutôt sur l'isoforme II α . Les travaux réalisés sur des lignées cellulaires d'origine diverses ont associé une faible expression de la topoisomérase II α (Son *et al.*, 1998) et/ou de la topoisomérase β (Evans *et al.*, 1994 ; Brown *et al.*, 1995) à la résistance des cellules aux inhibiteurs de topoisomérases II. La transfection de l'isoforme II α restaure la sensibilité dans des cellules leucémiques résistantes à la doxorubicine (McPherson *et al.*, 1997).

De la même façon, dans certaines études c'est l'augmentation de l'expression de la topoisomérase II β qui a été associée à une résistance au traitement (Dingemans *et al.*, 1999 ; Robert et Larsen, 1998 ; Gieseler *et al.*, 1996).

La diminution de l'expression des topoisomérases II α et/ou β dans différents types de cancer a également été rapportée en réponse au traitement par des inhibiteurs de topoisomérase II, ou au moment de la rechute par rapport à la tumeur primitive (Dingemans *et*

al., 1998). Les variations interindividuelles de l'expression des topoisomérases II α et II β 1 et β 2 sont très grandes (Sandri *et al.*, 1996 ; Larsen et Skladanowski, 1998).

3. 3.2 Altérations qualitatives

*Mutations

Des mutations des topoisomérases II, situées en particulier dans la région du site de liaison à l'ATP ou du site catalytique, peuvent être liées à la résistance tumorale. Elles ont été mises en évidence principalement sur des modèles de lignées sélectionnées par traitement aux inhibiteurs de topoisomérases II. La majorité des mutations confèrent une résistance à toutes les classes d'inhibiteurs de topoisomérase II, même si celle-ci est plus faible envers les agents qui n'ont pas servi à la sélection. Certaines mutations ont été décrites *in vivo*, à partir de cellules issues de prélèvements, mais leur implication dans une éventuelle résistance n'est pas évaluée (Dingemans *et al.*, 1998 ; Larsen et Skladanowski, 1998 ; Robert et Larsen, 1998).

*Localisation cellulaire

L'épissage alternatif de l'extrémité carboxy-terminale qui contient probablement le peptide signal de translocation nucléaire produit une forme courte de la topoisomérase II α (160 kDa) dans une lignée de cancer du poumon à petites cellules résistante à la doxorubicine et sélectionnée pour sa résistance au VP16. Cette forme courte garde une activité catalytique normale, mais reste dans le cytoplasme, la forme longue ayant une localisation nucléaire (Feldhoff *et al.*, 1994 ; Mirski et Cole, 1995). Le changement de localisation subcellulaire de la topoisomérase II α a aussi été montré dans la résistance à l'étoposide (Oloumi *et al.*, 2000).

3.4 Réparation de l'ADN

L'évaluation de la réparation des dommages de l'ADN ou d'une tolérance aux dommages cellulaires dans la résistance cellulaire aux anthracyclines est encore très partielle (Nielsen *et al.*, 1996 ; Larsen et Skladanowski, 1998). Les cellules déficientes en MMR montrent une résistance à l'adriamycine. L'implication du déficit en MMR dans la résistance n'est pas élucidée. De façon normale, le système MMR pourrait servir de détecteur du complexe ADN-topoisomérase II-ADN clivé, ou bien stabiliser le complexe de clivage et

augmente ainsi les lésions de l'ADN. En présence d'un déficit en MMR, le premier modèle induirait une diminution de l'apoptose, et le second une diminution directe des dommages de l'ADN (Fedier et Fink, 2004 ; Lage and Dietel, 1999). La surexpression de la tyrosyl DNA phosphodiesterase 1 (TDP1), enzyme qui hydrolyse les liaisons phosphodiester entre une tyrosine et une extrémité 5'-P pourrait être impliquée dans la résistance aux inhibiteurs de topoisomérase II comme le VP16 (Barthelme *et al.*, 2004).

III. La mort cellulaire

1. Généralités

La mort cellulaire est un processus qui survient soit spontanément soit en présence d'agents cytotoxiques. Les études morphologiques de cellules ont permis d'établir l'existence de deux types majeurs de mort cellulaire: la nécrose et l'apoptose (ou mort programmée). La nécrose est une mort dégénérative, qui peut être déclenchée accidentellement ou intentionnellement en présence d'agents cytotoxiques ou par des dommages physiques. Du point de vue morphologique, les cellules qui meurent par nécrose sont caractérisées par la vacuolisation du cytoplasme et la perméabilisation de la membrane plasmique qui conduit à la perte du contenu. Un tel processus peut être à l'origine d'inflammations et de dommages au niveau des tissus (Proskuryakov *et al.*, 2003). L'apoptose est un processus de mort programmée qui peut être issue des mêmes origines que la nécrose, sauf qu'il s'agit d'un processus qui est contrôlé par un ensemble de mécanismes cellulaires précis et ordonné en différentes étapes qui seront détaillées dans les pages suivantes.

Enfin, des études ont mis en évidence l'existence d'autres types de mort cellulaire, qui peuvent être dépendants ou indépendants de l'apoptose. Il s'agit de la mort cellulaire par autophagie, la paraptose et la mort cellulaire par sénescence. L'autophagie est caractérisée par la formation d'une vésicule cytosolique, l'autophagosome, qui encapsule les organelles entières et notamment les mitochondries. L'autophagosome va pouvoir fusionner ensuite avec le lysosome où le contenu sera recyclé (Lockshin and Zakeri, 2002). Par opposition à l'apoptose, l'autophagie nécessite un cytosquelette intact (Ogier-Denis and Codogno, 2003). Il a été montré chez la levure, le *Dictyostelium* et le *C.elegans* que l'autophagie représente un mécanisme de survie utilisé pour permettre à ces organismes

de survivre lorsque les conditions nutritives d'énergie sont limitées (Levine and Klionsky, 2004). Chez l'homme, des cellules autophagiques sont observées souvent dans les maladies neurodégénératives tels que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. La paraptose est une forme de mort qui a été observé chez les neurones. Cette mort est insensible aux inhibiteurs de caspase et à Bcl-xL, requiert la synthèse protéique. La paraptose n'entraîne pas de dégradation de l'ADN ni de formation de corps apoptotique. Comme l'autophagie, la paraptose est caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme qui provient d'un gonflement des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Sperandio and Bredesen, 2000). La mort cellulaire par sénescence, au sens morphologique, désigne toutes les modifications non-pathologiques que nous trouvons au cours du vieillissement. Les cellules perdent leur capacité à se diviser. Un tel phénomène est observé suite à l'endommagement d'ADN ou après le raccourcissement des télomères (Lou et Chen, 2006).

2. La mort cellulaire par apoptose

2.1 Généralités

Le terme apoptose a été utilisé pour la première fois par Kerr, Wyllie, et Currie en 1972 pour décrire une forme de mort cellulaire morphologiquement distincte de mort cellulaire (Kerr *et al.*, 1972 ; Kerr, 2002 ;). L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée (programmed cell death ou PCD) qui implique le « suicide » des cellules à l'état individuel en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. L'apoptose nécessite beaucoup d'énergie, elle subit un ensemble de mécanismes de régulation et engage un grand nombre de voies de la signalisation cellulaire. Les composants de ces voies sont codés par le génome, exprimés et prêts à être activés lorsque le *stimulus*-inducteur de la mort cellulaire apparaît (Hengartner, 2000). Ce processus apoptotique est nécessaire lors du développement d'un organisme durant les changements morphologiques qu'il subit à l'embryogenèse, ainsi que pendant l'activation du système immunitaire (Siegel, 2006). Cette activité est essentielle dans le maintien du nombre de cellules dans les tissus et de manière générale, dans le maintien de l'équilibre de l'organisme.

Une apoptose défectueuse a pour conséquence le développement de cancers, de pathologies auto-immunes et de maladies d'origine virale alors qu'une apoptose excessive

peut conduire au développement de désordres neurodégénératifs (Rathmell et Thompson, 2002).

Schématiquement, on peut diviser le processus apoptotique en quatre étapes ordonnées bien distinctes :

- Une phase d'initiation durant laquelle la cellule intègre tous les signaux environnementaux, apoptotiques ou non, qui lui parviennent en permanence et qui conditionnent son devenir.
- Une phase de décision où la cellule s'engage vers la voie du suicide après intégration du signal apoptotique. La machinerie apoptotique se met en place par l'intervention notamment des caspases et des protéines de la famille Bcl-2.
- Une phase d'exécution pendant laquelle le clivage par les caspases de nombreuses protéines, conduit la cellule à subir des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.
- Une phase de phagocytose. Cette étape indispensable prévient en particulier une nécrose secondaire qui s'accompagnerait d'une libération du contenu cellulaire toxique pour les cellules avoisinantes et donc d'une réaction inflammatoire locale.

Plusieurs *stimuli* intra et extra-cellulaires sont à l'origine de l'enclenchement d'un processus apoptotique. Par exemple, l'absence de facteurs de croissance peut être suffisante pour induire l'apoptose au même titre que l'ADN endommagé, le stress oxydatif, le traitement avec des molécules cytotoxiques ou l'irradiation ainsi que l'interruption de la signalisation qui régule le cycle cellulaire.

Il existe deux voies de signalisation principales qui contrôlent le déroulement de l'apoptose : la voie extrinsèque ou celle des récepteurs extracellulaires et la voie intrinsèque ou mitochondriale. Le signal apoptotique implique l'activation de nombreux enzymes qui font partie de deux grandes familles : celle des caspases et celle des protéines de la famille Bcl-2. Les caspases ont un rôle important dans les processus de dégradation des organites cellulaires, alors que les protéines Bcl-2 participent au maintien et à la propagation du signal (Kim, 2006).

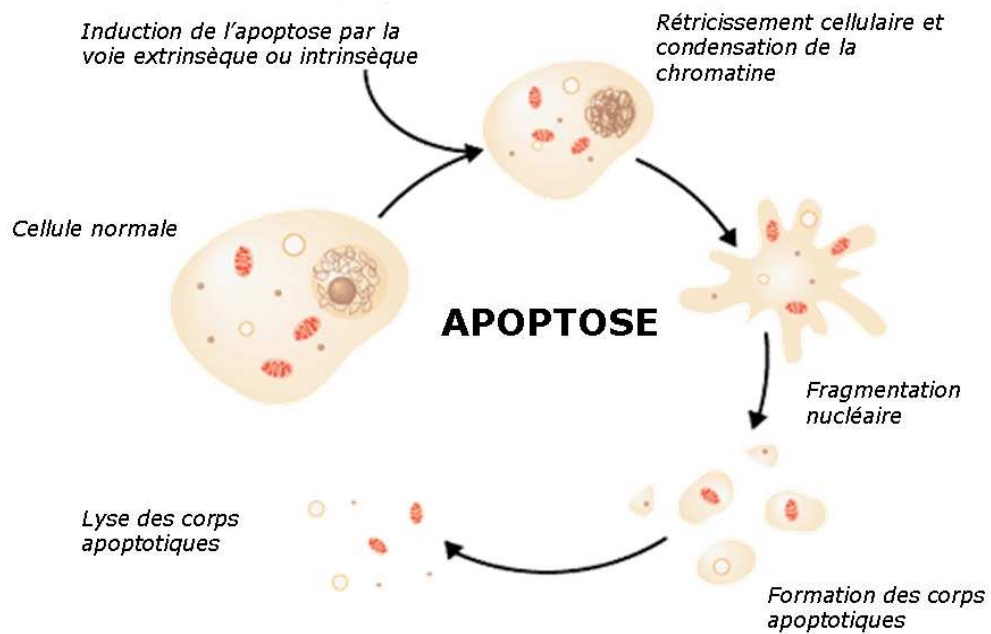


Figure 10: Evènements morphologiques au cours de l'apoptose

Le processus d'apoptose est déclenché suite aux signaux émis par une cellule voisine. La cellule en apoptose transmet un signal indiquant aux phagocytes, qui font partie du système immunitaire, d'effectuer leur travail de phagocytose.

2.2 Modifications morphologiques de la cellule

L'un des premiers changements morphologiques est une condensation du cytoplasme qui s'accompagne d'un rétrécissement cellulaire dû au relargage par la cellule d'eau et d'ions dans le milieu environnant (Wyllie *et al.*, 1980). Ceci conduit dans le cas des cellules adhérentes à une perte de contact avec les cellules voisines. Ces événements sont immédiatement suivis de la formation d'une multitude de protubérances dynamiques à la surface de la membrane plasmique. Lorsque l'on observe les cellules, ce phénomène transitoire donne l'impression d'un « bouillonnement » membranaire que l'on appelle plus couramment « blebbing » (Robertson *et al.*, 1978). Suit une condensation de la chromatine le long de la membrane nucléaire puis une fragmentation du noyau. A ce stade, si la cellule n'est pas éliminée par phagocytose, elle se démantèle en de nombreuses vésicules contenant différents organites cellulaires (mitochondries, réticulum, fragments nucléaires...) entourés par une membrane plasmique intacte: les « corps apoptotiques » (Dive *et al.*, 1992). Ceux-ci seront phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines (**figure 10**). Diverses autres modifications morphologiques ont été observées au cours de l'apoptose, telles que le gonflement, la condensation et la fission de la mitochondrie.

2.3 Modifications nucléaires

Au niveau nucléaire, l'apoptose s'accompagne de plusieurs modifications caractéristiques dont l'une des plus remarquables, qui a d'ailleurs contribué à la définir, est la fragmentation régulière de l'ADN. Celle-ci est précédée par une condensation de la chromatine en périphérie du noyau. Une première étape conduit à la formation de fragments de chromatine de 50 à 300 kilobases (Oberhammer *et al.*, 1993). Puis, dans un deuxième temps, mais de façon non systématique et en fonction du type cellulaire, des coupures s'opèrent au niveau des sites internucléosomaux, libérant les nucléosomes, fragments multiples de 180 à 200 paires de bases. Elles sont dues à l'action d'une nucléase spécifique, la DFF/CAD (DNA Fragmentation Factor 40/Caspase-activated deoxyribonuclease). Il a été aussi rapporté que l'endonucléase G mitochondriale pouvait être impliquée dans la fragmentation nucléosomale de l'ADN, et ce d'une manière indépendante des caspases.

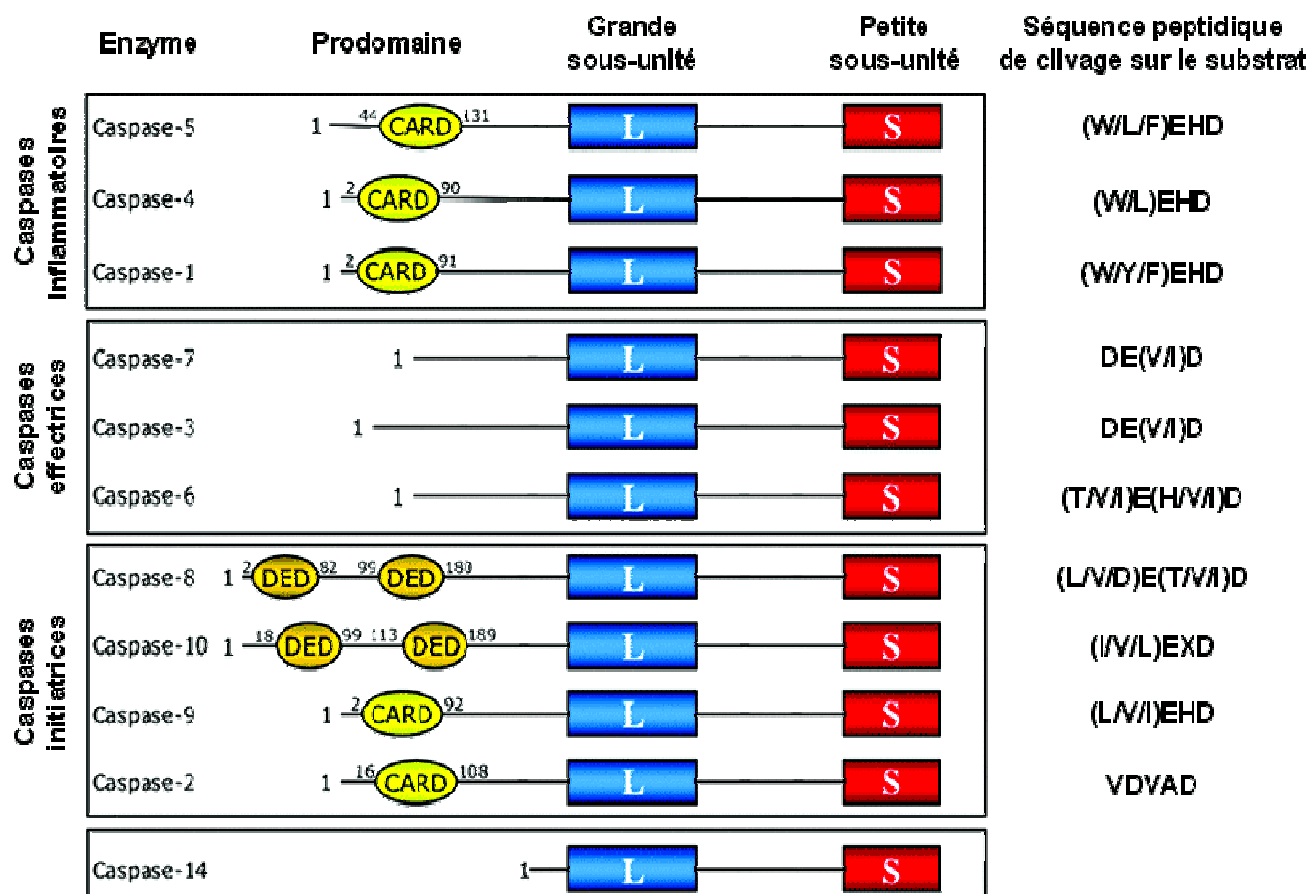


Figure 11: Les différentes classes de caspases humaines (modifiée d'après Fuentes-Prior, 2004)

Les caspases peuvent être subdivisées en trois grands groupes: selon leur site spécifique de reconnaissance du substrat, selon leur structure ou selon leur fonction biologique. Le premier groupe comprend les caspases-1, -4 et -5. Les deux autres groupes sont constitués des caspases qui jouent un rôle majeur dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiateuses et d'autre part les caspases effectrices. Les caspases-8 et -10 possèdent un motif DED permettant leur recrutement dans le DISC au niveau de récepteurs de mort. Les caspases-2 et -9 possèdent quant à elles, un motif CARD (caspase recruitment domain) qui permet leur recrutement au niveau de l'apoptosome. Il est à noter que ces domaines CARD sont également présents chez les caspases inflammatoires. Les caspases effectrices -3, -6 et -7 sont caractérisées par un prodomaine court.

L'observation en microscopie sous excitation UV, après marquage au Hoechst 33342, permet de visualiser la condensation de la chromatine. Par ailleurs, la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN donne, après électrophorèse de l'ADN en gel d'agarose, un profil dit en « barreau d'échelle ».

3. Induction de l'apoptose

3.1 Les caspases

3.1.1 Structure et classification

Les caspases (CysteinyI-ASpartate-SPECific proteASES) sont des enzymes protéolytiques qui représentent les facteurs typiques de l'apoptose. Chez les mammifères, on connaît actuellement 14 membres de cette famille, numérotés selon leur ordre de découverte. Il y a 7 caspases responsables de l'apoptose qui sont divisées en deux groupes (**figure 11**):

- les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10), qui possèdent une région N-terminale longue (prodomaine).
- les caspases effectrices (3, 6 et 7), qui possèdent une région N-terminale courte.

Les autres caspases interviennent dans l'inflammation et l'activation des cytokines. La caspase-12 est issue d'un pseudogène. Elle est localisée chez la souris au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Elle est activée suite à un stress du RE, telle que la rupture de l'homéostasie du Ca^{2+} . Les caspases sont synthétisées en tant que pro-enzymes avec une faible activité intrinsèque. Leur activation nécessite une maturation protéolytique ou une interaction avec un activateur allostérique. La structure des caspases à l'état inactif est constituée d'une unité protéique large d'environ 20 kDa et d'une sous unité protéique d'environ 10 kDa. Le site d'interaction protéine-protéine se situe au niveau du domaine N-terminal et il se différencie en domaine DED pour « Death Effector Domain » et CARD pour « CASpase Recruitment Domain ». Le domaine DED permet l'interaction avec d'autres molécules qui contiennent également le site DED, alors que le site CARD permet aux caspases de s'associer à d'autres caspases ou molécules adaptatrices. Le large sous unité de 20 kDa contient le site catalytique qui comprend un résidu cystéine (C) localisé au centre du motif QACXG (où X= R, Q ou G). Il est activé lorsqu'il s'associe à la petite sous unité après clivage. Des études cristallographiques ont montré, que les caspases activées forment des

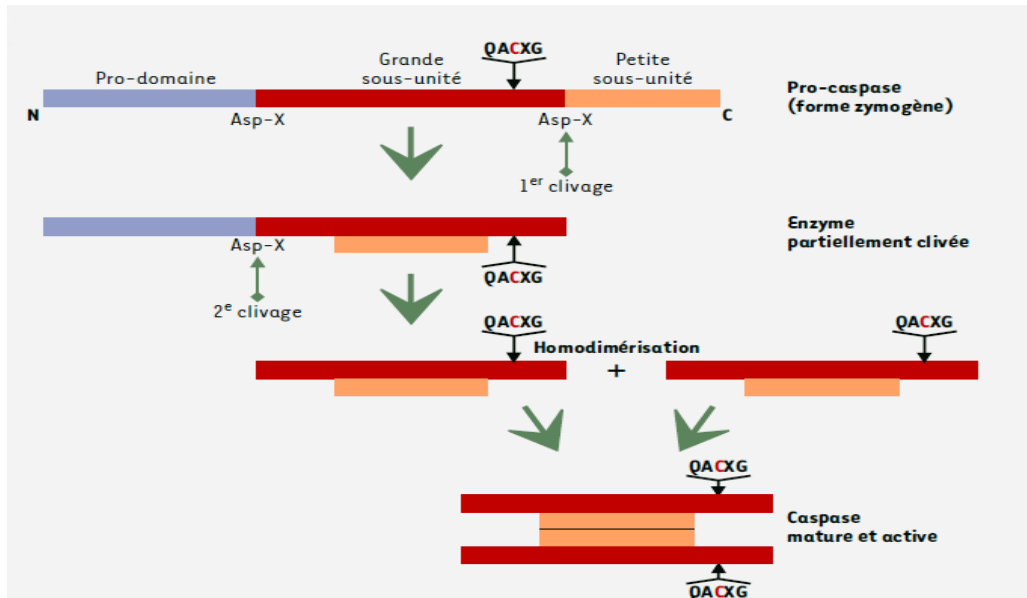


Figure 12 : Structure et activation des caspases

Dans leur forme inactive (zymogène), ces enzymes sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité (portant le site catalytique) et d'une petite sous-unité. Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande, conduit à la formation de la forme active de l'enzyme: deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant donc deux sites catalytiques.

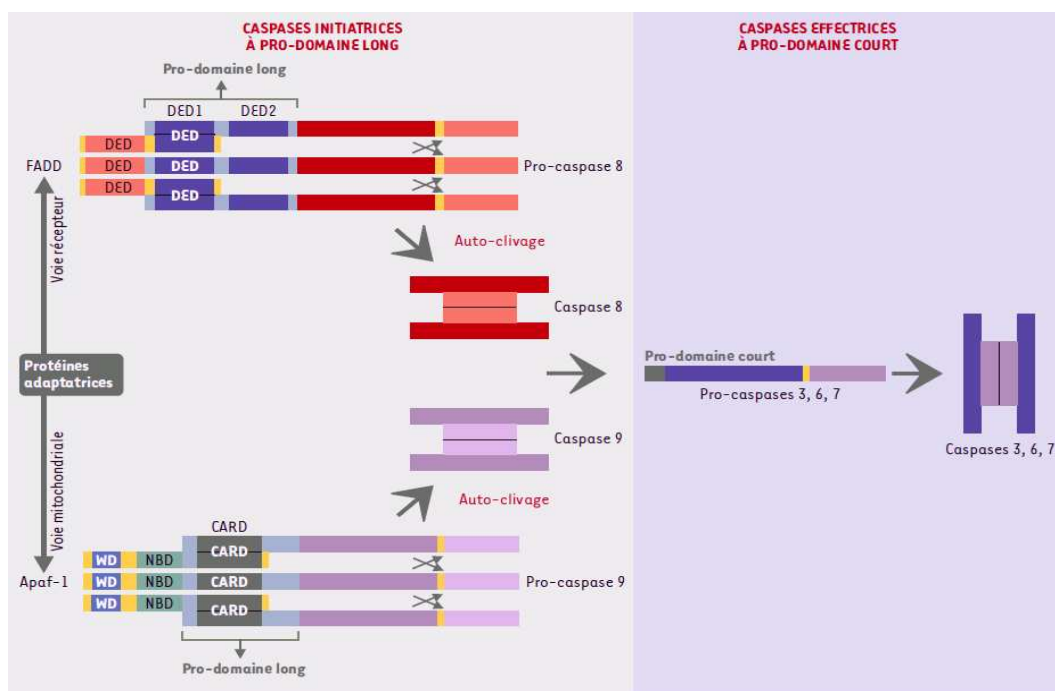


Figure 13. Exemple d'activation séquentielle des caspases

Les pro-caspases initiatrices possédant un long pro-domaine (pro-caspase 8 ou 9) s'auto-clivent à la suite de leur interaction avec des protéines adaptatrices possédant des motifs identiques (DED ou CARD), puis activent des pro-caspases à pro-domaine court comme la pro-caspase 3.

L'activation des pro-caspases se déroule en deux étapes au niveau de sites consensus, toujours après la liaison Asp-X (Amarante-Mendes and Green, 1999) (**figure 12**).

3.1.2 Activation des caspases

Etant donné l'importance des caspases dans le processus apoptotique, leur activation est bien entendu extrêmement régulée. A ce jour, trois mécanismes d'activation ont été identifiés (**figure 13**).

(i) *Activation par proximité induite.*

La caspase-8 est la plus en amont de la cascade apoptotique induite par les récepteurs dits de mort cellulaire. L'un des plus connus est le récepteur CD95 qui sera abordé plus loin. Ces récepteurs transmembranaires, lorsqu'ils fixent leur ligand, se regroupent pour former des complexes associés à la membrane. Leurs domaines intracellulaires deviennent alors capables de recruter grâce à des protéines adaptatrices, baptisées FADD (Fas Associated Death Domain), plusieurs molécules de procaspase-8. Ceci se traduit par une grande concentration locale en zymogène. Il semble que, dans ces conditions très particulières, la faible activité intrinsèque de la procaspase-8 soit suffisante pour que les proenzymes se clivent mutuellement et s'autoactivent les unes les autres.

(ii) *Association avec une sous-unité activatrice*

Le mécanisme d'activation de la caspase 9 est très différent de ceux décrits précédemment. En effet, le clivage protéolytique de cette caspase n'a que peu d'effet sur son activité enzymatique. En fait, l'activation de la caspase 9 passe par son association avec deux cofacteurs protéiques Apaf-1 et le cytochrome c. La sortie du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol constitue une des étapes clé de cette activation. Ainsi, la voie de signalisation apoptotique dite intrinsèque est dépendante de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. La liaison du cytochrome c cytosolique à Apaf-1 induit un changement de conformation de ce dernier qui peut alors fixer l'ATP ou le dATP. Ceci conduit, avec l'hydrolyse de l'ATP, à un second changement conformationnel d'Apaf-1 permettant l'exposition de son domaine CARD et favorisant la formation de l'apoptosome qui est le résultat de l'association de sept protéines Apaf-1 (**figure 14**). La pro-caspase-9 est simultanément recrutée par interaction homotypique entre son propre domaine CARD et celui

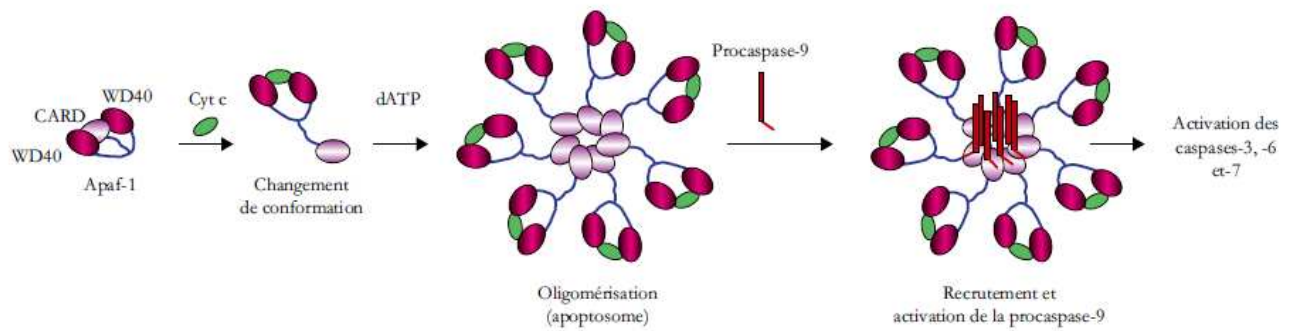


Figure 14: Apoptosome

Au cours de l'apoptose, le cytochrome c (cytc c) relargué de la mitochondrie va se fixer sur la région carboxy-terminale d'Apaf1, riche en répétitions WD40. Cette fixation induit un changement de conformation de cette protéine qui, en présence de dATP, va s'oligomériser en une structure heptamérique (« en roue »), l'apoptosome. Cette structure va recruter et activer la procaspase 9. Celle-ci, à son tour, active la cascade des caspases dont les caspases 7 et 3.

permettant l'exposition de son domaine CARD et favorisant la formation de l'apoptosome qui est le résultat de l'association de sept protéines Apaf-1 (**figure 14**). La pro-caspase-9 est simultanément recrutée par interaction homotypique entre son propre domaine CARD et celui d'Apaf-1. Elle subit alors un changement de conformation induisant une augmentation de son activité catalytique d'un facteur mille. L'héptamérisation de Apaf-1 semble nécessaire à l'activation de la caspase-9 (Acehan *et al.*, 2002). Une fois activée par autoclivage, la caspase-9 est libérée dans le cytosol où elle va être capable d'activer les caspases en aval, comme la caspase-3.

(iii) *Activation par une autre caspase*

La plupart des caspases sont activées par deux clivages protéolytiques du zymogène : le premier entre les domaines p20 et p10, le second entre le prodomaine et le domaine p20. Tous ces sites de clivage sont des sites du type Asp-X qui sont donc potentiellement des sites reconnus par ces protéases. Ceci a suggéré la possibilité d'une activation autocatalytique des caspases. De fait, la façon la plus simple d'activer une caspase est de l'exposer à l'action d'une autre caspase déjà activée. Cette stratégie d'activation, typique des processus en cascade, est utilisée pour l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7. Elle est très efficace pour amplifier les signaux proapoptotiques mais elle ne permet pas d'expliquer l'initiation de mécanisme à savoir comment les caspases initiateuses les plus en amont de la cascade sont activées. Deux autres approches au moins sont exploitées par la cellule.

En résumé, il apparaît que les caspases effectrices sont généralement activées par protéolyse par une caspase située en amont de la cascade alors que les caspases initiateuses sont activées par des interactions entre protéines.

3.1.3 Substrats des caspases

Les caspases activées sont capables de se cliver entre elles, ce qui permet une amplification du signal apoptotique. Par ailleurs, leur activité protéolytique s'exerce sur de nombreuses autres protéines et près de 300 substrats ont été identifiés à ce jour. Bien que généralement les conséquences de ces clivages soient encore mal comprises, certaines coupures de substrats ont été décrites comme étant impliquées dans des modifications morphologiques et biochimiques. La protéolyse induit une inactivation ou une dérégulation de l'activité des protéines cible qui peuvent être cytoplasmiques ou nucléaires et qui participent à

de nombreuses fonctions cellulaires. Les différents substrats peuvent être répartis en groupes fonctionnels :

*Le groupe I est constitué de protéines régulatrices de l'apoptose tels que Bid ou Bcl-2, respectivement membre pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont le clivage entraîne leur conversion en facteur pro-apoptotique.

*Le groupe II rassemble les substrats impliqués dans l'adhésion et les interactions cellulaires. Leur clivage a lieu dans les étapes précoces de l'apoptose des cellules adhérentes, notamment au moment de la rétraction cellulaire. Ainsi, l'hydrolyse de la paxillin (Lesay *et al.*, 2001), de FAK (Focal Adhesion Kinase) (Levkau *et al.*, 1998) ou encore de CAS (Crk-associated substrate) (Bannerman *et al.*, 1998) est responsable du démantèlement des complexes focaux (points d'ancrage avec la matrice extracellulaire), alors que celle des cadhérines, des caténines et de la plakophiline-1 contribue à rompre les contacts intercellulaires.

*Le groupe III est composé des substrats ayant une fonction structurale telles que les protéines responsables de l'architecture et de la régulation du cytosquelette (gelsoline, fodrine, Cdc 42...). Certaines de ces protéolyses entraînent des modifications morphologiques comme le clivage de ROCK I par la caspase-3 qui conduit au 'blebbing' membranaire (Sebbagh *et al.*, 2001).

*Le groupe IV rassemble de nombreux substrats impliqués dans la régulation de l'expression des protéines au niveau de la transcription, de l'épissage ou de la traduction.

*Le groupe V est constitué de substrats jouant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réplication et la réparation de l'ADN (la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP), Acinus...). Certaines de ces protéases ont été très étudiées comme ICAD, inhibiteur de la nucléase CAD (Caspase-activated Dnase), dont le clivage se traduit par la libération de la sous-unité catalytique de CAD responsable de la fragmentation oligonucléosomale de l'ADN (Enari, M, 1998) ou comme Acinus, qui participe à la condensation de la chromatine (Sahara *et al.*, 1999).

* Le groupe VI comprend les substrats dont le produit de clivage aboutit généralement à une dérégulation des signaux de signalisation. Les kinases et les phosphatases y sont particulièrement bien représentées.

Les caspases peuvent donc agir sur la majorité des fonctions cellulaires et cette grande diversité de substrats semble indispensable à l'exécution du programme apoptotique.

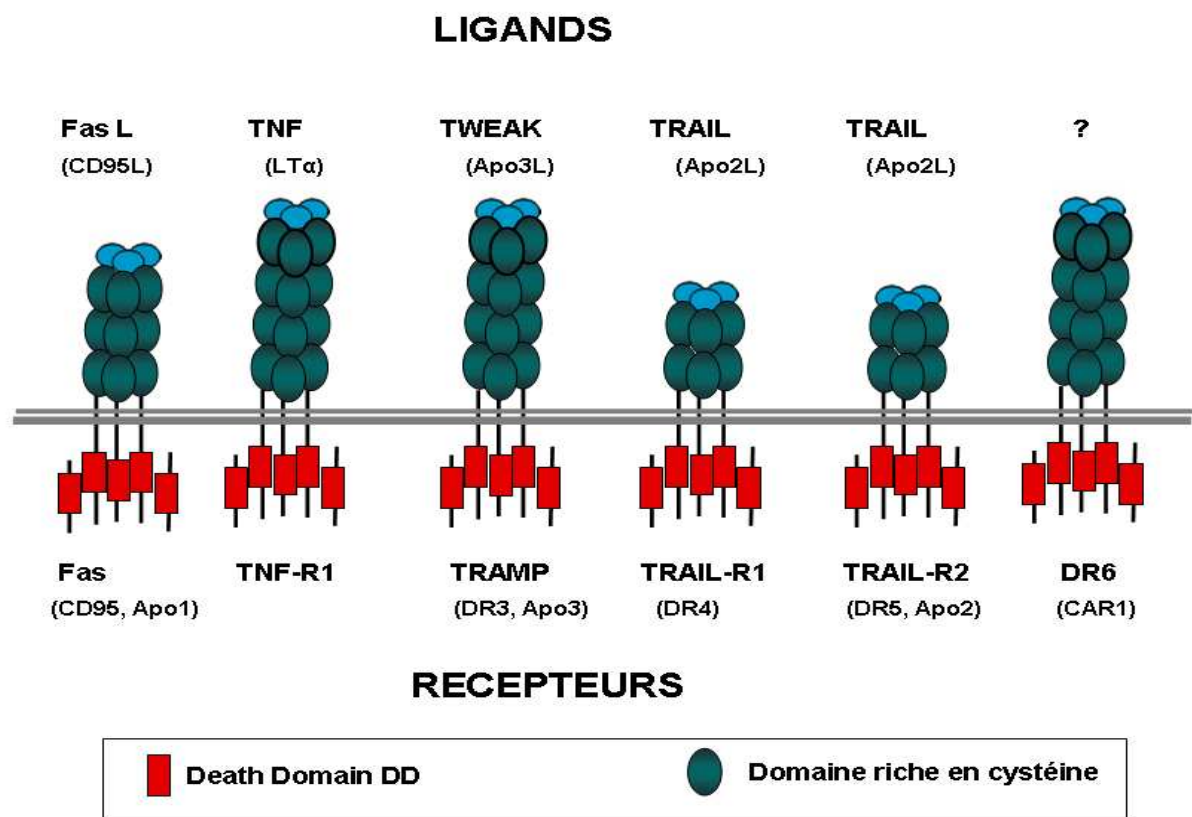


Figure 15: Les récepteurs de mort et leurs ligands

3.2 Les voies moléculaires conduisant à l'activation des caspases

La multitude de stimuli conduisant à une mort de type apoptotique rend impossible une énumération exhaustive de leur nature ainsi que de leur mode d'action. On peut distinguer deux grandes catégories : l'apoptose induite par activation de récepteurs membranaires spécifiques dite « voie extrinsèque » et celle induite par des perturbations de l'homéostasie mitochondriale dite « voie intrinsèque ». Ces deux grandes voies sont impliquées dans la signalisation apoptotique induite par une multitude de stimuli de type stress cellulaire dus à des changements environnementaux inadéquats, à la présence de composés toxiques mais également sous l'action des mécanismes de défense de l'organisme, c'est-à-dire du système immunitaire et qui conduisent à l'activation des caspases.

3.2.1 La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokines sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort. Ces récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNFR) et incluent six récepteurs (Fas, TNFR-1, TRAMP, les récepteurs au 'TNF-related apoptosis inducing ligand' (TRAIL) DR-4 et DR-5 et DR6, un récepteur orphelin). Ils sont tous de type I, contenant deux à quatre domaines extracellulaires riches en cystéine et une séquence cytoplasmique conservée appelée 'death domain' (DD) (Wehrli *et al.*, 2000) (**figure 15**). La fixation d'un ligand sur un récepteur de mort conduit à la trimérisation du récepteur qui lui permet d'être actif (**figure 15**).

La signalisation du récepteur de mort activé se fait par sa région cytoplasmique. L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices au niveau du DD. Ces protéines adaptatrices appelées Fas associated death domain (FADD) ou TNF receptor associated death domain (TRADD) possèdent leur propre DD par lequel elles sont recrutées au niveau des récepteurs activés. Les protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé death effector domain (DED). Le domaine DED des protéines adaptatrice FADD ou TRADD interagit alors avec le domaine DED d'une protéase à cystéine, la pro-caspase-8 ou la pro-caspase-10 qui font partie de la famille des caspases initiateurs. Ces caspases initiateurs sont sous forme de zymogène et sont recrutées par les protéines adaptatrices au niveau des récepteurs de mort et le complexe ainsi formé est appelé

death inducing signaling complex (DISC) (Boatright et Salvesen, 2003). La formation du DISC augmente la concentration locale et permet le rapprochement des pro-caspases initiateuses -8 et -10 qui sont alors en mesure de s'activer par autoclivage (Salvesen et Dixit, 1999). La caspase-8 activée active alors à son tour les caspases dites effectrices comme la caspase-3 et qui sont responsables de la phase d'exécution de l'apoptose (Khosravi et Esposti, 2004).

*Le récepteur de mort Fas et son ligand

Le récepteur Fas, tout comme les autres membres de cette superfamille, est caractérisé par la présence de plusieurs domaines riches en cystéine situés dans la partie extracellulaire. Il possède également un domaine DD intracellulaire essentiel à l'induction du signal pro-apoptotique. La partie extracellulaire de ce récepteur est constituée de 3 domaines riches en cystéine (CRD : cystein-rich domain) (**figure 15**). Son expression à la surface des cellules est relativement ubiquitaire ; il s'y présente sous forme d'homotrimères pré-associés. Cette homotrimérisation s'effectue par des interactions au niveau N-terminal extracellulaire, au sein d'un domaine riche en cystéine nommé PLAD (Pre-ligand assembly domain) (Papoff *et al.*, 1999). Cette pré-association semble présenter une importance fonctionnelle dans la mesure où des mutations du domaine PLAD réduisent de façon importante l'apoptose induite par FasL ou par un anticorps agoniste anti-Fas. Il a été rapporté que les récepteurs Fas pré-associés possèdent une localisation membranaire constitutive au niveau des radeaux lipidiques (rafts) qui sont des structures riches notamment en cholestérol et en sphingolipides. Cependant d'autres travaux montrent que ces récepteurs avec l'adaptateur FADD et la pro-caspase-8 ne sont relocalisés dans les radeaux qu'après liaison avec le ligand FasL (Scheel-Toellner *et al.*, 2002).

*Le récepteur de mort TNF-R1

Le facteur nécrosant des tumeurs, TNF (Tumor necrosis factor), est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle majoritairement produite par les macrophages activés et les lymphocytes T en réponse à une infection. Il peut induire un large spectre de réponses biologiques. Il est impliqué dans la progression de nombreuses maladies telles que le cancer, les maladies auto-immunes et neurodégénératives. En se liant à son récepteur, le TNF active des facteurs de transcription capables d'induire des gènes pro-inflammatoires (Smith, 1994).

Il existe deux récepteurs majeurs au TNF: TNF-R1 et TNF-R2. Le récepteur TNF-R1 est exprimé de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus et constitue le médiateur principal de la signalisation TNF, tandis que TNF-R2 est principalement trouvé dans le système immunitaire et ne peut être totalement activé que par le TNF lié à la membrane plasmique (Wajant *et al.*, 2003). Seul TNF-R1 peut induire une signalisation apoptotique, et cela est dû au fait que le récepteur TNF-R2 ne contient pas dans sa partie intracellulaire les domaines de mort DD. Tout comme Fas, TNF-R1 est présent à la surface de la cellule sous forme préassociée en homotrimères. La liaison du TNF à ces récepteurs entraîne leur agrégation, leur translocation au niveau des radeaux lipidiques (Legler *et al.*, 2003) et la formation au niveau du cytoplasme d'un complexe multiprotéique ayant de grandes similarités avec le DISC.

*Les récepteurs de mort TRAIL-Rs et leur ligand

Il y a maintenant plus de dix ans, le ligand de mort TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)/Apo2L/TNFSF10 a été identifié par ses homologies avec FasL et le TNF (Wiley *et al.*, 1995 ; Pitti *et al.*, 1996). L'intérêt pour ce ligand s'est particulièrement accru lorsque plusieurs études montrèrent qu'il était un puissant inducteur d'apoptose dans un grand nombre de lignées tumorales, mais peu ou pas dans beaucoup de cellules normales (Ashkenazi *et al.*, 1999 ; Walczak *et al.*, 1999). TRAIL, protéine membranaire de type II, est inséré dans la membrane de la cellule et expose son domaine C-terminal. Contrairement à CD95L et TNF, TRAIL est exprimé constitutivement et distribué largement dans une grande variété d'organes et tissus sains, principalement dans la rate, le poumon et la prostate (Wiley *et al.*, 1995) ce qui est à mettre en relation avec sa quasi absence de toxicité vis-à-vis des cellules normales. Néanmoins, il n'est pas exprimé dans le cerveau, les testicules ni le foie. Il peut être clivé par des métalloprotéases spécifiques ce qui génère un TRAIL soluble et ces deux formes fonctionnent en trimères capables d'induire l'apoptose par interaction avec les récepteurs TRAIL-Rs présents sur les cellules cible.

Les récepteurs de TRAIL sont de manière prédominante des protéines membranaires de type I ayant leur domaine N-terminal de liaison à TRAIL exposé. Cinq récepteurs différents se liant à TRAIL ont été identifiés : TRAIL-R1 (DR4 (death receptor 4), TNFRSF10a (tumor necrosis factor receptor superfamily 10a)) (Pan *et al.*, 1997), TRAIL-R2 (DR5 (death receptor 5), TNFRSF10b) (Sheridan *et al.*, 1997 ; Walczak *et al.*, 1997) dont deux variants existent par épissage alternatif nommé DR5s et DR5L (Screaton *et al.*, 1997),

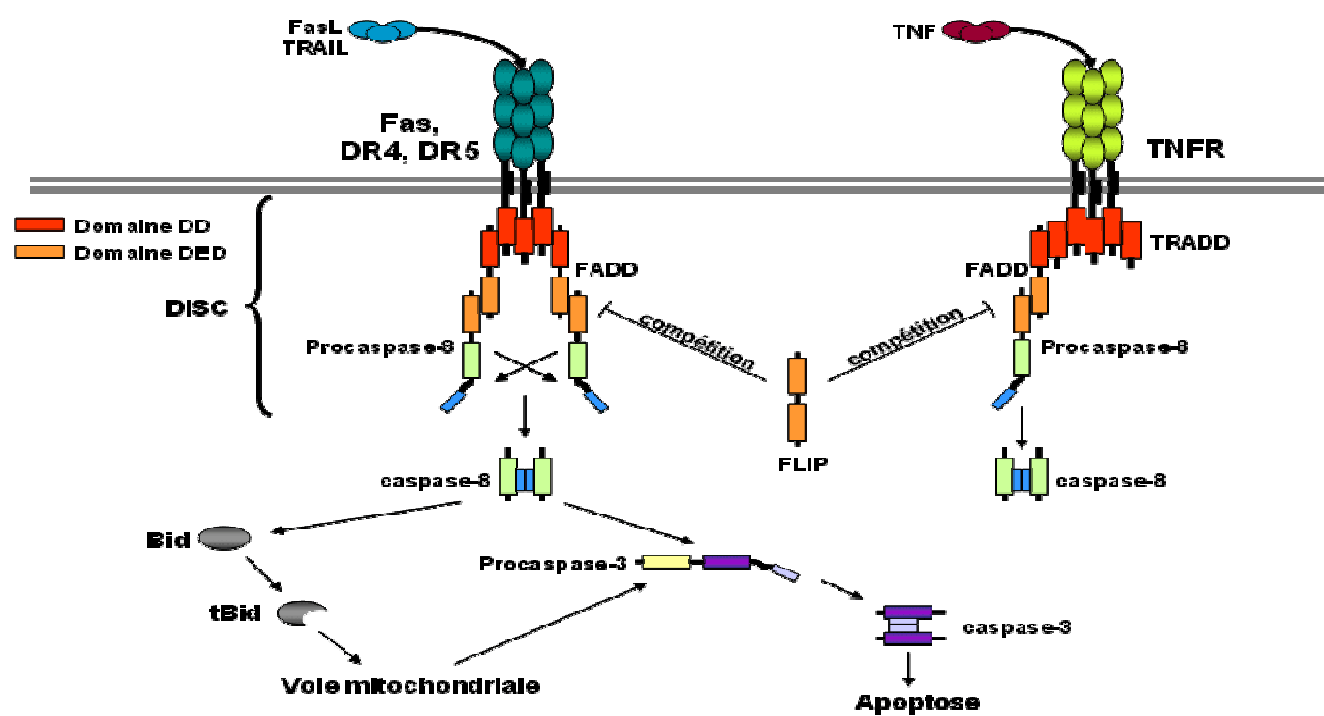


Figure 16: La voie des récepteurs de mort

DcR1 (TRAIL-R3 ou TNFRSF10c) (Sheridan *et al.*, 1997 ; Degli-Esposti *et al.*, 1997 ; Mongkolsapaya *et al.*, 1998), DcR2 (TRAIL-R4 ou TNFRSF10d) (Sheridan *et al.*, 1997 ; Marsters *et al.*, 1997 ; Mongkolsapaya *et al.*, 1998) et l'ostéoprotégérine circulante (OPG ou TNFRSF11b), récepteur soluble d'une parenté éloignée des quatre autres (Kimberley and Screaton, 2004). Les récepteurs DR4 et DR5 contiennent deux domaines extracellulaires de liaison au ligand riche en cystéine et sont les seuls à posséder dans leur domaine cytoplasmique des domaines DD (**figure 15**), et par conséquent les seuls à pouvoir induire une signalisation apoptotique (Chaudhary *et al.*, 1997). Ces deux récepteurs sont à l'image de leur ligand, exprimés dans un grand nombre de tissus.

La signalisation apoptotique induite par TRAIL est similaire à celle médiée par Fas (**figure 16**). Comme TNF-R1 et Fas, DR4 est préassocié en homotrimères. Par ailleurs, il était généralement supposé, jusqu'à récemment, que l'activation de DR5 résultait du recrutement de trois unités indépendantes de récepteur. Néanmoins, il y a de plus en plus d'évidences qui permettent de penser qu'en l'absence du ligand TRAIL, DR5 est présent sous forme de complexes préassociés (Wassenaar *et al.*, 2008). La liaison de TRAIL à ces récepteurs DR4 et DR5, à l'instar de la signalisation sous Fas, conduit à la formation du DISC par recrutement de la protéine adaptatrice FADD, de la pro-caspase-8 ou -10 qui sont alors activées au sein de ce complexe (Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000; Bodmer *et al.*, 2000). DR4 et DR5, souvent co-exprimés à la surface des cellules, peuvent induire une signalisation apoptotique indépendamment l'un de l'autre (Kischkel *et al.*, 2000).

Bien que la fonction biologique principale de TRAIL soit l'induction de l'apoptose, la totalité du rôle physiologique de ce ligand n'est pas encore entièrement comprise. Des recherches dans différents organismes et systèmes cellulaires ont mis en évidence un rôle de TRAIL dans un certain nombre de fonctions immunitaires. Si l'ARN messenger de TRAIL et l'expression de sa protéine ont été trouvés dans une variété de cellules et de tissus, il n'en reste pas moins que les études réalisées chez la souris et l'homme ont montré que TRAIL n'est pas exprimé à la surface de cellules T fraîchement isolées, des cellules B, des monocytes, des cellules dendritiques, des cellules NK (natural killer) ou même des cellules NKT (natural killer T lymphocyte). Seule une sous-population de cellules NK de souris (les cellules NK du foie) exprime TRAIL à leur surface et la neutralisation de celui-ci avec des anticorps spécifiques augmente le nombre de métastases hépatiques de lignées tumorales sensibles à TRAIL soulignant le rôle de TRAIL dans l'immunité innée (Takeda *et al.*, 2001).

En effet, il joue un rôle dans la surveillance antitumorale et la suppression des métastases médiées aussi bien par les cellules T que les cellules NK et dans les maladies auto-immunes (Smyth et al., 2003 ; Cretney *et al.*, 2006).

Le fait qu'un large éventail de cellules exprime à la fois le ligand TRAIL et ses récepteurs implique que les cellules doivent employer des mécanismes pour se protéger elles-mêmes contre une autodestruction involontaire ou de la mort médiée par les cellules avoisinantes. A cet égard, la résistance à l'apoptose induite par TRAIL des cellules du système immunitaire est essentielle afin qu'elles puissent agir en tant que médiateur de la réponse anti-tumorale. De plus, certains types de cellules tumorales ont développé des mécanismes de résistance à TRAIL. En effet, une résistance à TRAIL a été rapportée dans approximativement 50% des lignées cellulaires tumorales testées atténuant ainsi la possibilité d'une utilisation en monothérapie en clinique (LeBlanc *et al.*, 2003). Dans environ 10% des tumeurs examinées, incluant les cancers du sein et du poumon, la résistance à TRAIL a été corrélée à des déficiences ou mutations dans les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 (Lee et al., 1999 ; Shin *et al.*, 2001). Bien que ces mutations engendrent des défaillances dans la signalisation sous TRAIL dans un petit pourcentage des tumeurs, des aberrations génétiques ont été trouvées seulement dans un des deux récepteurs, le second restant fonctionnel. D'après plusieurs études, une expression différentielle des récepteurs DR4 et DR5 à la surface des cellules expliquerait la sensibilité ou la résistance relative à TRAIL (Clodi *et al.*, 2000 ; Kim et al., 2000; Kang *et al.*, 2003). En effet, Zhang et ses collaborateurs avaient initialement postulé que le fait que les cellules cancéreuses soit beaucoup plus sensibles à l'apoptose médiée par TRAIL que les cellules non transformées était dû à une plus grande expression des récepteurs de TRAIL (Zhang et al., 1999). Cependant, lorsque les récepteurs DR4 et DR5 ont été identifiés, il a été trouvé que l'expression de l'ARN messager de ces derniers était aussi largement distribuée dans les tissus sains que cancéreux (Chaudhary *et al.*, 1997).

Fas et TRAIL notamment ont une fonction primordiale dans l'homéostasie du système immunitaire, dans la surveillance des tumeurs et dans la cytotoxicité à médiation cellulaire.

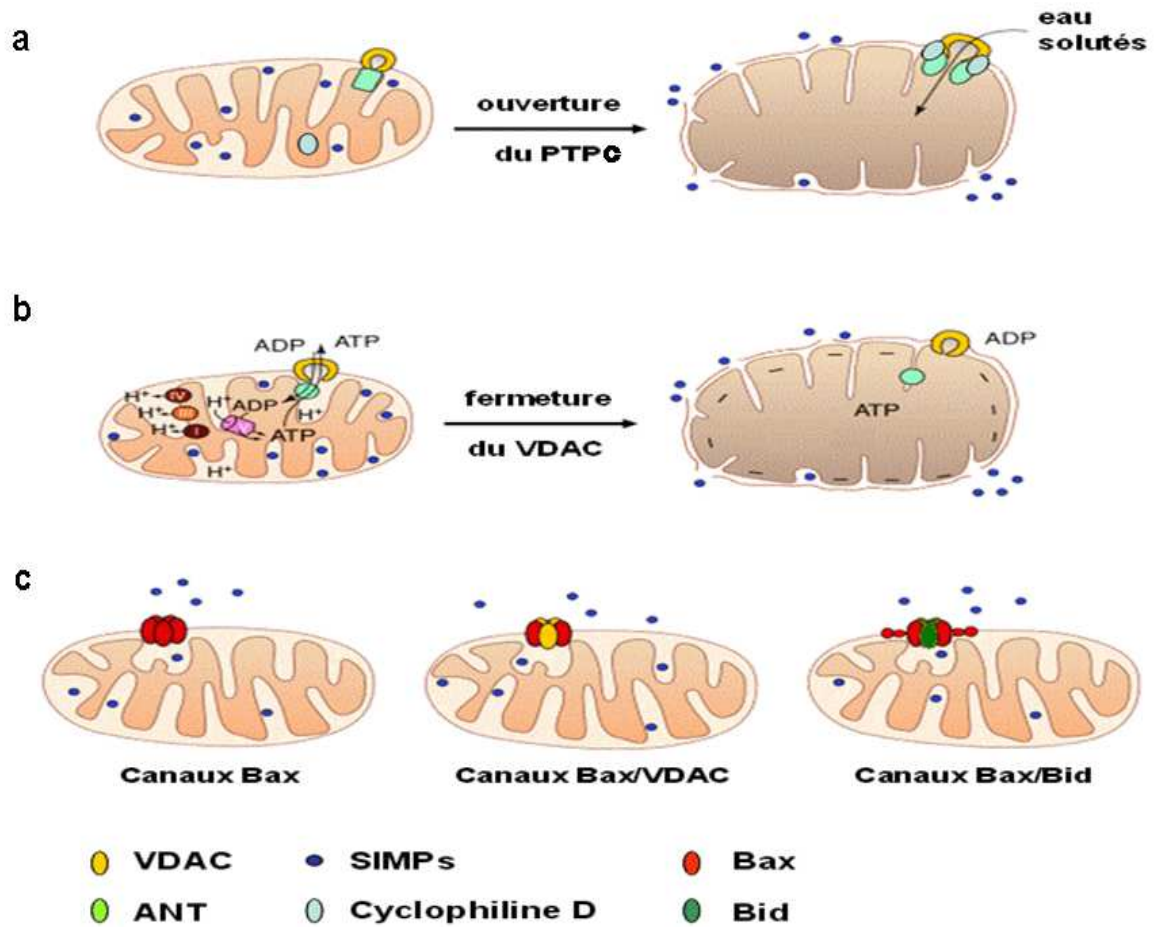


Figure 17: Modèles possibles de libération des SIMP (soluble inter membrane mtichondrial proteins) de l'espace intermembranaire vers le cytosol

Les modèles a et b proposent une rupture mécanique de la membrane externe mitochondriale provoquée par le gonflement de la matrice intermembranaire mitochondriale. Ce dernier serait dû à l'ouverture du PTPC (pore transition permeability complex) (a) ou à la fermeture de la porine (VDAC) (b), entraînant une altération dans l'échange ATP/ADP. Le modèle (c) propose la participation du membre pro-apototique de la famille Bcl-2, Bax, soit dans une régulation des pores lipidiques ou du canal VDAC, soit en formant lui-même un canal à la suite de son oligomérisation.

3.2.2 La voie mitochondriale ou intrinsèque

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organe indispensable à la production d'ATP, a été plus récemment également impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de mort cellulaire. En effet, dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire (à la suite de stimulus engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, de radiations ionisantes, un traitement par des agents cytotoxiques ou d'un sevrage en cytokines), on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales (à l'origine de la libération de protéines proapoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol) accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore très controversé. Plusieurs modèles sont proposés et pourraient coexister (**figure 17**).

a) Une des hypothèses postule l'ouverture d'un mégapore mitochondrial appelé PTPC (*permeability transition pore complex*) (Marzo *et al.*, 1998), complexe multiprotéique composé en majorité de la porine de la membrane mitochondriale externe (aussi appelé VDAC, *voltage dependent anion channel*), et d'un « translocateur » de nucléotides à adénine (ANT), inséré dans la membrane mitochondriale interne. Selon ce modèle, des protéines proapoptotiques (telle que Bax), en s'associant au PTPC, favoriseraient son ouverture, provoquant ainsi un gonflement de la matrice mitochondriale (dû à une entrée d'eau et de solutés provoquée par une hyperosmolarité de la matrice). Lors de cette expansion, l'excédent de surface de la membrane interne par rapport à la membrane externe provoquerait une rupture mécanique de cette dernière.

b) Un autre modèle suppose un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux oxygénés. Ce modèle ne permet cependant pas d'expliquer comment une libération des protéines apoptogènes pourrait précéder la chute du $\Delta\Psi_m$ (Zamzami *et al.*, 2001).

c) Un dernier modèle suggère plutôt la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe permettant la libération de protéines dans le cytosol sans altération

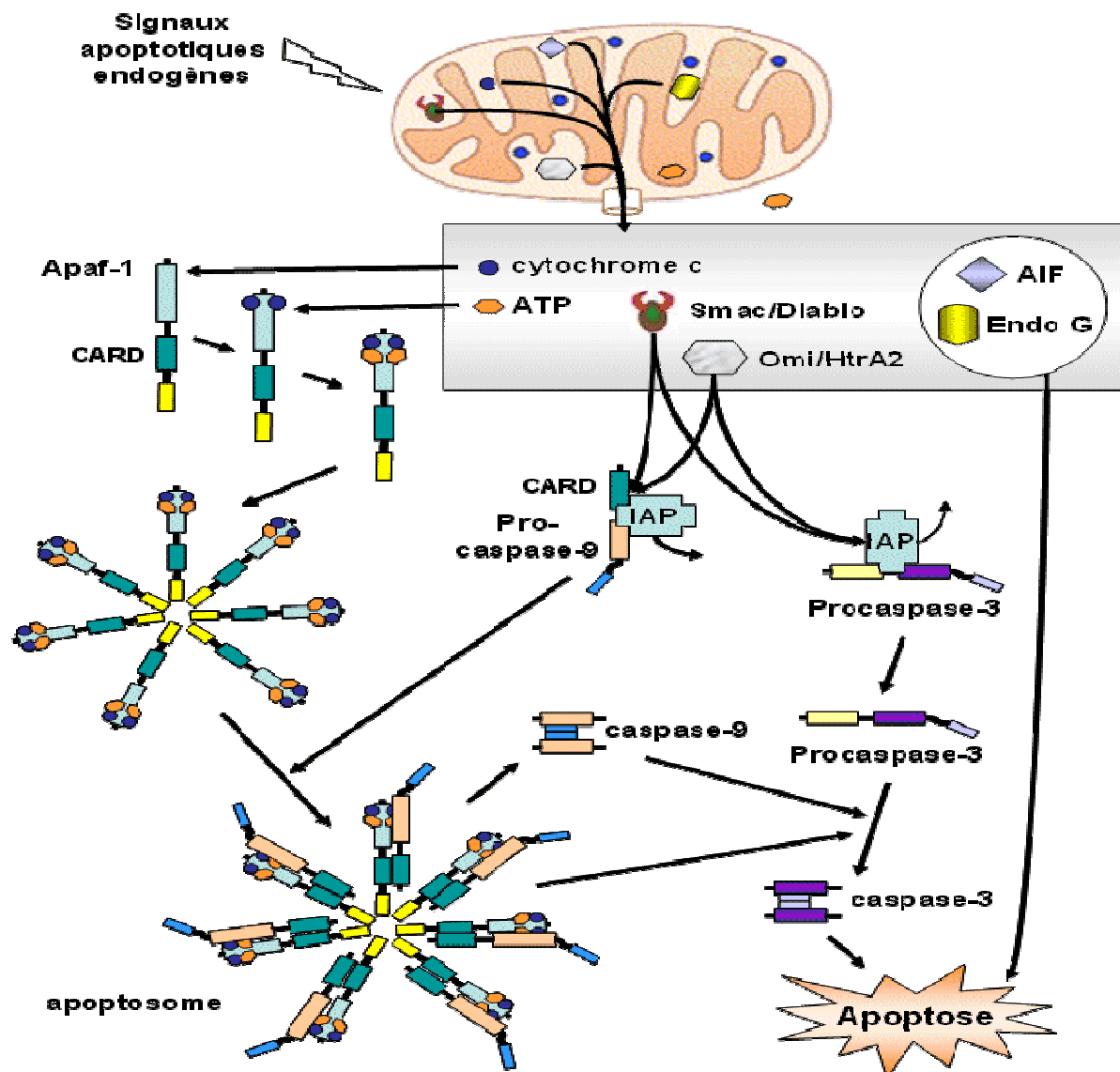


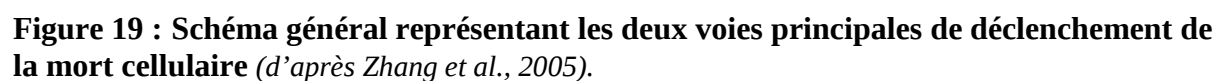
Figure 18 : La voie mitochondriale de l'apoptose (d'après Ravagnan et al., 2002)

L'activation de la cascade des caspases est quant à elle régulée par les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) qui se lient directement aux caspases et empêchent le clivage des caspases nécessaire à leur activation. Les protéines de la famille des IAP interagissent avec les caspases-3, -7 et -9 par l'intermédiaire de domaines conservés appelés BIR (baculoviral IAP repeat) et bloquent la maturation protéolytique de ces caspases. Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 relarguées de la mitochondrie et qui sont en fait des inhibiteurs des IAP, se lient au niveau des domaines BIR des IAP et inhibent ainsi leurs activités anti-apoptotiques. Dans le noyau, l'AIF induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 Kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence. De plus, l'AIF amplifierait également sa propre libération une fois dans le cytosol. Ces actions dépendent directement de l'activité de l'AIF lui-même et sont indépendantes des caspases.

physique de la mitochondrie. La protéine proapoptotique Bax pourrait être à l'origine de la formation de ce pore, soit en interagissant directement avec des lipides, soit en s'associant au VDAC ou bien encore par auto-oligomérisation ou formation d'oligomères avec un autre membre de la même famille (Martinou *et al.*, 2000). Les protéines ainsi libérées sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (*soluble inter membrane mitochondrial proteins*) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique (**Figure 18**). Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO (DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec l'homologue de CED-4, la protéine Apaf-1 et la forme zymogène de la caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome à l'origine du clivage - et donc de la formation de la forme active - de la pro-caspase 9 (Zou *et al.*, 1999). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases -3 ou -7. La protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et les inactive (*voir plus loin*). L'AIF est, pour l'instant, le seul représentant d'une autre classe de SIMP : il s'agit d'une flavoprotéine qui déclenche - d'une manière indépendante des caspases - la fragmentation de la chromatine en particules de haut poids moléculaire (Susin *et al.*, 1999).

3.2.3 Un dialogue entre la voie extrinsèque et la voie intrinsèque

L'identification de la caspase 8 dans le DISC lie directement le récepteur Fas à la cascade des caspases. Son activation *via* FADD est essentielle à la mort engendrée par Fas: les thymocytes et les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes en FADD ou en caspase 8 résistent à la mort induite par Fas. Cependant, l'importance de la voie mitochondriale a été récemment démontrée dans la mort induite par Fas au moins dans certaines cellules (Scaffidi *et al.*, 1998). En fait, selon l'utilisation de ces deux voies apoptotiques en aval de Fas, deux types de cellules ont pu être définies (Scaffidi *et al.*, 1998): alors que les cellules de type I seraient indépendantes d'une activité apoptotique des mitochondries et utiliseraient uniquement une activité directe des caspases, les cellules de type II en seraient dépendantes. Mise à part la quantité de pro-caspase 8 recrutée et clivée au niveau du DISC (faible dans les



cellules de type II et importante dans les cellules de type I), aucune différence moléculaire n'a permis à ce jour d'expliquer cette différence de comportement entre les deux types de cellules. Un membre de la famille Bcl-2 à domaine BH3, la molécule Bid (Luo *et al.*, 1998) constitue un des liens entre la voie du récepteur et la voie mitochondriale (**figure 19**). Un fragment de cette molécule engendré à la suite du clivage par la caspase 8 est transféré du cytoplasme à la mitochondrie. En effet, Bid, en se liant à Bax, un autre membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, induit l'oligomérisation de ce dernier et son intégration dans la membrane externe mitochondriale, entraînant l'ouverture de mégapores mitochondriaux à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la libération du cytochrome c (Eskes *et al.*, 2000). Une autre protéine faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de la protéine régulatrice BAR (Zhang *et al.*, 2000), qui possède la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-xL *via* un domaine SAM et à la caspase 8 *via* un domaine DED. Très longtemps, une incertitude a plané sur le rôle inhibiteur de Bcl-2 dans la mort induite par Fas. Une explication possible est venue de l'identification des cellules de type I ou de type II. En effet, Bcl-2 ne jouerait aucun rôle dans la mort provoquée par Fas dans les cellules au sein desquelles une activation directe des caspases est suffisante (type I). En revanche, dans des cellules dans lesquelles une amplification du signal d'activation *via* la voie mitochondriale (type II) est nécessaire, la mort induite par Fas serait modulée par des protéines de la famille Bcl-2.

4. Régulation de l'apoptose

4.1 Régulation des caspases

Le dysfonctionnement des voies de signalisation de l'apoptose participe à la pathogenèse de nombreuses maladies humaines. On sait à présent que les caspases peuvent également être impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Los *et al.*, 2001). En effet, la production, la modification et l'activité des caspases sont soumises à une régulation à différents niveaux.

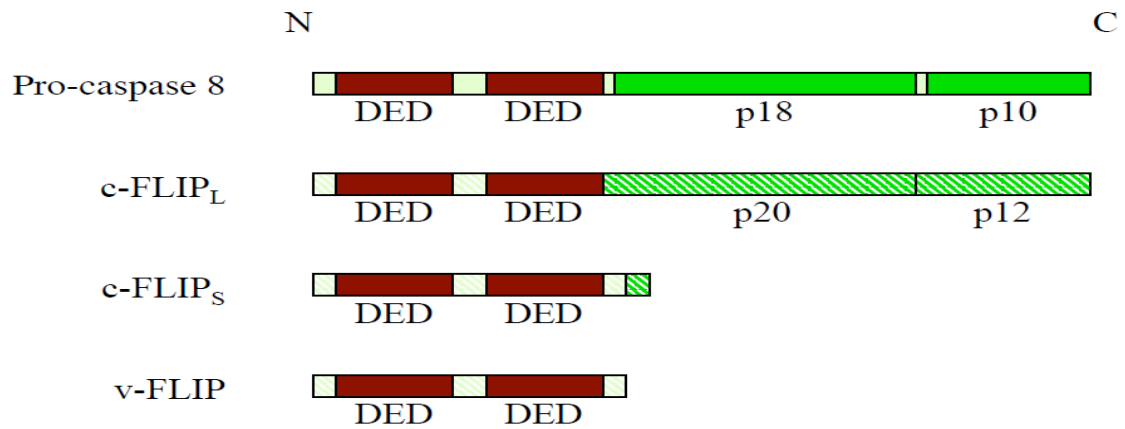


Figure 20 : Schéma de la structure des protéines pro-caspase 8 et FLIP

Les protéines pro-caspase 8, c-FLIP_L, c-FLIP_S et v-FLIP possèdent deux domaines DED (Death Effector Domain). La région N-terminale contenant les deux DED correspond au prodomaine de la pro-caspase 8. Cette dernière possède dans sa partie C-terminale deux sous unités catalytiques p18 et p10. La région équivalente dans la protéine c-FLIP_L (p20 et p12) n'a pas d'activité catalytique. Les protéines c-FLIP_S et v-FLIP sont plus courtes et n'ont aucune région équivalente à la région C-terminale de la pro-caspase 8.

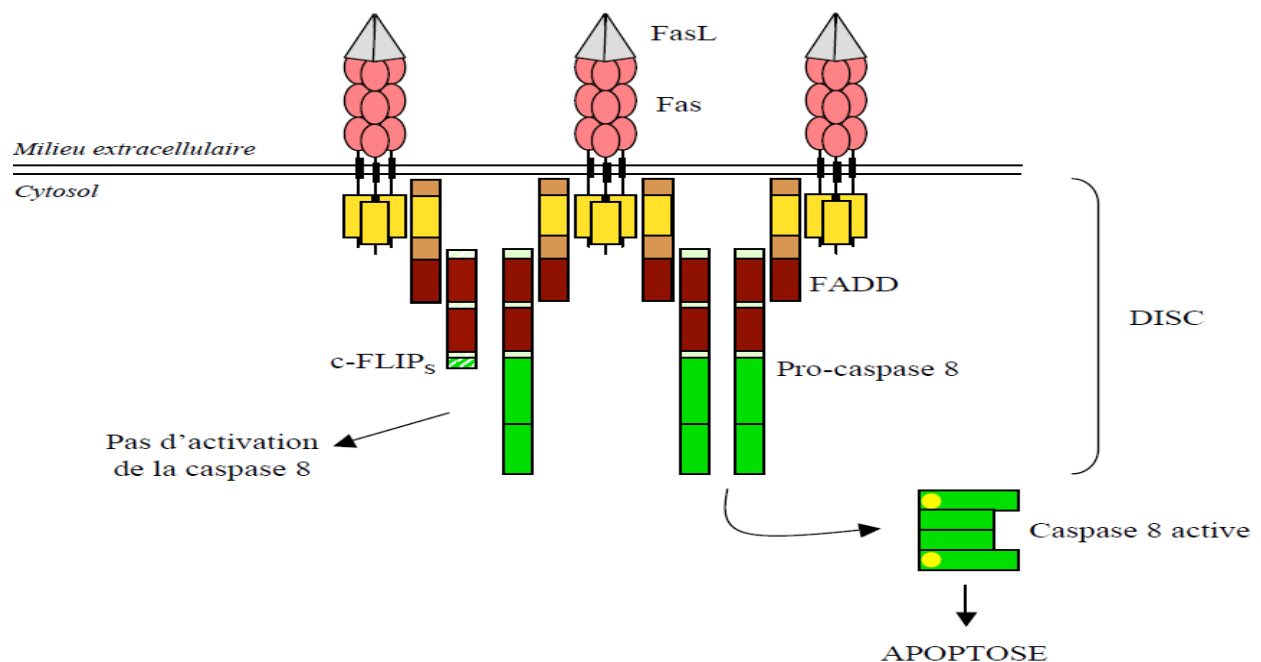


Figure 21 : Formation du DISC et inhibition de l'activation de la caspase-8 par c-FLIPS

L'interaction entre Fas et FasL permet le recrutement de la protéine adaptatrice FADD au niveau du domaine intracellulaire de Fas grâce à l'interaction entre leurs DD (en jaune) respectifs. La protéine FADD peut alors recruter la pro-caspase-8 grâce à des interactions entre leurs DED (en marron) respectifs. Ce complexe multiprotéique est appelé le DISC. Plusieurs pro-caspases-8 se retrouvent ainsi rapprochées, et peuvent s'auto-activer. Il y a alors libération dans le cytosol de la caspase 8 active. La partie gauche du schéma représente le cas où la protéine anti-apoptotique c-FLIPS est recrutée au niveau du DISC en même temps que la procaspase-8. c-FLIPS empêche alors le rapprochement des pro-caspases-8, qui ne peuvent donc pas être activées.

4.1.1 Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation du DISC

Plusieurs régulateurs agissent au niveau de la formation du DISC. Les plus connus sont les FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins), des isoformes de caspase 8, possédant deux domaines DED mais pas de site catalytique actif (**figure 20**). Ces protéines fonctionnent donc comme des molécules leurres de FADD en entrant en compétition avec les caspases 8 pour leur recrutement au niveau du DISC (**figure 21**) (Irmeler *et al.*, 1997). Les FLIP virales (v-FLIP) ont été identifiées dans plusieurs virus γ -herpes (Thome *et al.*, 1997). Elles possèdent des capacités anti-apoptotiques qui permettent aux virus d'échapper aux réponses apoptotiques antivirales de l'hôte. Une analyse de leur séquence a révélé que les v-FLIP contenaient deux DED dans leur partie N-terminale et avaient une homologie considérable avec la caspase-8 et la caspase-10. D'autres observations ont indiqué que les v-FLIP étaient capables de se lier à FADD et à la caspase-8 *via* des interactions homotypiques. Cette liaison bloque le recrutement de la caspase-8 dans le DISC et empêche donc son activation (Thome *et al.*, 1997). Un homologue cellulaire des v-FLIP a ensuite été identifié et appelé c-FLIP. Deux variants d'épissage – une forme longue (FLIP_L) et une forme courte (FLIP_S) – ont été identifiés dans les cellules humaines. La forme courte est structuralement et fonctionnellement similaire à v-FLIP (**figure 20**). Bien que FLIP_L tout comme FLIP_S soient recrutés au niveau du DISC, ces 2 variants exercent une activité d'inhibition de l'activation de la pro-caspase-8 différente. FLIP_S prévient totalement le processus d'auto-protéolyse du zymogène, tandis que FLIP_L n'empêche pas le premier clivage de la procaspase-8. FLIP_L et FLIP_S ne sont pas égaux dans leur capacité à inhiber l'apoptose induite par Fas, TRAIL-R1 et -R2, TRAMP et TNF-R1.

En effet, il semblerait qu'à des taux d'expressions comparables FLIP_L soit un plus puissant inhibiteur que FLIP_S (Irmeler *et al.*, 1997). Par ailleurs, contrairement à FLIP_S qui fonctionne exclusivement comme un inhibiteur, FLIP_L peut aussi activer les voies de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) et de la kinase ERK (extracellular signal-regulated kinase) par le biais de sa capacité à recruter les protéines adaptatrices et les kinases impliquées dans ces voies de signalisation. Ainsi, FLIP peut être considéré comme une protéine pivot multifonctionnelle capable de moduler l'orientation des voies de signalisation de mort et de prolifération cellulaire aussi bien en prévenant l'activation

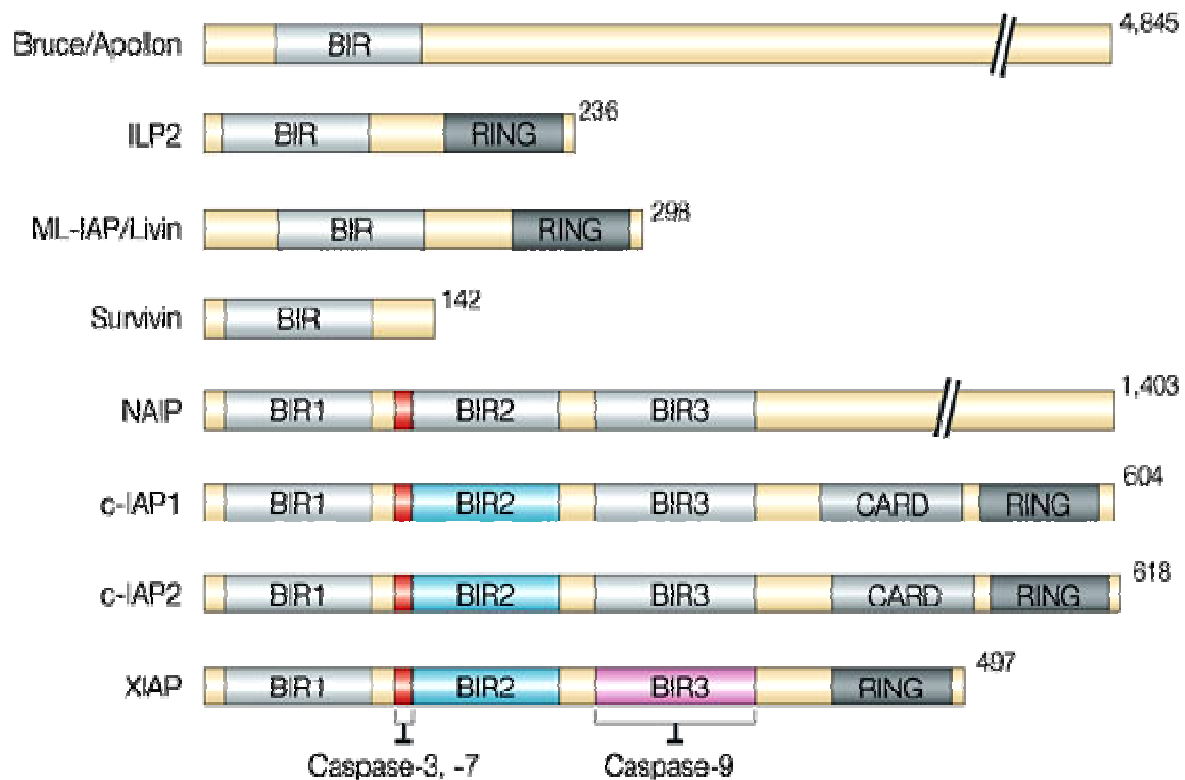


Figure 22: Les IAP (inhibitors of apoptosis) humaine (d'après Jesenberger et Jentsch, 2002)

Les IAP affectent directement et sélectivement certaines caspases. Les domaines conservés entre les différents membres sont représentés. Domaine BIR, domaine RING (zinc finger) : possèdent une activité ubiquitine-ligase permettant la dégradation de l'IAP et des caspases qu'elle fixe ; domaine CARD : l'existence de ce domaine suggère que les IAP puissent réguler l'activation des caspases via des interactions CARD-CARD ; cependant, la fonction de ce domaine dans la protection de l'apoptose reste non élucidée ; domaine UBC (ubiquitine conjugating enzyme domain) : ce domaine aurait pour fonction de contrôler le niveau de caspases au sein de la cellule via le protéasome, il n'est retrouvé que dans l'IAP Apollon ; la présence d'une séquence consensus P loop évoque la possibilité d'une liaison au GTP ou à l'ATP.

de la caspase-8 qu'en participant à la transmission de signaux prolifératifs tels que la voie de signalisation NF- κ B

4.1.2 Régulation de l'activation des caspases au niveau de la formation de l'apoptosome

La famille des protéines Bcl-2 joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose en modulant de plusieurs manières l'activation des caspases. Les membres anti-apoptotiques de cette famille inhibent la sortie du cytochrome c de la mitochondrie empêchant ainsi la formation du complexe Apaf-1/cytochrome c/ caspase-9 qui est nécessaire à l'activation de cette caspase. Par ailleurs, la protéine anti-apoptotique Bcl-xL a été décrite comme pouvant interagir physiquement avec Apaf-1 et la caspase-9 dans les cellules de mammifères et de ce fait inhiber l'activation de cette dernière. La famille Bcl-2 sera abordée dans le chapitre suivant.

4.1.3 Régulation de l'activation des caspases par les IAPs

La famille des protéines IAP est un ensemble de facteurs dont la séquence peptidique est hautement conservée, ces protéines se lient directement aux caspases (-9, -3 et -7), empêchant ainsi leur clivage et leur activité (Deveraux *et al.*, 1997). Ces régulateurs endogènes de la cascade d'activation des caspases constituent une classe de protéines hautement conservées au cours de l'évolution. Chez les mammifères, la famille est composée de huit membres : Bruce, ILP2, ML-IAP, Survivine, NAIP, c-IAP1, c-IAP2 et XIAP (**figure 22**).

Parmi eux, XIAP est celui qui est le mieux caractérisé et pour lequel le plus de propriétés biologiques ont été observées. Les IAPs se distinguent par la présence d'un ou plusieurs domaines BIR (baculovirus IAP repeat) qui permettent leur interaction avec les caspases et sont essentiels à la fonction anti-apoptotique des IAPs (Miller, 1999). Chaque domaine BIR d'une IAP donnée possède une spécificité de liaison aux caspases différente. La majorité des études structurales sur l'interaction IAP-caspases a été centrée sur XIAP qui est l'inhibiteur le plus efficace de la famille. XIAP inhibe d'une part l'activité protéolytique des caspases effectrices -3 et -7 en mettant en jeu le domaine BIR2 ainsi qu'un petit segment situé

en N-terminal de BIR2 et d'autre part, l'activation de la caspase initiateur -9 avec le motif BIR3 (Deveraux, 1999). Les mécanismes d'inhibition de ces trois caspases sont clairement différents. L'inhibition des caspases -3 et -7 est causée par un encombrement stérique qui empêche le recrutement du substrat, tandis que l'inhibition de la caspase-9 est due à un changement de conformation qui l'inactive. Une étude récente a démontré que XIAP est le seul authentique inhibiteur des caspases -3, -7 et -9 (Eckelman *et al.*, 2006).

Contrairement à XIAP qui possède l'activité anti-apoptotique la plus large et la plus puissante, la survivine inhibe l'apoptose de manière beaucoup plus sélective. Il semblerait qu'elle cible précisément le processus multimoléculaire d'activation de la caspase-9, probablement via des coopérations intermoléculaires avec des co-facteurs tels que XIAP et HBXIP (Hepatitis B virus X-interacting protein), cible de la protéine virale oncogénique HBX (Altieri, 2006). La formation de ce complexe inhibe la caspase-9, perturbe le recrutement de Apaf-1 au niveau de l'apoptosome et protège XIAP d'une dégradation protéosomale. Si les aspects mécanistiques de son activité anti-apoptotique restent quelque peu sujet à controverse, il est clair que la survivine joue un rôle essentiel dans la division cellulaire notamment au moment de la mitose et plus particulièrement dans la cytokinèse et l'organisation des microtubules (Uren *et al.*, 2000). Elle fait partie des protéines du point de contrôle mitotique (« checkpoint » mitotique) et son expression est augmentée en phase G2/M du cycle cellulaire. La survivine joue donc un rôle de pivot entre les deux systèmes biologiques interdépendants que sont le cycle cellulaire et la mort cellulaire programmée.

L'activité inhibitrice des IAPs sur les caspases peut, à son tour, être régulée de manière négative par les protéines Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, ARTS, XAF1, Nrdp1 et NRAGE. Mais seules les protéines XAF1 (XIAP-associated factor 1) et de manière très détaillée, Smac/DIABLO et HtrA2/Omi, ont été étudiées. Il a été montré que XAF1 pouvait directement se lier à XIAP et interférer avec l'inhibition de la caspase-3 par ce dernier (Liston *et al.*, 2001). La sérine protéase trimérique Omi (endoprotéase activée par un stress) aussi connue sous le nom de HtrA2 (High temperature requirement protein A2) et la protéine mitochondriale activatrice des caspases Smac/DIABLO (Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct inhibitor of apoptosis (IAP)-binding-protein with a low pI) sont localisées dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Tout comme le cytochrome c, en réponse à un stimulus apoptotique, elles sont libérées dans le cytosol suite à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Dès lors, elles se lient aux IAPs et interfèrent pour déplacer celles fixées aux caspases et/ou empêcher leur interaction avec les

caspases non associées. La translocation de Smac/DIABLO et HtrA2/Omi dans le cytosol s'accompagne d'une modification structurale laissant apparaître dans la partie N-terminale de ces protéines matures un motif IBM similaire à celui utilisé par les caspases-3,-7 et -9 pour interagir avec les domaines BIR2 et 3 des IAPs. Ces régulateurs négatifs des IAPs se fixent donc sur la même poche que les caspases: en neutralisant les IAPs, ils libèrent les caspases qui peuvent alors exercer leur activité enzymatique. Par ailleurs, la sérine protéase HtrA2/Omi induit également l'apoptose en clivant les IAPs, qui sont ensuite dégradées. L'inhibition des caspases par les IAPs est donc un processus hautement dynamique mettant en jeu des interactions protéine-protéine et des dégradations protéolytiques (Srinivasula *et al.*, 2003).

Les IAPs, peuvent aussi inhiber l'apoptose induite par TRAIL en modulant justement l'activité des caspases (Suliman *et al.*, 2001). La transfection de Smac/DIABLO, inhibiteur des IAPs, abroge la résistance à TRAIL de cellules invalidées pour le gène Bax, les cellules HCT116BAX-null (Deng *et al.*, 2002). Par ailleurs des molécules agonistes de Smac/DIABLO sensibilisent les cellules T humaines de leucémie aiguë Jurkat à l'apoptose médiée par TRAIL et entraînent une régression de gliomes malins *in vivo* (Fulda *et al.*, 2002). De la même manière, une petite molécule mimétique de Smac sensibilise fortement des cellules humaines de glioblastome T98G et des cellules de carcinome du col de l'utérus Hela à l'activation des caspases et à l'apoptose induite aussi bien par TRAIL que par le TNF (Li *et al.*, 2004).

4.1.4 Régulation de l'activation et de l'activité protéolytique des caspases par des inhibiteurs exogènes

Les caspases sont aussi régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus, par élimination des cellules infectées. Certains virus ont donc développé des systèmes de résistance qui agissent sur les caspases et inhibent l'apoptose comme CrmA ou P35. La protéine CrmA (cytokine response modifier gene) du virus de la vaccine interagit avec les caspases-1 et -8 et prévient leur clivage (Zhou *et al.*, 1997). En revanche, P35, exprimée par le baculovirus, inhibe les caspases déjà actives : après clivage par ces caspases, P35 forme un complexe avec celles-ci, ce qui les inactive (Bump *et al.*, 1995 ; Riedl *et al.*, 2001).

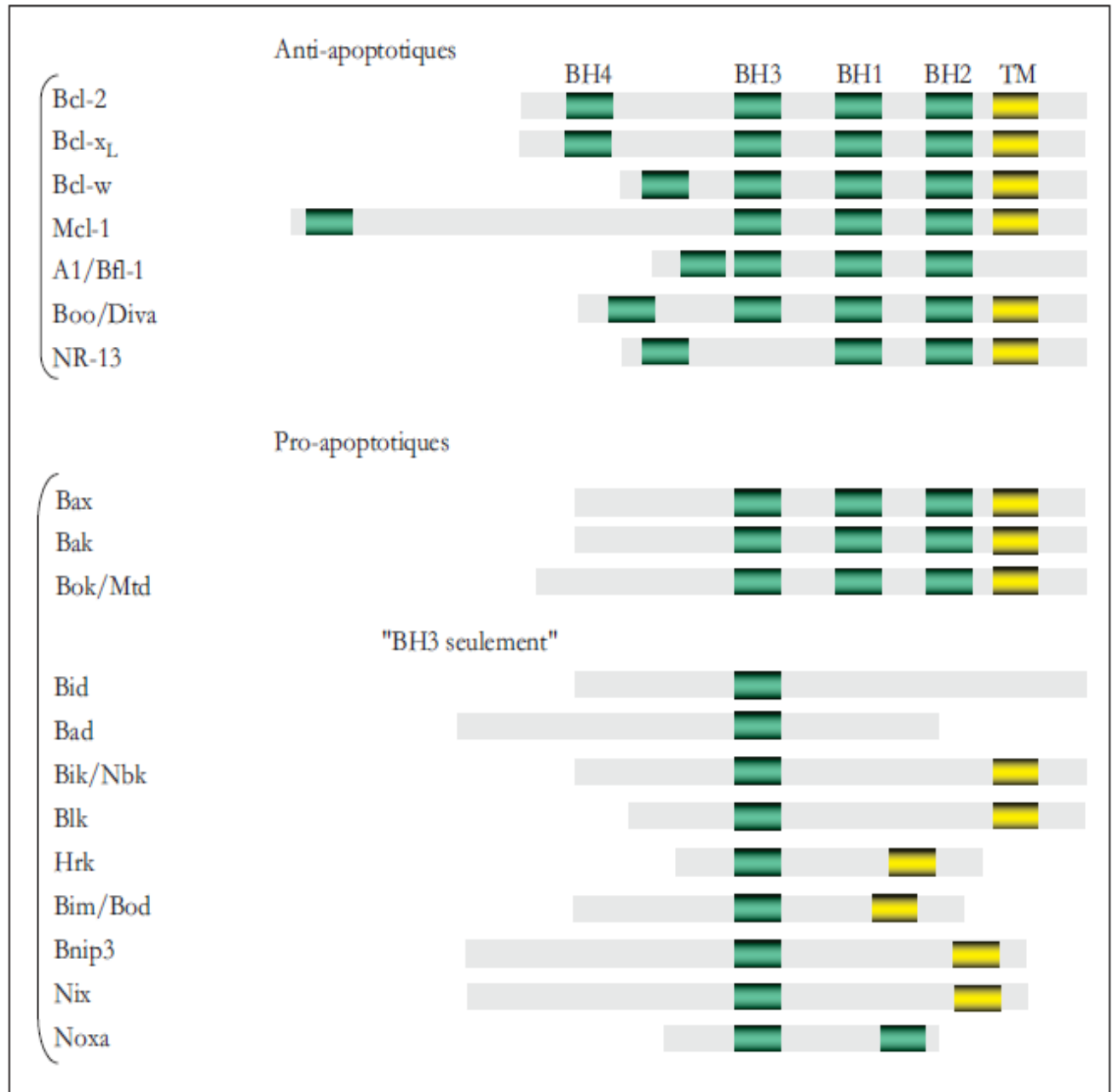


Figure 23. Domaines structuraux des protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl2.

Bcl2 possède quatre domaines conservés (BH1-4) qui peuvent être retrouvés dans certains des autres membres. Certains ont aussi un domaine transmembranaire (TM) à l'extrémité C-terminale permettant leur insertion dans les membranes.

4.2 Régulation des protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle critique dans la régulation des voies de signalisation apoptotique. C'est en 1985 que l'équipe de S.J. Korsmeyer a identifié et isolé pour la première fois le gène *bcl-2* à partir de lymphomes folliculaires malins humains (Bakhshi *et al.*, 1985). Par la suite, d'autres équipes ont montré que la surexpression de la protéine Bcl-2 par des lymphocytes conduisait à la formation de lymphomes et que la translocation chromosomique t (14-18) du gène *bcl-2* dans le locus de la chaîne lourde des immunoglobulines était à l'origine de l'expression constitutive de la protéine Bcl-2 responsable de la transformation des lymphocytes et donc de l'émergence de telles pathologies (Tsujimoto *et al.*, 1985). Les propriétés anti-apoptotiques de Bcl-2 ont été mises en évidence dès 1988 (Vaux, 1988); elle fut ainsi la première protéine de mammifère identifiée comme régulateur de la mort cellulaire programmée. En effet, les autres oncogènes connus à l'époque favorisaient la prolifération cellulaire.

4.2.1 Structure et classification

Chez les mammifères, la famille Bcl2 compte environ vingt membres, qui possèdent tous au moins un des quatre motifs conservés: BH1 à BH4 (Bcl-2 homology domain) (**figure 23**). Cette famille se divise en deux groupes: les membres anti-apoptotiques qui contiennent quatre domaines BH (dont Bcl2, BclxL, Mcl1 et Bclw) et les membres proapoptotiques qui eux-mêmes sont subdivisés en deux groupes, les membres proapoptotiques à domaines BH multiples (dont Bax, Bak) dépourvus de domaine BH4 et les membres proapoptotiques ne contenant qu'un domaine BH3 (*BH3-only*, un BH3 seulement, dont Bid, Bad et Bim) qui vont directement ou indirectement activer Bax et Bak en induisant leur oligomérisation, leur intégration dans la membrane mitochondriale et sa perméabilisation (Cory and Adams 2002 ; Cory *et al.*, 2003). Ce domaine est nécessaire et probablement suffisant pour leur action proapoptotique. Il interagit avec la poche hydrophobe constituée par les domaines BH1, BH2 et BH3 des membres anti-apoptotiques (Liu *et al.*, 2003). Les protéines à domaine « BH3 seulement » sont nécessaires à la réponse apoptotique induite par la signalisation intrinsèque et dans certains cas de signalisation extrinsèque utilisant une boucle d'amplification mitochondriale. Dans les cellules saines, la plupart des protéines « BH3 seulement » sont en dehors de la mitochondrie.

Après un stimulus apoptotique, elles subissent des modifications post-traductionnelles et se relocalisent au niveau de la membrane mitochondriale. Par exemple, Bid est activé par clivage protéolytique par la caspase 8 ; la déphosphorylation de Bad entraîne sa dissociation de la protéine soluble 14-3-3, ce qui lui permet d'inactiver Bcl2/BclxL. L'expression d'autres protéines « BH3 seulement » comme Noxa et Puma est activée par P53. La fonction des membres de la famille Bcl2 est liée à leur aptitude à s'associer aux organelles, non seulement à la mitochondrie, mais aussi au réticulum endoplasmique et à la membrane nucléaire. Le domaine hydrophobique C-terminal de la plupart des membres de cette famille permet cette localisation. Cependant l'affinité respective des différents membres de la famille Bcl-2 pour les membranes est variable. Alors que Bcl-2 fait partie intégrante des membranes, Mcl1 est cytosolique et Bcl-w et Bcl-xL comme Bax ne s'associent aux membranes qu'après un changement de conformation induit par un signal cytotoxique.

4.2.2 Régulation

Les membres de la famille Bcl-2 sont de puissants régulateurs de l'apoptose. Alors que les membres à multiples domaines BH régulent la sortie du cytochrome c de la mitochondrie, les protéines BH3 servent plutôt à intégrer les signaux apoptotiques provenant des différents compartiments cellulaires et à les transmettre aux membres à multiples domaines en régulant leur activité (Opferman et Korsmeyer, 2003). Plusieurs modèles ont été élaborés pour expliquer comment les protéines BH3 pouvaient moduler l'activité des protéines à multiples domaines BH. Celui qui est maintenant le plus accepté propose que les protéines BH3 soient des sentinelles de dommages intracellulaires. Une fois activées, elles transmettraient le message aux membres à multiples domaines BH de la famille Bcl-2. Les protéines BH3 sont alors divisées en deux sous-groupes : les activatrices et les facilitatrices (Strasser, 2005). Les activatrices se lient sur les pro-apoptotiques comme Bax et Bak pour les activer, tandis que les facilitatrices se lient sur les anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-xL pour les inhiber. La balance entre les pro-apoptotiques activées et les anti-apoptotiques inactivées déciderait si le cytochrome c est largué ou non de la mitochondrie (Kuwana *et al*, 2005).

La régulation des interactions entre les protéines BH3 et les autres membres de la famille Bcl-2 a fait l'objet de plusieurs études. Étant donné la difficulté de voir une interaction entre ces diverses protéines dans la cellule, beaucoup d'études sur les interactions protéine-

protéine des membres de la famille Bcl-2 ont été faites avec des peptides représentant les différents domaines BH3 des protéines BH3 (Strasser, 2005). Ces études ont permis de démontrer que toutes les protéines BH3 (leur domaine BH3 du moins) sont capables de lier les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, tandis que seulement un groupe restreint est capable de se lier aux pro-apoptotiques (Chen *et al*, 2005). *In vitro*, seulement les domaines BH3 de Bid, Bim et PUMA sont capables de lier Bax. À l'inverse, Bad est incapable de s'y lier (Cartron *et al*, 2004). Une autre étude a démontré que chacune des protéines BH3 avait une affinité particulière pour les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ainsi, Bim et PUMA sont capables de lier toutes les protéines anti-apoptotiques avec une haute affinité, tandis que Noxa, par exemple, est capable de se lier avec une grande affinité à Mcl-1 et A1 seulement (Chen *et al*, 2005). Il est donc clair qu'en collaboration avec les membres à multiples domaines BH de la famille Bcl-2, les protéines BH3 jouent un rôle majeur dans le contrôle de la sortie du cytochrome c de la mitochondrie, et par le fait même sur le déroulement d'une des étapes critiques de l'apoptose.

Il a été aussi démontré que les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont aussi parfois responsables de la résistance à TRAIL mais ceci dépend entre autres du type cellulaire. Dans les cellules nécessitant un engagement de la mitochondrie, les cellules de type II, le blocage de la voie mitochondriale peut changer la sensibilité à TRAIL des cellules. Une surexpression de Bcl-2 ou Bcl-xL ne bloque pas l'apoptose induite par TRAIL de cellules lymphocytaires. En revanche, elle l'inhibe dans des cellules humaines de cancer du poumon, de la prostate et du colon (Munshi *et al.*, 2001 ; Burns *et al.*, 2001). Une déficience des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 peut également conduire à une insensibilité à l'apoptose induite par TRAIL.

5. Le stress oxydant

Le stress oxydant, résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénés (ROS) et leur destruction par les défenses antioxydantes, est décrit aujourd'hui comme un mécanisme impliqué dans la réponse apoptotique (Chandra *et al.*, 2000 ; Andrieu-Abadie *et al.*, 2001).

Une faible concentration de H₂O₂ exogène, une espèce oxydante dérivée des ROS (Hampton et Orrenius, 1997 ; Goldkorn *et al.*, 1998) ou des peroxydes lipidiques (Sandstrom *et al.*, 1994) sont en effet capables de provoquer l'apoptose de cellules en culture. Par ailleurs, de nombreux inducteurs de l'apoptose, comme le TNF- α (Liu *et al.*, 1998), peuvent altérer les défenses antioxydantes, par exemple le GSH. D'autres inducteurs, tels que les céramides exogènes (Quillet-Mary *et al.*, 1997), des drogues cytotoxiques comme la doxorubicine ou encore le glucose (Kaneto *et al.*, 1996) peuvent entraîner la formation de radicaux libres. De plus, de nombreux antioxydants cellulaires, comme la N-acétyl-L-cystéine (Liu *et al.*, 1998), et des enzymes antioxydantes, comme la GPx (Nomura *et al.*, 1999), la catalase (Sandstrom et Buttke, 1993) ou la superoxyde dismutase (Patel, 1998) sont capables de prévenir l'apoptose.

Lors d'un stimuli apoptotique, des études font état, par exemple, d'une diminution de GSH dans différents modèles apoptotiques soumis à Fas (Van den Dobbelen *et al.*, 1996), au TNF- α (Liu *et al.*, 1998). L'altération des défenses antioxydantes enzymatiques a également été rapportée au cours de l'apoptose. Par exemple, dans les cellules- β de pancréas en apoptose après traitement au TGF- β , la formation accrue de ROS résulte d'une baisse de l'expression et de l'activité des enzymes GPx et SOD (Islam *et al.*, 1997).

Par contre, quelques études décrivent une augmentation des antioxydants cellulaires en réponse à des stimuli de mort suggérant que ces cellules sont capables de s'adapter et de se défendre. Par exemple, la résistance à l'apoptose de cellules cancéreuses MCF7 soumises au TNF- α a été associée à une augmentation de l'expression de la SOD (Briehl *et al.*, 1997).

6. Les céramides

Les céramides, lipides appartenant au groupe des sphingolipides, sont impliqués dans la régulation de diverses réponses cellulaires, comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Perry et Hannun, 1998 ; Lang *et al.*, 2007). Le mode d'action et la régulation de la production des céramides ont été particulièrement investis au cours des dix dernières années, du fait d'un rôle émergent des céramides comme effecteur moléculaire de l'apoptose. Plusieurs études ont montré en effet une production de céramide intracellulaires dans les cellules apoptotiques précédant l'apparition des atteintes biochimiques et morphologiques de

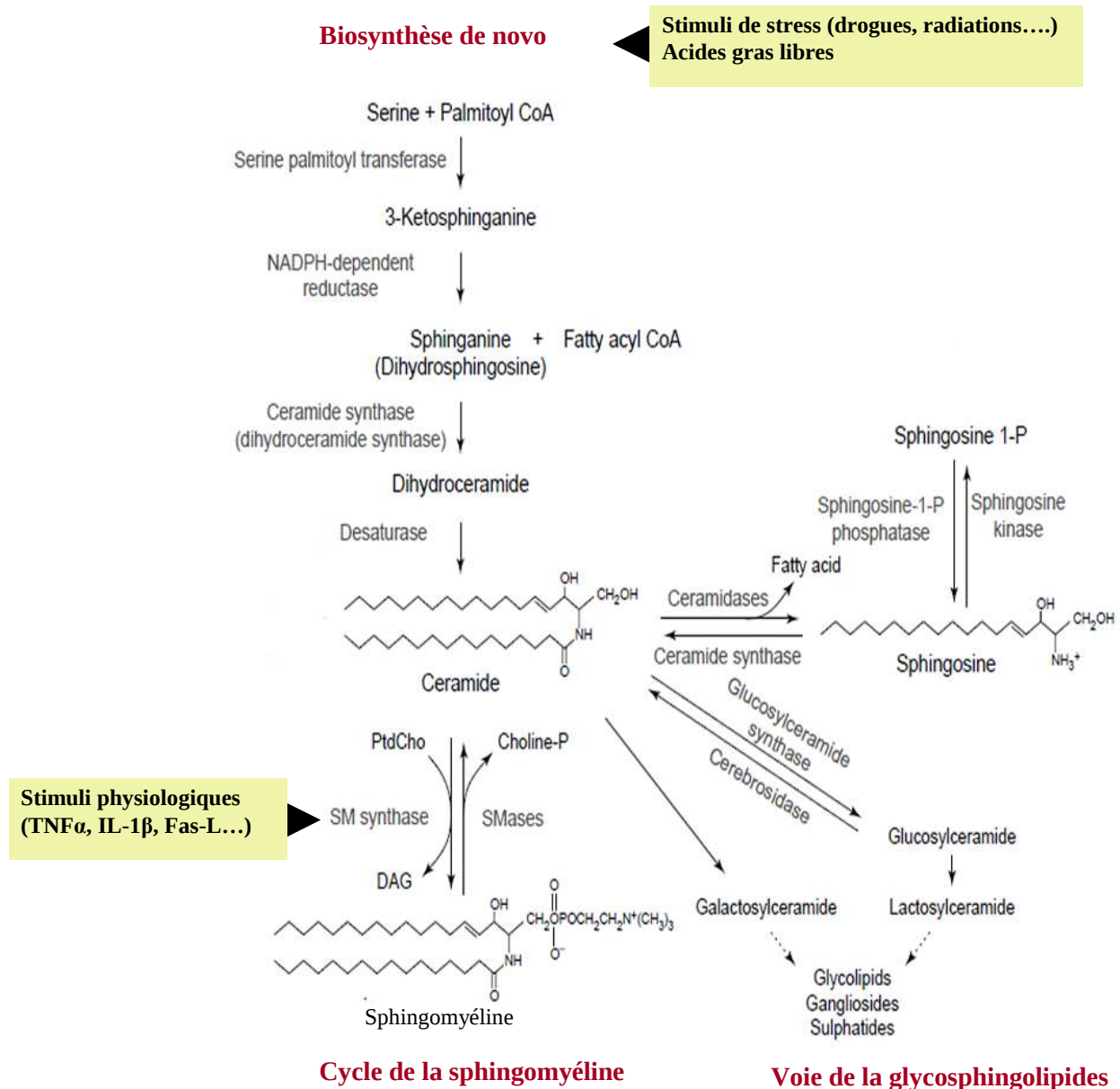


Figure 24 : Métabolisme des sphingolipides et formation des céramides dans l'apoptose
(Modifié d'après Hanun et Luberto, 2000)

La biosynthèse des sphingolipides débute dans le RE par la condensation de la serine et la palmitoyl CoA suivi par la réduction au dihydrosphingosine. Le céramide produit dans le RE est ensuite hydrolysé par des enzymes lysosomiales et aboutit à la formation en sphingomyéline ou cérébrosides dans l'appareil de Golgi. L'artefact des complexes de sphingolipides comporte l'action de plusieurs hydrolases lysosomiales et mène à la formation du céramide et puis de la sphingosine. La sphingosine est ensuite phosphorylée en sphingosine-1-phosphate ou incorporée en céramide.

l'apoptose, suggérant que les céramides puissent être impliqués dans la transduction du signal menant à la mort cellulaire (Kolesnick et Kronke, 1998 ; Mathias *et al.*, 1998).

6.1 Le métabolisme des sphingolipides

Les céramides occupent un rôle central dans le métabolisme des sphingolipides. Le métabolisme des céramides débute par la biosynthèse *de novo* (**figure 24**) initiée par une réaction de condensation de la sérine avec le palmityl-CoA, pour former la 3-cétosphinganine, alors réduite en dihydrosphingosine. La céramide synthase (dihydrocéramide synthase ou sphinganine N-acyl-transférase) catalyse l'acylation de la dihydrosphingosine en dihydrocéramide. Les céramides, formés sous l'action d'une désaturase (dihydrocéramide réductase), s'accumulent sur la face cytosolique du RE (Merrill and Wang, 1992 ; Michel and Van Echten-Deckert, 1997) et servent de précurseur pour la synthèse de sphingolipides complexes, comme les sphingomyélines et divers glycosphingolipides (**figure 24**), alors orientés dans différents compartiments subcellulaires.

De façon réciproque, le catabolisme de ces différents sphingolipides complexes s'opère en étapes successives sous l'action de divers enzymes et peut mener à la formation de céramides. Par exemple, les sphingomyélines peuvent être catabolisées par des sphingomyélinases (SMases), des phospholipases C spécifiques des sphingomyélines, qui hydrolysent la liaison phosphodiester pour libérer des céramides et de la phosphorylcholine (**figure 24**).

Différentes isoformes de SMases ont été identifiées et se distinguent essentiellement par leur pH optimum d'activité (SMases acides, SMases neutre et SMases alcaline).

6.2 Les voies enzymatiques de la formation des céramides dans l'apoptose

La formation des céramides au cours du processus apoptotique peut résulter de l'activation de la biosynthèse *de novo* ou de l'hydrolyse de sphingomyéline (SM) par diverses

sphingomyélinases. L'activation de ces voies enzymatiques peut être modulée par diverses sphingomyélinases ainsi que par des stimuli physiologiques ou environnementaux (**figure 24**).

L'induction de la synthèse *de novo* au cours de l'apoptose a été observée en réponse à des stimuli de stress, comme des drogues cytotoxiques, la daunorubicine et la doxorubicine dans des lymphocytes (Bose *et al.*, 1995 ; Boland *et al.*, 1997) ou les radiations ionisantes dans des cellules de la peau (Farrell *et al.*, 1998). Les acides gras libres, comme le palmitate, précurseurs métaboliques, sont également capables d'induire l'apoptose de cellules hématopoïétiques (Paumen *et al.*, 1997).

6.3 Les sites subcellulaires de la production de céramides pro-apoptotiques

Alors que les céramides synthétisés *de novo* s'accumulent sur la face cytosolique du RE (Michel et Van Echenten-Deckert, 1997), la voie des SMases peut mener à la formation de céramides dans différents compartiments subcellulaires.

*La membrane plasmique

La membrane plasmique contient des microdomaines membranaires, associés à la cavéoline (les cavéoles) ou non (les radeaux lipidiques). Ces microdomaines sont riches en sphingolipides comme les sphingomyélines et les gangliosides, en cholestérol et en différents constituants protéiques comme des récepteurs membranaires, tel que TNF-R, des protéines particulières, comme les protéines à pied d'ancrage glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) et des protéines de signalisation, telle que la famille des src-tyrosine Kinases (Brown et London, 2000). Des travaux récents suggèrent que ces structures sont impliquées dans la transduction du message apoptotique (Ko *et al.*, 1999 ; Zundel *et al.*, 2000 ; Rath *et al.*, 2008). Des activités SMases acides ont été décrites au niveau de ces microdomaines et sont associées à une production cavéolaire de céramide (Liu et Anderson, 1995).

*Le noyau

Depuis 1975, il semble que le noyau, riche en sphingomyéline constitue un nouveau site de formation de céramides dans des cellules apoptotiques (Spangler *et al.*, 1975). Par exemple, l'hypoxie dans des hépatocytes de rat induit l'activation de cette enzyme, la production de céramides nucléaires et l'apoptose (Tsugane *et al.*, 1999). Mais les mécanismes d'action de ces céramides nucléaires ne sont pas élucidés à ce jour.

*La mitochondrie

La mitochondrie, quand à elle, pourrait être un nouveau site d'accumulation de céramides pro-apoptotiques étant donné que la mitochondrie contient bien de la sphingomyéline synthase ainsi qu'une céramidase (Bribes *et al.*, 2001).

6.4 Les cascades de signalisation activées par les céramides et leurs conséquences sur l'apoptose

Il a été démontré que l'apoptose céramide-dépendante peut être médiée par deux grands mécanismes dont le premier implique la cascade des kinases du facteur de transcription c-jun (Verheij *et al.*, 1996 ; Xia *et al.*, 1995) et le deuxième met en jeu la mitochondrie.

Au cours du processus apoptotique, les cibles de c-jun semblent être divers, bien qu'encore mal définies à l'heure actuelle. Par exemple, dans les cellules T, c-jun, activé en réponse à la génération intracellulaire de céramides induit la réponse apoptotique par une régulation transcriptionnelle de l'ARN messager, tel que ceux pour le ligand de Fas ou le TNF- α (Herr *et al.*, 1997), qui sont alors adressés à la membrane plasmique, interagissent avec leur récepteur et amplifient la réponse apoptotique.

Aussi bien, il a été démontré que l'accumulation intracellulaire de céramides est souvent associée à une altération mitochondriale, caractérisée par une transition de perméabilité membranaire, la génération de ROS et la diffusion libre de facteurs apoptotiques (caspases, cytochrome c, Apoptosis Initiating Factor (AIF).....). Des travaux suggèrent que les céramides peuvent également avoir une action directe sur les mitochondries. En effet, une accumulation de céramides mitochondriaux a été observée dans des hépatocytes traités avec le

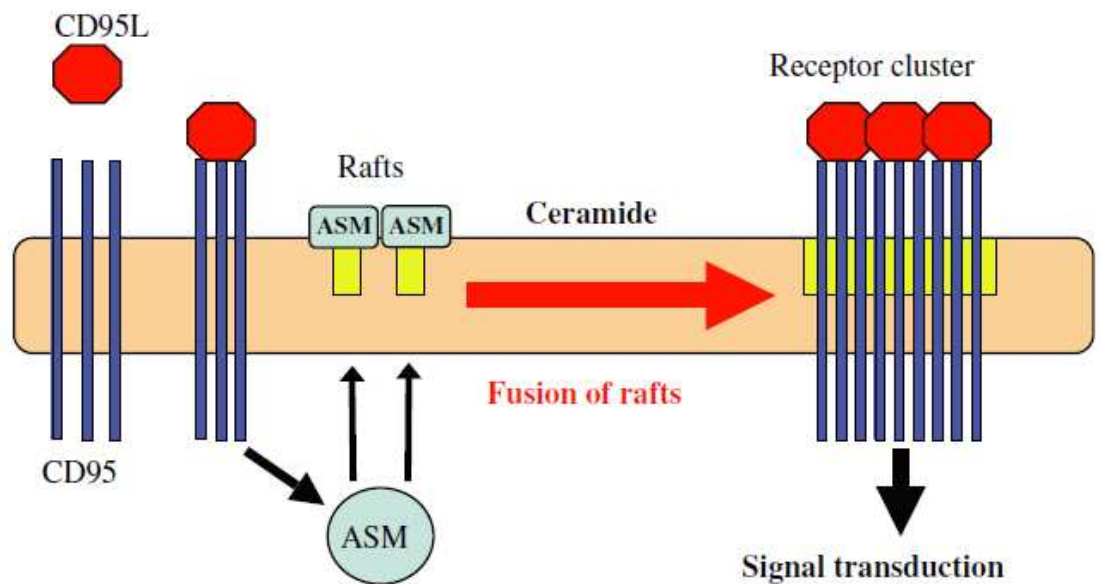


Figure 25: Les plateformes membranaires enrichies en céramides servent à la clustérisation des récepteurs et l'amplification du signal (d'après Grassme et al., 2007).

La stimulation des cellules par un récepteur (ici CD95), entraîne l'activation des ASM et leurs translocation vers la partie extracellulaire de la membrane cellulaire. L'ASM engendre la libération de céramides de la SM qui enrichissent la plateforme membranaire et forment des microdomaines. Dans ces microdomaines, s'effectue la réorganisation et la clustérisation des récepteurs et poursuite l'amplification des premiers signaux apoptotiques.

TNF- α (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997). Par ailleurs, les céramides, issus de sphingomyélines de la membrane mitochondriale, peuvent induire le relargage du cytochrome c (Bribes *et al.*, 2001). Les céramides mitochondriaux pourraient initier le signal de mort en régulant l'activité des protéines de la famille des Bcl-2. En effet, les céramides inhibent l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 en activant une phosphatase mitochondriale (PP2A) (Ruvolo *et al.*, 1999), et en inhibant parallèlement la phosphorylation de Bcl-2 par la PKC α (Lee *et al.*, 1996 ; Ruvolo *et al.*, 1998). L'accumulation de céramides dans la mitochondrie pourrait également induire un découplage de la chaîne respiratoire menant à la formation de ROS (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997).

Il a été démontré que la génération de céramides via la membrane cellulaire change rigoureusement ses propriétés en formant des petits microdomaines enrichis en céramides (Grassme *et al.*, 2007). La formation de ces microdomaines a été démontrée dans des modèles cellulaires après stimulation par les récepteurs CD95 (Grassme *et al.*, 2001), CD40 (Grassme *et al.*, 2002a), DR5 (Dumitru *et al.*, 2006), ou après infection par des microorganismes (Esen *et al.*, 2001 ; Grassme *et al.*, 2003 ; Becker *et al.*, 2008), ou irradiation (Charruyer *et al.*, 2005). La formation des microdomaines enrichis en céramides a pour fonction biologique, la stabilisation des radeaux lipidiques (Xu *et al.*, 2001). Un tel changement biophysique des propriétés de la membrane peut avoir comme conséquence un piégeage sélectif des protéines, en particulier les récepteurs et les protéines de signalisation dans les domaines membranaires enrichis en céramides (**figure 25**). En revanche, il a été démontré que la clustérisation du CD95, DR5 ou CD40 dans les plateformes membranaires enrichies en céramides, est nécessaire pour la signalisation transmembranaire par l'intermédiaire de ces récepteurs (Grassme *et al.*, 2002b). La clustérisation des récepteurs peut avoir comme conséquence une densité très élevée de récepteurs, l'association spatiale des récepteurs activés avec les molécules de signalisation descendant, l'exclusion de molécules inhibitrices, une transactivation des enzymes s'associant aux récepteurs activés, un changement conformationnel du récepteur et/ou une stabilisation de l'interaction du récepteur avec son ligand. Ainsi, les plateformes enrichies en céramides peuvent principalement fonctionner pour réorganiser les récepteurs et les molécules de signalisation dans et à la membrane cellulaire pour faciliter et amplifier le processus de signalisation par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique (**figure 25**).

MATERIELS ET METHODES

I. Lignées cellulaires, culture et traitements

Au cours de ce travail nous avons utilisé deux lignées humaines du cancer du sein MDA-MB 231 et MCF7, qui proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC), une lignée murine du cancer du sein EMT-6H qui nous a été aimablement fournie par l'unité INSERM, U866, Dijon F-21000, France et une lignée CHO (Chinese Hamster Ovary) qui provient de l'ATCC. Ces cellules qui prolifèrent en adhésion, sont cultivées dans des milieux distincts qui sont du Leibovitz L15 pour les MDA-MB 231, du DMEM pour les MCF7, du EMEM pour les EMT-6H et du F12-K pour les CHO. Les milieux sont supplémentés respectivement par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur (56°C, 1h), 100 µg/ml pénicilline (1%) et 100 µg/ml streptomycine (1%), (Gibco, Invitrogen). Les cellules MCF7 ont été aussi supplémentées par l'insuline du veau (10 µg/ml, Sigma). Les cultures ont été maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité (95%) et en présence de 5% de CO₂. Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables). Les cellules MDA-MB 231 prolifèrent pendant 24h alors que les MCF7 prolifèrent pendant 48h afin d'atteindre leur phase exponentielle de croissance. Toutes les expériences sont réalisées au cours de cette phase car nous voulions étudier les effets des molécules testées sur la prolifération.

II. Synthèse et Purification des conjugués Dox-CPPs

Les peptides utilisés au cours de ce travail ont été synthétisés avec une cystéine du côté N-terminal pour le couplage ultérieur. Les peptides Tat et Pen ont été synthétisés par UFPeptides s.r.l (Italie) alors que le peptide M_{Ca}_{Abu} a été synthétisé par NeoMPS S.A (Starsbourg, France). La Dox (Alexis Biochemicals) a été liée aux trois peptides en utilisant un liant bifonctionnel, le Succinimidyl 4-[N-maleimidométhyl] cyclohexane-1-carboxylate (SMCC, Pierce), qui lie la fonction amine de la Dox à la cystéine du peptide selon la méthode décrite précédemment par Liang *et al.*, (2005). La concentration de la Dox utilisée pendant le couplage est trois fois supérieure à celle du peptide et ce pour permettre un bon rendement du couplage.

Dox.HCl a été dissoute dans du DMSO et par suite diluée à 1 mg/ml dans 3 ml du tampon phosphate, pH 8. Ensuite 40 µl de triéthylamine et 270 µl de SMCC (10 mg/ml) ont été ajoutés et incubés pendant 2h à l'obscurité et à température ambiante. Ensuite le pH a été ajusté à 5,5 avant d'ajouter le peptide correspondant (300 µl, 15 mg/ml) et le mélange est incubé pour encore

2h à l'obscurité et à température ambiante pour le couplage. La purification des conjugués formés a été réalisée par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) (AKTApurifier System) utilisant une colonne 1 ml HiTrap Heparin HP (GE Healthcare). Étant donné que les 3 peptides utilisés présentent une haute affinité à l'héparine, l'excès de la Dox non couplée et du liant (SMCC) sera élué respectivement. Le tampon de 'binding' utilisé au cours de la purification est 10 mM Na₂HPO₄, pH 7.0. Après 10 volumes de lavage, l'élution est réalisée avec un gradient linéaire de NaCl, 0-2 M dans du tampon 'binding'. Au cours de la purification, deux longueurs d'ondes ont été utilisées; 215 nm pour l'absorbance des peptides et 480 nm pour l'absorbance intrinsèque de la Dox. La détection simultanée des deux longueurs d'ondes dans le profil de purification a permis la distinction des fractions qui contiennent les complexes Dox-CPPs. Les fractions ont été aussi analysées par électrophorèse SDS-PAGE utilisant des gels Tris-Tricine 16,5 % précoulés (Biorad).

III. Effet de la Dox et des Dox-CPPs sur la prolifération cellulaire

1. Test de cytotoxicité

Le test MTT est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables (Mosmann, 1983). Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées par les molécules.

Les cellules (MDA-MB231 et MCF7) sontensemencées en plaques 96 puits et cultivées pendant 24 h dans 100 µl de milieu contenant 10 % de SVF avant d'être traitées. Pour chaque condition analysée, 6 puits différents sont réalisés (n = 6). Le traitement est réalisé pendant la phase exponentielle de croissance et dure 24h et 48h sans changement du milieu de culture avec des concentrations croissantes de Dox ou Dox-CPPs (10 nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM, 1µM, 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM et 20µM). Pour chaque temps étudié, 10 µl de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/ml, en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puit. Après 3h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, 100 µl DMSO (solution de lyse) sont ajoutés par puits suivit d'un mouvement de pipetage afin de lyser les cellules et de libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance est mesurée à 570 nm, par un lecteur de plaques ELISA (Fluostar). Les blancs de lecture correspondent à un milieu à 10 % de SVF contenant du MTT et du DMSO. Les résultats sont présentés en pourcentage de cytotoxicité: $1 - (\text{DO moyenne des cellules traitées} / \text{DO moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$. Les courbes doses-réponses ont été 'fittées' en utilisant le logiciel SigmaPlot10 afin de déterminer la concentration effective correspondante à 50% de cytotoxicité (EC50).

2. Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité consiste à déterminer la capacité des cellules à se diviser et à former des clones contenant au moins 40 cellules. Le comptage des colonies se réalise de la

façon suivante : après traitement des cellules avec différentes concentrations de Dox ou Dox-CPPs pendant 2 h (100nM, 500nM, 1µM et 2,5µM), les cellules sont comptées, à l'aide d'une cellule de Malassez sous microscope, puis ensemencées dans des boîtes six puits en raison de 500 cellules par puit et mises à incuber à 37°C, 5% de CO₂. Après 11 jours, les cellules sont rincées au PBS et puis sont fixées au méthanol, colorées au cristal violet à 0,1% et comptées sous microscope. Le crystal violet (anciennement gentian violet) est utilisé couramment dans ce type d'expérience parce qu'il est un colorant spécifique des protéines.

IV. Etude de la pénétration et de la localisation cellulaire de la Dox et des Dox-CPPs

1. Analyse de la pénétration cellulaire par cytométrie en flux

La pénétration de la Dox ou des Dox-CPPs a été caractérisée par cytométrie en flux en utilisant la fluorescence propre de la Dox (λ_{ex} = 470 nm, λ_{em} = 590 nm). Les cellules MDA-MB 231 et MCF7 ont été cultivées toute la nuit dans des plaques 24 puits puis traitées avec des concentrations croissantes de la Dox ou des Dox-CPPs (10 nM, 50nM, 100nM, 250nM, 500nM, 1µM, 2,5µM, 5µM, 7,5µM et 10µM) Les cellules sont ensuite lavées au PBS, décollées par trypsination et analysées immédiatement par cytométrie en flux (BD Biosciences). Les résultats obtenus sont analysés par le logiciel WinMDI2.9 et les courbes dose-réponses sont tracées et fittées par le logiciel SigmaPlot 10.

2. Analyse de la localisation cellulaire par microscopie confocale

La localisation de la Dox ou des Dox-CPPs a été visualisée par microscopie confocale. Les cellules MDA-MB 231 et MCF 7 sont cultivées toute la nuit dans des boîtes de pétri de 3,5 cm de diamètre à 80% de confluence et sont par suite incubées avec 1 ou 5 µM de Dox ou Dox-CPPs pendant 2h ou 24h. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS et incubées avec 1 µM de Syto 40 (Molecular Probes, λ_{ex} = 405 nm, λ_{em} = 450 nm) pendant 20 mn à 37°C pour le marquage nucléaire. Les cellules sont lavées une deuxième fois au PBS et incubées pendant 5 mn à l'obscurité/RT avec 5 µg/ml de Concanavaleine A couplée à la FITC (Con A, Sigma, λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 520 nm) pour le marquage membranaire. Après un dernier

lavage au PBS, les cellules sont immédiatement analysées par microscopie confocale équipée d'un système opérateur Leica TCS-SP2 et utilisant l'objectif à immersion à eau 20×. La fluorescence émise pour chaque fluochrome décrit est collectée dans un plan confocale z.

V. Analyse de l'apoptose induite par la Dox et les Dox-CPPs

1. Analyse morphologique après coloration de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342

Les noyaux des cellules MDA-MB 231, EMT-6H et CHO sont marqués à l'aide du fluorochrome Hoechst 33342 ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 450 \text{ nm}$). Il s'agit d'un marqueur vital qui se fixe sur l'ADN et permet ainsi de visualiser les modifications morphologiques (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) des cellules en apoptose.

De $1 \text{ à } 5.10^5$ cellules, sont incubées, en présence de la Dox ($0,5 \mu\text{M}$ et $2,5 \mu\text{M}$) ou des Dox-CPPs ($0,5 \mu\text{M}$) à 37°C pendant 24h. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et incubées avec la solution PBS- Hoechst 33342 ($10 \mu\text{g/ml}$) pendant 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Après lavage, $5 \mu\text{l}$ de la suspension cellulaire sont déposés entre lame et lamelle et observés au microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert, Germany) puis les cellules sont photographiées.

2. Analyse morphologique après coloration au May-Grunwald-Giemsa

Dans le but d'observer l'effet de Dox et Dox-CPPs sur le détachement ainsi que l'aspect morphologique des cellules MDA-MB 231, nous avons adopté la technique de coloration au May-Grunwald-Giemsa (Tai *et al.*, 2000). Le réactif de May-Grunwald donne une coloration violette au cytoplasme alors que le réactif de Giemsa donne une coloration bleue au noyau. Dans des plaques 6 puits on a mis des lamelles stériles de dimension $2/2 \text{ cm}$. Sur ces lamelles on a déposé 10^5 cellules/puit. Après 24 heures d'incubation, ces cellules sont traitées avec la Dox ($0,5 \mu\text{M}$ et $2,5 \mu\text{M}$) ou les Dox-CPPs ($0,5 \mu\text{M}$) à 37°C pendant 24h. Les lamelles sont ensuite retirées des plaques et laissées sécher 20 min, à température ambiante. Les lamelles sont trempées dans un bac contenant le réactif de May-Grunwald pendant 2 min, puis rincées

à l'eau bidistillée. Ensuite, les cellules sont colorées par le réactif de Giemsa (dilué au 1/5 dans l'eau distillée) pendant 10 min, elles sont rincées ensuite à l'eau bidistillée et laissées sécher 5 min. Enfin, les lamelles sont rincées successivement dans différents bains d'alcool afin de déshydrater les cellules. Ces dernières sont ensuite observées au microscope optique au grossissement X40 et X100 puis photographiées.

3. Quantification des cellules apoptotiques

3.1 Quantification par cytométrie en flux

La distribution des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire est caractérisée par la cytométrie en flux, à savoir les phases G0/G1, S, G2/M par la mesure de la quantité d'ADN présent dans la cellule au cours de son développement. Chaque pic donné par le cytomètre correspond à une population cellulaire accumulée à une phase donnée. Au cours de l'apoptose, il y a fragmentation de l'ADN et les cellules apoptotiques contiennent alors une quantité d'ADN inférieure à 2n. Une fluorescence émise réduite est détectée par le cytomètre et la population cellulaire s'accumule dans une région inférieure à G0/G1, appelée subG0/G1 (**figure 26**). L'analyse du cycle cellulaire a été réalisée par l'iodure de propidium (IP) qui est un intercalant de l'ADN excitable à 488 nm et donnant une émission rouge à 600 nm selon le protocole utilisé par Nicoletti *et al.*, en 2006.

Un nombre de 10^6 cellules sontensemencées, traitées avec Dox ou Dox-CPPs, prélevées par pipetage à différents points de temps et centrifugées à 1200 g pendant 5 min à 4°C. Après un lavage au PBS (137 mM NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄, 14 mM KH₂PO₄) et une centrifugation dans les mêmes conditions, un volume de 500 µl d'éthanol 70% préalablement gardé à -20°C est ajouté aux cellules en vortexant, puis conservées à -20°C au moins 24 heures. L'éthanol permet la fixation des cellules et la perméabilisation de la membrane cytoplasmique. Les cellules sont ensuite centrifugées et le culot est repris dans 300 µl de PBS contenant 50 µg/ml d'IP, (Sigma). Après incubation à l'obscurité pendant 30 min, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (canal FL-2). Après exclusion des débris, l'acquisition et l'analyse de la fluorescence ont été réalisées sur 10.000 évènements par un cytomètre de flux FACS Calibur et avec le logiciel CellQuest (Becton Dickinson).

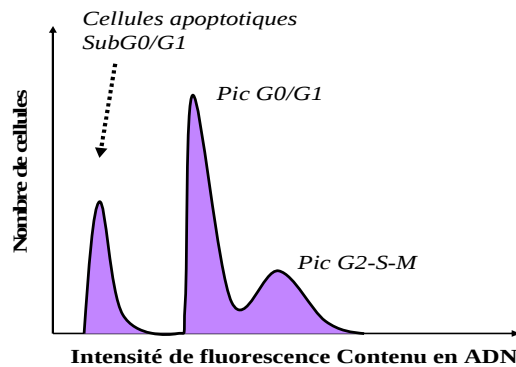


Figure 26: Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

3.2 Quantification par coloration avec le Hoechst 33342

Le pourcentage des cellules apoptotiques présentant une chromatine condensée et un noyau fragmenté visualisé suite à la coloration du noyau par le Hoechst 33342 a été aussi déterminé par comptage de 300 cellules à chaque échantillon.

4. Etude de la fragmentation de l'ADN

Les cellules MDA-MB 231 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à une densité de 10⁷ cellules. Après 24 h de prolifération, les cellules ont été traitées avec Dox ou Dox-CPPs à une concentration de 0,5 µM pendant 24 h. Les cellules sont ensuite récupérées par trypsination, lavées au PBS 1X et un culot de 10⁷ cellules est constitué pour chaque condition.

Le culot cellulaire est alors repris dans du tampon de lyse (Proméga) en présence de 25 µl de protéinase K (0,5 mg/ml) et incubé à 56°C toute la nuit. L'ADN est par suite extrait avec le phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Approximativement, 20 µg d'ADN sont déposés sur un gel d'agarose (1.8%) contenant 5 µg/ml de BET (bromure d'éthidium). La migration est effectuée dans un bain de TBE (Tris 90 mM, acide borique 90 mM, EDTA 2

mM, pH 8) à 50 volts pendant 120 mn puis l'ADN est visualisé sous une lampe UV et photographié.

VI. Mesure de l'activation des caspases par inhibition

Aux cellules MDA-MB 231 traitées ou non avec Dox (0,5 μ M et 2,5 μ M) ou Dox-CPPs (0,5 μ M), un inhibiteur spécifique de caspase-3 et 7 (z-DEVD-fmk) ou un inhibiteur à large spectre z-VAD-fmk ont été ajoutés dans le milieu de culture en parallèle. Ces réactifs proviennent de Sigma et ont été utilisés à la concentration de 100 μ M. Chaque inhibiteur est dissous dans du DMSO et stocké en aliquots à -20 °C. La teneur finale en DMSO dans le milieu de culture n'excède pas 1 % (v/v), concentration non toxique pour les cellules étudiées. Après incubation, le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé par une coloration au Hoechst 33342.

VII. Extraits cellulaires et Western-Blot

Les lysats sont préparés à partir de 5 à 6 10^6 de cellules en culture traitées ou non par Dox (0,5 μ M et 2,5 μ M) ou Dox-CPPs (0,5 μ M). Les cellules sont ensuite lavées par du PBS 1X à 4°C. Puis elles sont lysées dans un tampon de lyse dont la nature est fonction de la protéine que l'on souhaite identifier. Pour la caspase -8, 9 et 3, les cellules sont reprises dans du tampon Laemmli contenant 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glycérol, 2 % SDS et incubée pendant 30 mn à 45°C. Afin d'éliminer en grande partie l'ADN génomique des lysats, des ultra-sons sont appliqués à une fréquence de 50 Hz à 4°C, et suivis d'une centrifugation pendant 20 min à 15000 rpm à 4°C. Pour la détection de Bcl-2, Bcl-xL, ROCK I, Bid, XIAP et TRAIL, les cellules sont lysées dans du tampon Triton contenant 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM NaPP, 10 mM NaF, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM EGTA pH 7.6, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin et 5 μ g/ml pepstatine. Le lysat a été laissé 30 min dans la glace afin d'obtenir une lyse complète, les inhibiteurs de protéases empêchent les clivages non physiologiques. Les débris membranaires sont éliminés par centrifugation à 15000 rpm pendant 20 minutes à 4°C.

Tableau II: Caractéristiques des anticorps primaires utilisés en Western-blot

Protéines	MM (kDa)	Hôte	monoclonal/ polyclonal	Dilution	Source
Procaspase 3	32	lapin	Polyclonal	1:1000	H 277, Santa Cruz Biotechnology, Inc
Caspase 3 active	20/17	lapin	Polyclonal	1:1000	Cell signaling
-Procaspase 8 -Caspase 8 active	55/53 43/41	souris	Monoclonal	1:800	Alexis
-Procaspase 9 -Caspase 9 active	47 35	lapin	Polyclonal	1:1000	Cell Signaling
Bcl-2	24	souris	Monoclonal	1:1000	Calbiochem
Bcl-xL	26	souris	Monoclonal	1:100	Biosciences Pharmigen
Bid	22	souris	Monoclonal		R&D SYSTEMES
XIAP	57	souris	Monoclonal	1:1000	BD Transduction Laboratories
TRAIL	24	lapin	Polyclonal	1:500	Abcam
ROCK I	160/130	lapin	Polyclonal	1:1000	H85, Santa Cruz Biotechnology, Inc
HSC-70	70	Souris	Monoclonal	1/10000	B-6, Santa Cruz Biotechnology, Inc

Les protéines sont dosées avec un kit de dosage protéique (MicroBCA Protein Assay, Pierce) et congelées à -80°C . 40 μg de protéines sont mélangées à un volume de tampon d'échantillon (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0,18 M β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, et 0.005% bleu de bromophénole), portées à ébullition pour dénaturer les protéines et sont séparées par SDS-PAGE dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) à 80 V constant et déposées sur un gel de polyacrylamide dénaturant (10 à 15% selon les protéines). Les gels sont ensuite transférés sur des membranes de PVDF (polyvinylidène difluoride) (Hybond-P, Amersham). Les membranes sont préalablement trempées quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincées à l'eau puis équilibrées quelques minutes dans du tampon transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % Méthanol). Les gels de polyacrylamide sont également équilibrés quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec les membranes. Le transfert s'effectue pendant 16 heures à 40V et à 4°C . Les membranes sont incubées pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM) contenant 0,1% Tween et 5% de BSA afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminer le tampon de blocage, les membranes sont lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires à des dilutions adéquates dans du tampon TBS-0,1% Tween, 3% BSA et 1/500 Azide de sodium durant toute la nuit à 4°C et sous agitation. Le lendemain, elles sont lavées 3 fois pendant 10 min dans du tampon TBS-0,2% Tween avant d'être incubées pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps secondaires spécifiques aux anticorps primaires et couplés à la peroxydase dans du tampon TBS-0,1% Tween et 5% Lait pendant 1h à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés pour la détection des différentes protéines ainsi que leur facteur de dilution sont résumés dans le tableau II. Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :

- L'anticorps monoclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxydase à 1:5000 (Amersham)
- L'anticorps monoclonal de chèvre anti IgG de souris couplé à la peroxydase à 1:1000 (Pierce, France).
- L'anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase à 1:3000 (Santa-Cruz Biotechnology).

Après 3 lavages de 10 min dans du tampon TBS-0,2 % Tween et 3 lavages de 1 min avec de l'eau ultrapure, la révélation chimioluminescente est réalisée avec le kit ECL normal (Amersham Pharmacia Biotech).

VIII. Etude de la libération du cytochrome c et de l'oligomérisation de Bax

Les cellules traitées (1×10^6) par Dox ($2,5 \mu\text{M}$) ou Dox-CPPs ($0,5 \mu\text{M}$) sont fixées dans du paraformaldehyde à 2 % (10 min à 4°C). Après lavage dans du PBS, elles sont perméabilisées par une solution de PBS, BSA 1%, saponine 0,1 % (20 min à température ambiante). Pour la détection de la libération du cytochrome c et la relocalisation de Bax, les cellules ont été incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire polyclonal anti-cytochrome c (Pharmingen, San Diego, CA) ou l'anticorps primaire monoclonal anti-Bax (clone 6A7, Sigma Aldrich) dans une solution de PBS, BSA 1% et saponine 0,1 %. Après trois lavages successifs au PBS, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire marqué à l'alexa-488 (1/10000e, Molecular Probes) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont rincées avec du PBS et sont ensuite analysées par cytométrie en flux ou bien déposées entre lame et lamelle pour être visualisées sous microscope à fluorescence.

VIII. Etude de l'implication des espèces réactives d'oxygènes (ROS) par la N-acétyl-cystéine (NAC) en cytométrie en flux

La N-acétyl-cystéine (NAC) est un antioxydant, piègeur de radicaux libres (H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$ et $\text{HOC}1$) (Gillissen et Nowak, 1998). Le co-traitement des cellules par la NAC et Dox ou avec la NAC et Dox-CPPs, permet de répondre à la question est ce que l'apoptose induite par la Dox ou Dox-CPPs est due à la génération des radicaux libres. Après prétraitement avec la NAC pendant 1 h, les cellules sont traitées avec $2,5 \mu\text{M}$ de Dox ou $0,5 \mu\text{M}$ de Dox-CPPs pendant 24 heures (à ce stade une coloration au Hoechst a été réalisée afin de déterminer le pourcentage des cellules apoptotiques). Les cellules sont centrifugées à 1700 rpm pendant 5 minutes puis incubées avec le dihydroethidium (DHE) $6.6 \mu\text{M}$ dans l'étuve à 37°C pendant 15

mn. Après un lavage au PBS les cellules sont suspendues dans 1 ml de PBS (+4°C) pour déterminer l'intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux.

X. Etude de l'expression des récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5)

1. Analyse de l'expression des récepteurs DR4 et DR5 par cytométrie en flux

Les cellules (1×10^6) traitées par Dox ou Dox-CPPs sont lavées dans du PBS/Azide de sodium (0,1%) puis incubées 1h à température ambiante avec les anticorps primaires monoclonaux anti-DR4 et anti-DR5 (Alexis Biochemicals) dans une solution de PBS, BSA 0,5%/Azide de sodium. Après lavage au PBS/Azide de sodium (0,1%), les cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire marqué à l'alexa-488 (1/10000e, Molecular Probes) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite fixées dans du paraformaldehyde à 1 % (10 min à température ambiante), rincées avec du PBS/Azide de sodium (0,1%) et analysées à l'aide d'un cytomètre en flux.

2. Détection des agrégats de DR4 et DR5 et leurs co-localisation avec les rafts par immunofluorescence

Pour la détection des agrégats de DR4 et DR5, le marquage des cellules traitées ou non par Dox (2,5 μ M) ou Dox-CPPs (0,5 μ M) se fait de la même façon que dans le protocole précédent sauf qu'après le dernier lavage, 10 μ l sont déposés entre lame et lamelle et visualisées sous microscope à fluorescence.

Pour la détection de la colocalisation des agrégats avec les radeaux lipidiques (rafts), la cholératoxine B-FITC (6 μ g/mL) qui marque les rafts a été rajoutée en même temps que l'anticorps secondaire. Ensuite trois lavages successifs ont été réalisés avec le PBS et 10 μ l sont déposés entre lame et lamelle et visualisées sous microscope à fluorescence.

3. Etude de l'effet d'antagonistes de récepteurs TRAIL (TRAIL-R1-Fc et TRAIL-R2-Fc)

Les cellules traitées ou non par Dox ou Dox-CPPs, sont co-traitées avec des protéines chimériques solubles Trail-R1-Fc et Trail-R2-Fc qui entrent en compétition pour TRAIL avec les récepteurs DR4 et DR5 membranaires. Après 24h d'incubation, le pourcentage des cellules apoptotiques est déterminé par une coloration au Hoechst 33342.

4. Etude de la sensibilité au ligand TRAIL

Les cellules traitées ou non par Dox (0,5 μ M et 2,5 μ M) ou Dox-CPPs (0,5 μ M), sont co-traitées avec un anticorps qui sensibilise le récepteur TRAIL-R1 au ligand TRAIL. Après 24 h d'incubation, le pourcentage des cellules apoptotiques est déterminé par une coloration au Hoechst 33342.

XI. Etude de l'expression du ligand TRAIL

1. Analyse de l'expression de l'ARNm par transcription inverse-Réaction de Polymérisation en Chaîne (RT-PCR)

1.1 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée sur des cellules MDA-MB 231 non stimulées. Après avoir décollé les cellules, 5×10^6 cellules sont lysées dans 0,5 ml de trizol puis incubées pendant 5 mn à température ambiante afin d'assurer la dissociation complète des complexes nucléoprotéiques. 100 μ l de chloroforme sont par la suite ajoutée et le mélange est secoué rigoureusement à la main pendant 15 secondes et laissé 2 à 3 mn à température ambiante. La solution est ensuite centrifugée 15 minutes à 12000 g et à 4 °C afin de séparer les différentes molécules. Trois phases distinctes sont observées: la phase inférieure qui contient le trizol et le chloroforme, une couche intermédiaire composée des protéines et la phase aqueuse supérieure qui contient les acides nucléiques. Après transfert de la phase

supérieure dans un tube, 250 μ L d'isopropanol sont ajoutés et incubés pendant 10 mn/RT afin de précipiter l'ensemble des ARN. Une centrifugation à 12000 g pendant 10 mn et à 4 °C puis un rinçage du culot nucléique à l'éthanol à 75 % est ensuite réalisé. Une dernière centrifugation est réalisée pendant 5 mn à 7500 g et à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 10 mn afin d'évaporer totalement l'éthanol. Finalement, les ARN totaux sont repris dans de l'eau stérile et solubilisés pendant 10 mn à 65°C puis laissés 30 mn dans la glace.

1.2 Synthèse d'ADN complémentaire (RT)

La transcription inverse permet la synthèse du brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARNm, aboutissant à la formation d'une molécule hybride ARN/ADN. Cette synthèse est réalisée à l'aide d'une enzyme, la transcriptase inverse, et nécessite l'apport d'une amorce permettant l'initiation. Lors de notre étude, la synthèse d'ADNc, réalisée à partir d'ARN messagers, a été possible grâce à l'utilisation d'une amorce s'hybridant uniquement à la séquence polyadénylée située en aval des ARN messagers, un oligo (dT). Aux 2 μ g d'ARN totaux dans 10 μ l d'eau, sont ajoutés 2 μ l de dNTP (50 μ M) et 3 μ l d'oligo (dT) (0,15 μ M). La solution est ensuite déposée pendant 10 mn dans un bain à 72°C. Le tampon de l'enzyme (5 $\times$ 5 μ l), 0,5 μ l d'RNAase, 0,2 μ l de l'enzyme reverse transcriptase et de l'eau stérile pour compléter à 20 μ l sont ensuite ajoutés et la synthèse d'ADNc est réalisée à 42°C pendant 1h 30 mn. La réaction est enfin stoppée en chauffant à 70°C pendant 15 minutes.

1.3 Amplification de l'ADNc par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de PCR a permis d'amplifier les transcrits du ligand TRAIL au niveau des cellules MDA-MB 231. La réaction est réalisée dans un microtube à PCR dans lequel sont mélangés 2 μ L d'ADNc matriciel à amplifier, 0,5 μ g/ml de chacune des deux amorces spécifiques (amorces dites 5' et 3'), 0,4 μ l de dNTPs (10 μ M), 5 μ l de tampon enzymatique à 10X et 0,2 μ l de Taq DNA polymérase, dans un volume final de 50 μ L. La réaction de PCR est ensuite réalisée sur un automate programmable pourvu d'un bloc chauffant permettant d'obtenir les températures spécifiques de chacune des étapes. Une première étape de

dénaturation de l'ADN est tout d'abord réalisée par chauffage à 94°C pendant 3 mn. L'hybridation des amorces est ensuite effectuée pendant 45 secondes à 55 °C. Finalement, une polymérisation à 72°C pendant 45 secondes. Ces trois étapes sont répétées durant 32 cycles. Les séquences des amorces 5' et 3' utilisées pour l'amplification réalisée par PCR sont les suivantes : 5'CTTCACAGTGCTCCTGCAGT-3' (sens) et 5'-TTAGCCAACCTAAAAAGGCCCC-3' (anti-sens).

Lors de la réaction d'amplification, un contrôle négatif de la réaction est réalisé en remplaçant les ADNc par de l'eau.

Un contrôle positif basé sur l'utilisation des amorces de la GAPDH (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (sens) et 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (anti-sens) est également réalisé afin de permettre la vérification de l'intégrité de l'ADNc synthétisé.

2. Analyse de l'expression du ligand TRAIL par immunofluorescence

Le marquage des cellules non traitées se fait de la même façon que dans le protocole de l'immunofluorescence des récepteurs de TRAIL en utilisant l'anticorps primaire monoclonal anti-TRAIL (eBioscience, France). Les cellules sont ensuite visualisées sous microscope à fluorescence.

XII. Etude de l'implication des céramides dans l'apoptose

1. Etude de la sensibilité au C2-céramide

Les cellules traitées ou non par Dox (0,5µM et 2,5µM) ou Dox-CPPs (0,5µM), sont co-traitées avec C2-ceramide (20 nM). Après 24h d'incubation, le pourcentage des cellules apoptotiques est déterminé par une coloration au Hoechst 33 342.

2. Détection de céramides totale par cytométrie en flux

Les cellules traitées (1×10^6) par Dox ($0,5 \mu\text{M}$) + C2-ceramide ou Dox-CPPs ($0,5 \mu\text{M}$) sont fixées dans du paraformaldehyde à 2 % (10 min/RT). Après lavage dans du PBS, elles sont perméabilisées par une solution de PBS, BSA 1%, saponine 0,1 % (20 min à température ambiante). Les cellules ont été incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire monoclonal anti-céramide (clone 15B4, Alexis Biochemicals) dans une solution de PBS, BSA 1% et saponine 0,1 %. Après trois lavages successifs au PBS, les cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire marqué à l'alexa-488 (1/10000e, Molecular Probes) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont rincées avec du PBS et sont ensuite analysées par cytométrie en flux.

3. Analyse de l'expression des céramides membranaires et détection de leur co-localisation avec les rafts par immunofluorescence

Les cellules (1×10^6) traitées par Dox ($0,5 \mu\text{M}$) + C2-ceramide ou Dox-CPPs ($0,5 \mu\text{M}$) sont lavées dans du PBS/Azide de sodium (0,1%) puis incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps primaire monoclonal anti-céramide (clone 15B4, Alexis Biochemicals) dans une solution de PBS, BSA 0,5%/Azide de sodium. Après lavage au PBS/Azide de sodium (0,1%), les cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire marqué à l'alexa-546 (1/10000e, Molecular Probes) et la cholératoxine B-FITC ($6 \mu\text{g/mL}$) pendant 30 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite fixées dans du paraformaldehyde à 1 % (10 min à température ambiante), rincées avec du PBS/Azide de sodium (0,1%) et visualisées sous microscope à fluorescence.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

CHAPITRE I

Etude du mécanisme d'internalisation cellulaire de la maurocalcine (MCa)

Introduction

Au cours de ces dernières années, notre équipe s'est intéressée à la caractérisation d'un nouveau peptide ayant les caractéristiques des CPPs, la maurocalcine (MCa) qui est une toxine de 33 acides aminés, isolée du venin du scorpion *Scorpio maurus palmatus* et l'un des effecteurs les plus puissants du récepteur de la ryanodine de type 1 (RyR1) (Estève *et al.*, 2003). Le peptide est aussi capable de traverser la membrane plasmique pour atteindre sa cible pharmacologique. Ces observations ont été rendues possibles par le couplage d'un analogue biotinylé de la MCa à un dérivé fluorescent de la streptavidine. Il a été démontré que le complexe formé traverse bien la membrane plasmique (Estève *et al.*, 2005).

Dans la littérature, les mécanismes mis en jeu dans l'internalisation des CPPs et de leurs conjugués à des cargos restent cependant mal compris. Par ailleurs, deux principaux mécanismes ont été proposés pour l'entrée cellulaire des CPPs. Le premier étant une translocation directe via la membrane plasmique. Ce mécanisme implique une interaction directe avec les charges négatives des lipides membranaires. Le second mécanisme implique une forme d'endocytose par lequel le CPP se trouve dans l'endosome et par suite dans le cytoplasme.

Le but de notre étude, dans la caractérisation de la MCa est de mieux cerner le mécanisme mis en jeu dans l'internalisation cellulaire, ce qui permettrait vraisemblablement d'optimiser l'utilisation de ce vecteur peptidique.

Les résultats de cette étude font l'objet de la publication suivante (Article I) :

ARTICLE I

Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine

Narendra Ram[‡], **Sonia Aroui[‡]**, Emilie Jaumain[‡], Hicham Bichraoui[‡], Kamel Mabrouk[§], Michel Ronjat[‡], Hugues Lortat-Jacob[¶], and Michel De Waard[‡]

[‡]INSERM U836, Grenoble Institute of Neurosciences, Research Group 3, Calcium Channels, Functions, and Pathologies Laboratory, Université Joseph Fourier, 38042 Grenoble Cedex 9, France,

[§]Université Aix-Marseille 1, 2, and 3, CNRS-UMR 6517, Chimie, Biologie et Radicaux Libres, 15521 Avenue Esc. Normandie Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France, and

[¶]Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

The Journal of Biological Chemistry (2008)

Direct Peptide Interaction with Surface Glycosaminoglycans Contributes to the Cell Penetration of Maurocalcine*

Received for publication, December 6, 2007, and in revised form, April 25, 2008. Published, JBC Papers in Press, July 3, 2008, DOI 10.1074/jbc.M709971200

Narendra Ram^{†1}, Sonia Aroui[‡], Emilie Jaumain[‡], Hicham Bichraoui^{†,2}, Kamel Mabrouk^{§,2}, Michel Ronjat[‡], Hugues Lortat-Jacob[¶], and Michel De Waard^{‡,3}

From the [†]INSERM U836, Grenoble Institute of Neurosciences, Research Group 3, Calcium Channels, Functions, and Pathologies Laboratory, Université Joseph Fourier, 38042 Grenoble Cedex 9, France, [‡]Université Aix-Marseille 1, 2, and 3, CNRS-UMR 6517, Chimie, Biologie et Radicaux Libres, 15521 Avenue Esc. Normandie Niemen, 13397 Marseille Cedex 20, France, and [¶]Institut de Biologie Structurale, UMR 5075 CEA/CNRS/Université Joseph Fourier, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1, France

Maurocalcine (MCA), initially identified from a tunisian scorpion venom, defines a new member of the family of cell penetrating peptides by its ability to efficiently cross the plasma membrane. The initiating mechanistic step required for the cell translocation of a cell penetrating peptide implicates its binding onto cell surface components such as membrane lipids and/or heparan sulfate proteoglycans. Here we characterized the interaction of wild-type MCA and MCA K20A, a mutant analogue with reduced cell-penetration efficiency, with heparin (HP) and heparan sulfates (HS) through surface plasma resonance. HP and HS bind both to MCA, indicating that heparan sulfate proteoglycans may represent an important entry route of the peptide. This is confirmed by the fact that (i) both compounds bind with reduced affinity to MCA K20A and (ii) the cell penetration of wild-type or mutant MCA coupled to fluorescent streptavidin is reduced by about 50% in mutant Chinese hamster ovary cell lines lacking either all glycosaminoglycans (GAGs) or just HS. Incubating MCA with soluble HS, HP, or chondroitin sulfates also inhibits the cell penetration of MCA-streptavidin complexes. Analyses of the cell distributions of MCA/streptavidin in several Chinese hamster ovary cell lines show that the distribution of the complex coincides with the endosomal marker Lyso-Tracker red and is not affected by the absence of GAGs. The distribution of MCA/streptavidin is not coincident with that of transferrin receptors nor affected by a dominant-negative dynamin 2 K44A mutant, an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis. However, entry of the complex is greatly diminished by amiloride, indicating the importance of macropinocytosis in MCA/streptavidin entry. It is concluded that (i) interaction of MCA with GAGs quantitatively improves the cell penetration of MCA, and (ii) GAG-dependent and -independent MCA penetration rely similarly on the macropinocytosis pathway.

Maurocalcine (MCA)⁴ is a 33-mer peptide isolated from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*. MCA is a highly basic peptide, as 12 of 33 residues are positively charged including the amino-terminal Gly residue, seven Lys residues, and four Arg residues. Because it contains only four negatively charged residues, the net global charge of the peptide is also positive. MCA possesses three disulfide bridges connected according to the pattern Cys³-Cys¹⁷, Cys¹⁰-Cys²¹, and Cys¹⁶-Cys³². ¹H NMR analysis further indicates that MCA folds along an inhibitor cystine knot motif (1). MCA contains three β -strands running from amino acid residues 9 to 11 (strand 1), 20 to 23 (strand 2), and 30 to 33 (strand 3), respectively, with β -strands 2 and 3 forming an antiparallel β -sheet. MCA has proven to be a highly potent modulator of the skeletal muscle ryanodine receptor type 1 (RyR1), an intracellular calcium channel. The addition of MCA to the extracellular medium of cultured myotubes induces Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum into the cytoplasm within seconds, as shown using a calcium-imaging approach (2, 3). These observations suggested that MCA is able to cross the plasma membrane to reach its pharmacological target. This was first demonstrated when a biotinylated analogue of MCA was coupled to a fluorescent derivative of streptavidin, and the complex was shown to cross the plasma membrane (4). Cell penetration of this MCA-based complex is rapid, reaches saturation within minutes, and occurs at concentrations as low as 10 nM (5). Furthermore, an alanine scan of MCA indicates the importance of basic amino acid residues in the cell penetration mechanism. Reducing the net positive charge of the molecule appears to decrease its cell penetration efficiency. In parallel, MCA analogues exhibiting decreased penetration efficiency were also found to present reduced affinity for negatively charged lipids of the plasma membrane (6).

Over the past years several peptides have been characterized for their ability to cross the plasma membrane (7–11). Cell penetration of peptides obeys three fundamental steps; (i) binding

* This work was supported by INSERM, Université Joseph Fourier, and Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[†] A fellow of the Région Rhône-Alpes and supported by an Emergence grant.

[‡] A fellow of l'Agence Française contre les Myopathies

[§] Supported by the "Techno pour la Santé" program of the Commissariat à l'Energie Atomique. To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-4-56-52-05-63; E-mail: michel.dewaard@ujf-grenoble.fr.

⁴ A fellow of l'Agence Française contre les Myopathies. The abbreviations used are: MCA, maurocalcine; MCA_b, biotinylated MCA; CHO, Chinese hamster ovary; CPP, cell penetrating peptide; CS, chondroitin sulfate; dp, degree of polymerization; FACS, fluorescence-activated cell sorter; HEK293, human embryonic kidney 293 cells; HS, heparan sulfate; HSPG, HS proteoglycans; HP, heparin; PC₅₀, half-maximal penetration concentration; PBS, phosphate-buffered saline; PtdIns, phosphatidylinositol; Strep-Cy5 (Cy3), streptavidin-cyanine 5 (cyanine 3); RU, response units.

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

to some components of the plasma membrane, (ii) the cell entry process *per se*, and (iii) the subsequent release into the cytoplasm. Obviously, none of these steps are well understood, and conflicting reports have emerged that may well arise from differences in the nature of the cell-penetrating peptide (CPP) considered, cell preparations, experimental conditions, type of linkage to cargoes, or even cargo nature. Two non-competing mechanisms have been proposed for the cell entry of CPP. One is direct translocation through the plasma membrane by the CPP-induced reorganization of the membrane after several possible structural alterations (7–11). According to some investigators, this mechanism implies a direct CPP interaction with negatively charged lipids of the plasma membrane. This mechanism of penetration would be independent of both cell metabolic energy and membrane receptor presence. For instance, it was proposed that penetratin binds to the polar heads of lipids leading to the formation of inverted micelles followed by a subsequent opening of these micelles inside the cell, and the release of the peptide into the cytoplasm (12). A second mechanism involves a form of endocytosis by which the CPP gets localized into late endosomes from where it may eventually leak out partially toward the cytoplasm. Endocytosis can be initiated by binding of CPPs to HS along with binding to negatively charged moieties on the cell surface, such as lipids (13). Lipid-raft dependent macropinocytosis has been evidenced as one endocytosis pathway for the cell entry of CPPs (14, 15). For instance, cellular uptake of a recombinant glutathione *S*-transferase-TAT-green fluorescent protein fusion protein depends on the presence of HS proteoglycans (HSPG) at the cell surface (16). Nevertheless, the role of GAGs in the cell penetration of CPPs remains debated. Stereochemistry, chain length, patterns of sulfation, and negative charge distribution of GAGs lead to a great variety of protein binding motifs. Furthermore, the CPP structure also appears to determine its specificity for HSPG (17).

In the present study we show that MCA interacts with GAGs such as HS and HP with apparent affinities in the micromolar range. A less penetrating analogue of MCA (MCA K20A) also shows a reduced apparent affinity for these GAGs, suggesting a direct link between GAG interaction and cell penetration. Cell penetration of MCA_b-streptavidin complex is strongly inhibited by an inhibitor of macropinocytosis indicating that this route of entry is responsible for MCA penetration. However, use of GAG-deficient cell lines indicates that half of the cell penetration of the complex is conserved and still relies on macropinocytosis. We conclude that GAG-dependent and -independent entries of MCA use similar pathways. Cell surface GAGs appear important to specify a higher cell penetration level, but penetration still can occur in their absence presumably because binding onto lipids can also activate macropinocytosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Equipment and Reagents—The Biacore 3000 apparatus, CM4 sensor chips, amine coupling kit, and HBS-P buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20, pH 7.4) were from Biacore AB. Biotin-LC-hydrazide was from Pierce. Streptavidin, 6-kDa HP, and 35–45-kDa chondroitin 4 sulfate (CS-A, here abbreviated CS) were from Sigma, strepta-

vidin-Cy5 or -Cy3 was from Amersham Biosciences, and 9-kDa HS was from Celsus. Concerning the 6-kDa HP, smaller molecular species that this material may contain were removed through a filtration column. This material was routinely used for Biacore analysis (18). This material was preferred to unfractionated heparin because it is less polydisperse. CS-A contains on average one sulfate group by disaccharide. The molecular weight of the HS used in this study was 9000 g/mol as determined by sedimentation-diffusion analysis. Its sulfur and nitrogen contents, determined by elemental analysis, were 6.96 and 2.15%, respectively.⁵ LysoTracker red DND-99 and Alexa Fluor® 488- or 594-conjugated transferrin were from Invitrogen. Size-defined HP-derived oligosaccharides (dp6 (hexa)-, dp12 (dodeca)-, and dp18 octadecasaccharide) were prepared from porcine mucosal HP as described (19). These HP-derived oligosaccharides were obtained by size fractionation. Because the starting material was HP and HS, these samples were relatively homogenous and highly sulfated. Strong anion exchange high performance liquid chromatography analysis of the HP-derived octasaccharide gave rise to three major peaks.

MCA, MCA_b, MCA K20A, and MCA_b K20A Peptide Syntheses—Chemical syntheses of MCA and MCA K20A or biotinylated MCA_b and MCA_b K20A were performed as previously described (2, 6). The molecular weights of the peptides are 3858.62 (MCA) and 3801.52 (MCA K20A). Their pI values are 9.46 (MCA) and 9.30 (MCA K20A), indicating that they are basic at physiological pH 7.4. Primary structures of MCA and MCA K20A are shown in Fig. 1A. The position of biotin in MCA_b and MCA_b K20A is on an extra amino-terminal lysine residue.

Formation of MCA_b- or MCA_b K20A-Strep-Cy5/3 Complexes—Soluble streptavidin-Cy5 or -Cy3 (Amersham Biosciences) was mixed with 4 mol eq of MCA_b or MCA_b K20A for 2 h at 37 °C in the dark in phosphate-buffered saline (PBS): 136 mM NaCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.6 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, pH 7.2. In some experiments, where indicated, various molar ratios of MCA_b and streptavidin-Cy3 were used to prepare the MCA_b-Strep complex, the concentration of streptavidin-Cy3 being kept constant (1 μM).

Surface Plasmon Resonance Binding Experiments—6-kDa HP and HS were biotinylated at their reducing end with biotin-LC-hydrazide. The biotinylation procedure was checked by streptavidin-peroxidase labeling after blotting of the material onto zeta probe membrane. These molecules have been widely used to study HP or HS binding onto several other proteins, such as RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), gp120, or CXCL12 (18, 20–22). For the purpose of immobilization of biotinylated HP and HS on a Biacore sensorchip, flow cells of a CM4 sensorchip were activated with 50 μl of 0.2 M *N*-ethyl-*N'*-(diethylaminopropyl)-carbodiimide and 0.05 M *N*-hydroxysuccinimide before injection of 50 μl of streptavidin (0.2 mg/ml in 10 mM acetate buffer, pH 4.2). The remaining activated groups were blocked with 50 μl of ethanolamine 1 M, pH 8.5. Typically, this procedure permitted coupling of ~3.000–3.500 resonance units (RU) of streptavidin. Biotinylated HP (5 μg/ml) or HS (10 μg/ml) in HBS-P

⁵ G. Pavlov and C. Ebel, personal communication.

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

buffer was then injected over a one-surface flow cell to obtain an immobilization level of ~50 RU. Flow cells were then conditioned with several injections of 2 M NaCl. One-flow cells were left untreated and served as negative control. For binding assays, different MCA concentrations in HBS-P and at 25  C were simultaneously injected at 20  l/min onto the control, HP, and HS surfaces for 5 min, after which the formed complexes were washed with running buffer. The sensorchip surfaces were regenerated with a 5-min pulse of 2 M NaCl in HBS-P buffer. For competition assays, MCA at 2  M was preincubated for at least 45 min with various molar excesses of HP-derived oligosaccharides (dp6, dp12, and dp18) and then injected over the HP surface as described above.

Cell Culture and Transfection—The wild-type Chinese hamster ovary (CHO-K1) cell line and mutant CHO cell lines lacking all GAGs (pgsB-618) or HS (pgsD-677) (ATCC) were maintained at 37  C in 5% CO₂ in F-12K nutrient medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin (Invitrogen). For transfection experiments with FuGENE[ ] HD (Roche Applied Science), wild-type and mutant pgsB-618 CHO cells were transfected with a plasmid that encodes a dominant-negative form of dynamin 2 (dynamin 2 K44A) in fusion with enhanced green fluorescent protein (pEGFP-N1 vector from Clontech). 24 h after transfection, cells were incubated with 1  M MCA_b-Strep-Cy3 or transferrin-conjugated to Alexa Fluor-594 (25  g/ml).

Flow Cytometry—MCA_b/MCA_b K20A-Strep-Cy5 complexes were incubated for 2 h in phosphate-buffered saline with CHO and mutant cells to allow cell penetration. The cells were then washed twice with PBS to remove the excess extracellular complexes. Next, the cells were treated with 1 mg/ml trypsin (Invitrogen) for 10 min at 37  C to remove remaining membrane-associated extracellular cell surface-bound complexes. After trypsin incubation, the cell suspension was centrifuged at 500   g and suspended in PBS. For inhibition studies, MCA_b-Strep-Cy5 complexes were preincubated with PBS containing variable concentrations (as indicated) of CS-A, HP, or HS for 45 min, and the mixture was incubated with cells for 2 h to investigate cell penetration. Washing and trypsination steps were also applied in these conditions. For experiments concerning endocytosis inhibitors, wild-type and mutant CHO cells were initially washed with F12K and preincubated for 30 min at 37  C with different inhibitors of endocytosis: (i) 5 mM amiloride, (ii) 5  M cytochalasin D, (iii) 5 mM nocodazole, or (iv) 5 mM methyl- -cyclodextrin (all from Sigma). The cells were then incubated for 2 h at 37  C with 1  M MCA_b-Strep-Cy5 or with 25  g/ml transferrin-Alexa Fluor 488 in the presence of each drug. For all these experimental conditions, flow cytometry analyses were performed with live cells using a BD Biosciences FACSCalibur flow cytometer. Data were obtained and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Live cells were gated by forward/side scattering from a total of 10,000 events.

Confocal Microscopy—For analysis of the subcellular localization of MCA_b-Strep-Cy5 complexes in living cells, CHO and mutant cells were incubated with the complexes for 2 h and then washed with Dulbecco's modified Eagle's medium alone. Immediately after washing, the nucleus was stained with 1

 g/ml dihydroethidium (Molecular Probes) for 20 min and then washed again with Dulbecco's modified Eagle's medium. After this step the plasma membrane was stained with 5  g/ml fluorescein isothiocyanate-conjugated concanavalin A (Sigma) for 3 min. Cells were washed once more, but with PBS. Live cells were then immediately analyzed by confocal laser scanning microscopy using a Leica TCS-SP2 operating system. Fluorescein isothiocyanate (E_x = 488 nm), Cy5 (E_x = 642 nm), or Cy3 (E_x = 543 nm) fluorescence emission were collected in z-confocal planes of 10–15 nm. Images were merged in Adobe Photoshop 7.0. For studies on endocytosis, wild-type and mutant CHO cells were incubated with 1  M MCA_b-Strep-Cy5 along with 25  g/ml transferrin conjugated to Alexa Fluor 488 (a marker of clathrin-mediated endocytosis) for 2 h, and the distribution was analyzed through confocal microscopy. In parallel studies cells were first incubated for 2 h with 1  M MCA_b-Strep-Cy5, washed with PBS, and incubated with 50 nM LysoTracker red DND-99 for 20 min at 37  C. Cells were then washed again with PBS and visualized alive by confocal microscopy.

Effect of HP on the Interaction of MCA_b with Lipids—Strips of nitrocellulose membranes containing spots with different phospholipids and sphingolipids were obtained from Molecular Probes. These membranes were first blocked with TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.1% (v/v) Tween 20) supplemented with 0.1% free bovine serum albumin (BSA) for about 1 h at room temperature and then incubated for 2 h at room temperature in TBS-T, 0.1% free BSA with either 100 nM MCA_b alone or a MCA_b-HP complex, resulting from a 45-min preincubation of 100 nM MCA_b with 10  g/ml HP. Incubation of the membranes with 100 nM biotin alone was used as a negative control condition. The membranes were then washed a first time with TBS-T, 0.1% free bovine serum albumin using a gentle agitation for 10 min. In all conditions MCA_b or biotin binding onto the lipid spots was detected by a 30-min incubation with 1  g/ml streptavidin horseradish peroxidase (Vector labs, SA-5704) followed by a second wash with TBS-T 0.1% free bovine serum albumin and an incubation with horseradish peroxidase substrate (Western Lightning, PerkinElmer Life Science) for 1 min. Lipid membranes were then exposed to a Biomax film (Kodak). The intensity of interaction with the lipids was analyzed with Image J (National Institutes of Health).

RESULTS

MCA Interacts with HS and HP—Preincubation of MCA_b with HP was found to partially inhibit its penetration in HEK293 cells (5). To evaluate the binding of MCA to HSPGs, HP or HS was coupled to a Biacore sensorchip, and the MCA binding was monitored by SPR (Fig. 1). Injection of a range of MCA concentrations (up to 5  M) over HP- or HS-coupled sensorchips gave rise to increasing binding amplitudes as shown in Fig. 1B. A mutated analogue of MCA (MCA K20A) showed impaired binding activity, indicating the importance of residue Lys-20 for glycosaminoglycan recognition. This finding is in agreement with the role of HSPGs in the cell entry of CPPs and with the observation that the MCA K20A has impaired cell penetration (6). The data could not be fitted to a binding model, presumably because all binding curves had a "square" shape

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

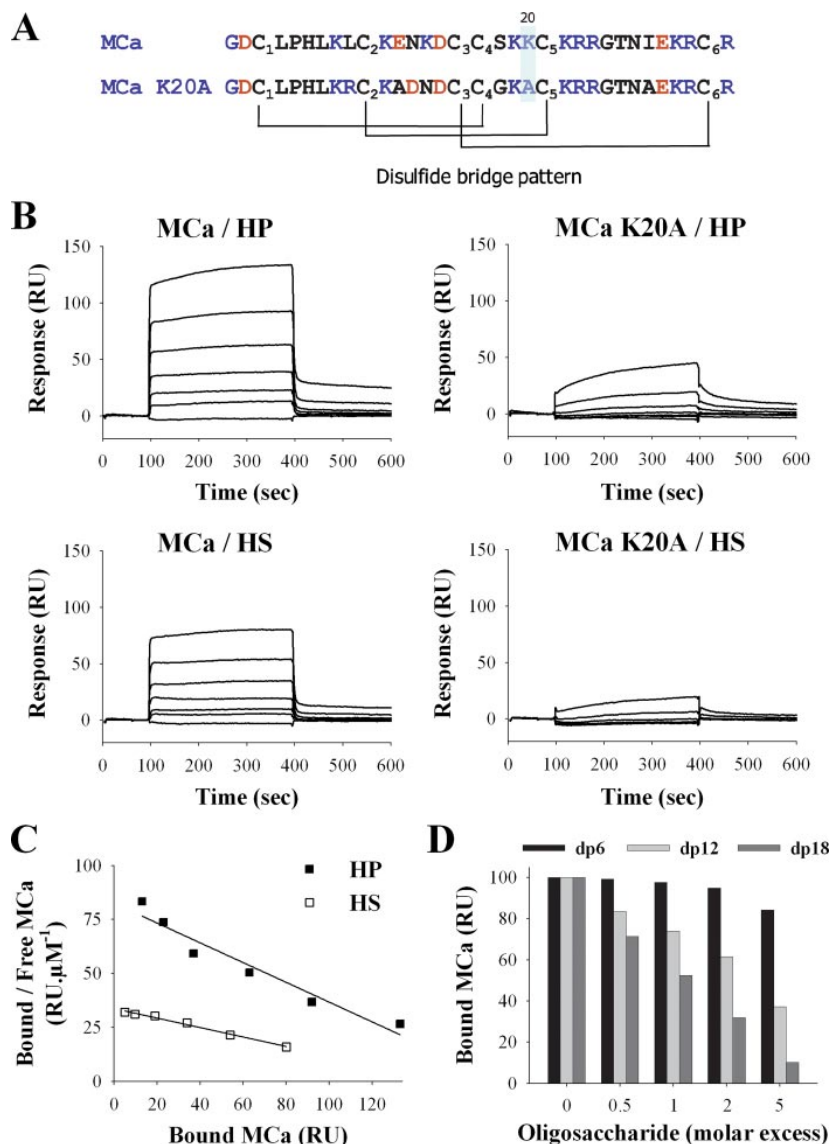


FIGURE 1. Binding of wild-type MCa and MCa K20A to HP or HS immobilized on SPR sensorchip. *A*, primary structure of MCa and MCa K20A. Basic and acidic residues are in blue and red, respectively. The disulfide bridge patterns of both molecules are shown. *B*, sensorgrams of the interactions. Various concentrations of MCa or MCa K20A were injected over a HP- or HS-activated surface at a flow rate of 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ during 5 min. After this peptide injection time, running buffer was injected to monitor the wash off reaction. All responses were recorded and subtracted from the control surface online as a function of time (in RUs). Each set of sensorgrams was obtained with MCa at (from top to bottom) 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, and 0 μM . *C*, Scatchard plots of the equilibrium binding data measured on the sensorgrams corresponding to the injection of MCa over HP or HS SPR surfaces. Data were fitted with a linear equation of the type $y = a \times x + b$, where $a = -0.46$ (HP) or -0.22 (HS), and $b = 82.5$ (HP) or 33.7 (HS). Calculated binding affinities are $K_d = 2.1 \mu\text{M}$ (HP) and $K_d = 4.6 \mu\text{M}$ (HS). *D*, inhibition of the MCa/HP binding by HP-derived oligosaccharides. MCa (1 μM) was coinjected with increasing molar excess of dp6, dp12, or dp18 for 45 min, then injected over a HP-activated sensorchip for 5 min. Responses (in RU) were recorded and plotted as the percentage of maximum responses obtained without preincubation (70–80 RU).

with sharp edges, suggesting high association and dissociation rates. We were, thus, not able to extract reliable kinetic values from curve-fitting. Equilibrium data, plotted according to the Scatchard representation, were used to determine affinity (Fig. 1C). The straight lines obtained show that MCa recognizes a single class of binding site, characterized by an affinity constant

of $K_d = 2.1 \mu\text{M}$ (HP) or $4.6 \mu\text{M}$ (HS). Because HP (6 kDa) and HS (9 kDa), immobilized at a level of 55 and 45 RU, respectively, both permitted a maximum binding of 155 RU of MCa (3859 Da), we calculated that each HP molecule bound an average of 4.4 MCa, and each HS molecule bound an average of 8 MCa. These two molecules contain, respectively, an average of 20 and 36 saccharidic units (using an approximate M_r of 600 for the HP-derived disaccharides and 500 for the HS-derived disaccharides); thus, it can be estimated conversely that each MCa should occupy in both cases an average of 4.5 monosaccharide units ($20/4.4$ or $36/8$) along the GAG chain.

HP is formed by the polymerization of a various number of disaccharide units. To study the effect of the size of the polymer on its interaction with MCa, we performed competition experiments using HP-derived oligosaccharides of a defined degree of polymerization (dp) (Fig. 1D). For this purpose wild-type MCa was preincubated with different HP-derived oligosaccharides (dp6, dp12, or dp18), as mentioned under “Experimental Procedures” and then injected over the HP-conjugated sensorchip. As shown, the oligosaccharides caused a dose-dependent inhibition of the interaction of MCa with HP. dp18 was the most active oligosaccharide with an IC_{50} close to 1 μM . In contrast, dp6 had almost no effect at 5 μM .

Dose-dependent Penetration of MCa_b-Strep-Cy5 in Wild-type and Mutant CHO Cell Lines—Results presented in Fig. 1 indicate that MCa interacts with negatively charged HP and HS. To challenge the implication of HP and HS in the cell penetration of MCa, the cell penetration efficacy of MCa_b-Strep-Cy5 was assessed using wild-type CHO cells (CHO wild-type) and mutant CHO cells lacking either HS (CHO pgsD-677) or all GAGs (CHO pgsB-618). Each CHO cell line was incubated for 2 h in the presence of variable concentrations of MCa_b-Strep-Cy5 complexes, and the amount of internalized complex was measured by FACS. Fig. 2A represents the dose-response curves for MCa_b-Strep penetration in

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

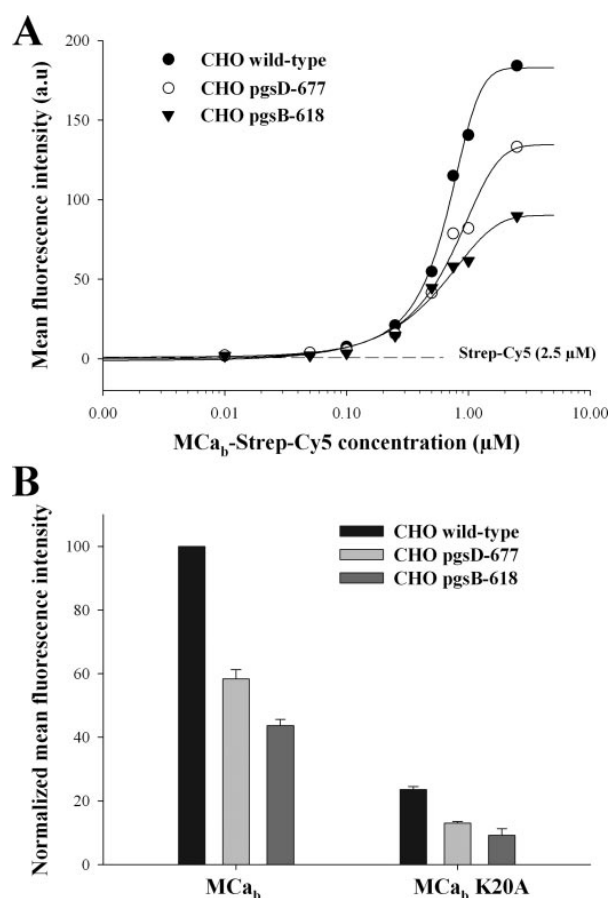


FIGURE 2. Cell penetration of McaB-Strep-Cy5 and McaB K20A-Strep-Cy5 in wild-type and HSPG mutant CHO cells. *A*, dose-dependent cell penetration of wild-type McaB-Strep-Cy5 in wild-type and mutant CHO cells, as assessed quantitatively by FACS. Results are from a representative experiment. The indicated concentrations are for streptavidin-Cy5 (from 10 nM to 2.5 μ M). Data were fitted by a sigmoid equation providing the following half effective concentrations: $PC_{50} = 0.46 \pm 0.01$ μ M (wild-type CHO), 0.56 ± 0.01 μ M (pgsD-677), and 0.71 ± 0.01 μ M (pgsB-618). *a.u.*, absorbance units. *B*, comparative cell penetration of 1 μ M McaB-Strep-Cy5 and McaB K20A-Strep-Cy5 in CHO and CHO mutant cell lines. Results are from a representative experiment of $n = 3$. Values are normalized with mean fluorescence intensity of wild-type CHO cells.

the three CHO cell lines. Half saturation of Mca penetration (PC_{50}) was only slightly modified by the absence of GAG, with PC_{50} values of 0.46, 0.56, and 0.71 μ M in CHO wild-type, CHO pgsD-677, and CHO pgsB-618, respectively. In contrast, the maximum amount of incorporated McaB-Strep-Cy5, measured in the presence of 1 μ M of complex, was strongly reduced in both the pgsD-677 and pgsB-618 CHO lines compared with the wild-type CHO, $43.0 \pm 3.0\%$ ($n = 3$) and $57.0 \pm 2.5\%$ ($n = 3$) reduction in pgsD-677 and pgsB-618 CHO, respectively (Fig. 2*B*). Similar experiments were done using the mutant McaB K20A that was previously shown to exhibit reduced penetration compared with the wild-type Mca (6). Results presented on Fig. 2*B* show that although already strongly reduced in wild-type CHO, the penetration of this mutant was further reduced in the HS- or GAGs-deficient CHO, resulting in similar reductions in cell entry; $45 \pm 2\%$ ($n = 3$) and $60 \pm 4\%$ ($n = 3$) reduction in pgsD-677

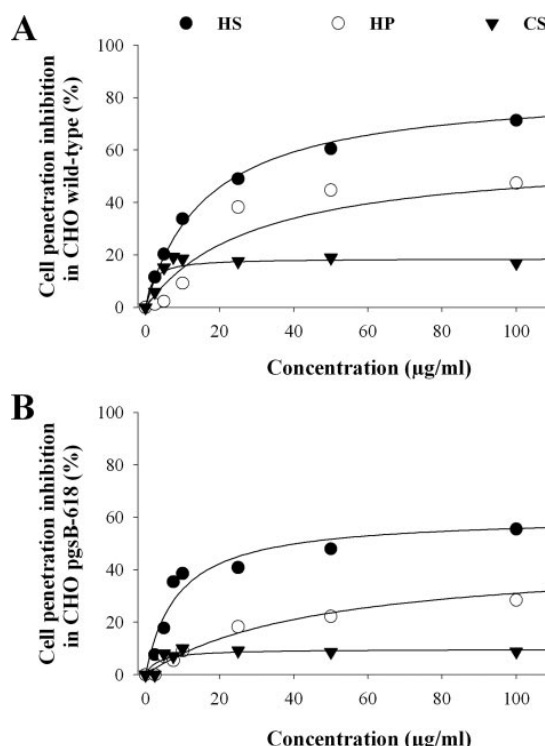


FIGURE 3. Inhibition of McaB-Strep-Cy5 cell penetration by soluble GAGs in wild-type and GAG-deficient CHO cell lines. *A*, dose-dependent inhibition of McaB-Strep-Cy5 cell penetration by soluble GAGs in wild-type CHO cells. Results are from a representative experiment of $n = 3$. Data were fitted by an hyperbola equation of the type $y = (a \times x)/(b + x)$, where $a = 83.9 \pm 1.7\%$ (HS), $58.7 \pm 9.8\%$ (HP), and $18.7 \pm 1.7\%$ (CS) and $b = 16.6 \pm 1.2$ μ g/ml (HS), 29.1 ± 14.5 μ g/ml (HP), and 1.8 ± 1.0 μ g/ml (CS). *B*, dose-dependent inhibition of McaB-Strep-Cy5 cell penetration by soluble GAGs in GAG-deficient CHO cells. Results are from a representative experiment of $n = 3$. Fitting values are $a = 60.6 \pm 8.6\%$ (HS), $45.4 \pm 3.5\%$ (HP), and $9.8 \pm 1.3\%$ (CS) and $b = 8.6 \pm 2.0$ μ g/ml (HS), 46.2 ± 8.9 μ g/ml (HP), and 3.3 ± 2.1 μ g/ml (CS).

and pgsB-618 CHO, respectively. This result indicates that the mechanism of cell penetration of the K20A mutant is identical to that of wild-type Mca despite the reduction in cell entry induced by the mutation. Therefore, McaB K20A also relies on GAG-dependent and GAG-independent mechanisms for cell penetration. This observation is consistent with the fact that the K20A mutation in Mca only reduces the PC_{50} value (6). In addition, the significant amount of McaB-Strep-Cy5 taken up by GAG-deficient cells indicates that a significant fraction of McaB-Strep-Cy5 penetration is GAG-independent, likely relying on the contribution of plasma membrane lipids.

Inhibition of Cell Penetration of McaB-Strep-Cy5 by Soluble HSPGs—According to the two observations described above, (i) interaction of Mca with HSPGs and (ii) reduction in Mca cell penetration in GAG-deficient cells, one would expect that incubation of Mca with soluble GAGs also reduces the penetration of McaB-Strep-Cy5. To challenge this point, McaB-Strep-Cy5 was preincubated with various concentrations of HS, HP, or CS for 45 min before incubation with wild-type or GAG-deficient CHO cells for 2 h. The total amount of McaB-Strep-Cy5 inside the cell was then measured by flow cytometry (Fig. 3). In wild-type CHO cells, HS (250 μ g/ml) produced the most

potent inhibition of cell penetration ($84 \pm 2\%$, $n = 3$, Fig. 3A). HP and CS were less efficient than HS with a mean inhibition of $59 \pm 10\%$ ($n = 3$) and $19 \pm 2\%$ ($n = 3$) for HP and CS, respectively (at $250 \mu\text{g/ml}$). Linking inhibition with the global negative charge of the GAG tested remains hazardous because charge relationship follows the rule $\text{HP} > \text{CS} > \text{HS}$, and here we observe $\text{HS} > \text{HP} > \text{CS}$. Interestingly, all three GAGs also reduced the cell penetration of MCA_b -Strep-Cy5 in GAG-deficient cells with the same rank as observed for wild-type CHO cells (Fig. 3B). Incubation of MCA_b -Strep-Cy5 with HS, HP, or CS induced a significant inhibition in GAG-deficient cells ($61 \pm 9\%$ ($n = 3$), $45 \pm 4\%$ ($n = 3$), and $10 \pm 1\%$ ($n = 3$) in the presence, respectively, of $250 \mu\text{g/ml}$ HS, HP, and CS) although lower than in wild-type CHO cells. Therefore, these data indicate that binding of soluble GAGs to MCA_b inhibits the cell penetration of MCA_b -Strep-Cy5 not only by preventing its interaction with CHO cell surface GAGs but also with non-GAG cell surface components.

To check whether GAGs could inhibit the interaction of MCA_b with membrane lipids, we investigated the effect of HP on MCA_b interaction with lipids immobilized on strips (Fig. 4A). MCA_b (100 nm) was incubated for 45 min in the presence or absence of HP ($10 \mu\text{g/ml}$) before incubation with lipid strips, as described under "Experimental Procedures." As shown in Fig. 4, HP significantly decreased the interaction of MCA_b with phosphatidic acid (66%), sulfatide (30%), phosphatidylinositol (PtdIns) (4)P (31%), PtdIns(3,4)P₂ (26%), and PtdIns(3,4,5)P₃ (72%) but not with lipids such as PtdIns(3)P, PtdIns(5)P, or PtdIns(3,4,5)P₂. These results provide a clear explanation of the fact that the interaction of MCA_b with soluble GAGs may also lead to an inhibition of the GAG-independent MCA_b cell penetration.

Effect of HSPGs on the Cell Distribution of MCA_b -Strep-Cy5—To examine the contribution of cell surface GAGs to the cell distribution of MCA_b -Strep-Cy5, MCA_b -Strep-Cy5 localization within the cell was defined using confocal microscopy and compared between wild-type and GAG-deficient CHO cell lines. For these experiments the plasma membrane, the nucleus, and MCA_b -Strep were labeled with concanavalin A (green), dihydroethidium (red), and Cy5 (blue), respectively. Images presented on Fig. 5 were obtained 2 h after the start of the cell incubation. Living cells were used to avoid possible cell distribution artifacts that may occur during the fixation procedure (5, 9, 23). As shown, MCA_b coupling to Strep-Cy5 is required for the cell penetration of Strep-Cy5 into CHO cells (Fig. 5A). The MCA_b -Strep-Cy5 complex is exclusively present as punctuate dots in the cytoplasm of living CHO cells. A similar cell distribution is observed in living CHO cell mutants lacking just HS (pgsD-677) or all GAGs (pgsB-618), suggesting that GAG-dependent and GAG-independent cell entries produce similar cell distributions (Fig. 5B). A Strep-Cy5 complex made with the MCA_b K20A analogue produces a similar subcellular distribution than MCA_b -Strep-Cy5 in wild-type and HS-deficient CHO cells, suggesting that the mechanism of cell penetration is not altered by point mutation of MCA_b (data not shown). Punctuate staining of MCA_b -Strep-Cy5 is indicative of a form of endosomal localization. This point was further investigated.

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

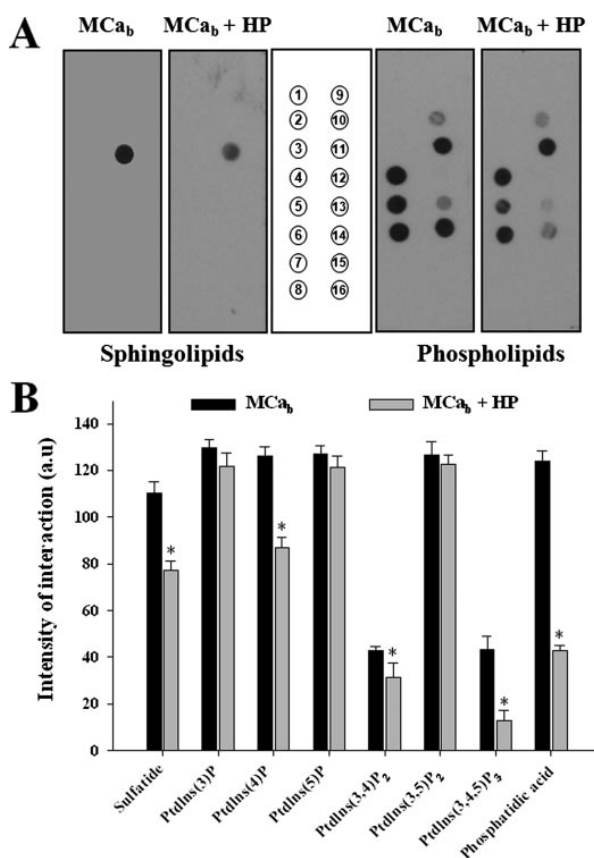


FIGURE 4. Effect of HP on the interaction of MCA_b with membrane lipids. A, 100 nm MCA_b alone or MCA_b preincubated for 45 min with $10 \mu\text{g/ml}$ of HP was incubated for 2 h with lipid strips. Each dot corresponds to 100 pmol of lipid immobilized on the strip. Left panel, interaction with various sphingolipids. 1, sphingosine; 2, sphingosine 1-phosphate; 3, phytosphingosine; 4, ceramide; 5, sphingomyelin; 6, sphingosylphosphocholine; 7, lysophosphatidic acid; 8, myriocin; 9, monosialoganglioside; 10, disialoganglioside; 11, sulfatide; 12, sphingosylgalactoside; 13, cholesterol; 14, lysophosphatidylcholine; 15, phosphatidylcholine; 16, blank. Right panel, interaction with various phospholipids. The lipids are identified by their numbered positions on the strip (middle panel). 1, lysophosphatidic acid; 2, lysophosphatidylcholine; 3, PtdIns; 4, PtdIns(3)P; 5, PtdIns(4)P; 6, PtdIns(5)P; 7, phosphatidylethanolamine; 8, phosphatidylcholine; 9, sphingosine 1-phosphate; 10, PtdIns(3,4)P₂; 11, PtdIns(3,5)P₂; 12, PtdIns(4,5)P₂; 13, PtdIns(3,4,5)P₃; 14, phosphatidic acid; 15, phosphatidylserine; 16, blank. B, Intensity of the interaction of MCA_b or $\text{MCA}_b + \text{HP}$ with various lipids as analyzed by Image J (NIH). The data are quantified in arbitrary units, and the results are presented as histograms. These experiments were repeated three times; data shown as triplicates. Significance is provided as a deviation of three times the S.D. value from 100% (denoted as asterisks). a.u., arbitrary units.

MCA_b -Strep-Cy5 Localizes to Endosomal Structures That Do Not Originate from Clathrin-mediated Endocytosis—Using confocal microscopy, the cell distribution of MCA_b -Strep-Cy5 was compared with that of endosomal structures as revealed by LysoTracker red staining. As shown on Fig. 6A, there is a very good co-localization between MCA_b -Strep-Cy5 and LysoTracker red fluorescence in all cell lines used (CHO wild-type, CHO pgsB-618, and CHO pgsD-677). These data clearly indicate that the lack of GAGs does not alter the subcellular localization of MCA_b -Strep-Cy5, suggesting that both GAG-dependent and GAG-independent cell penetration rely on

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

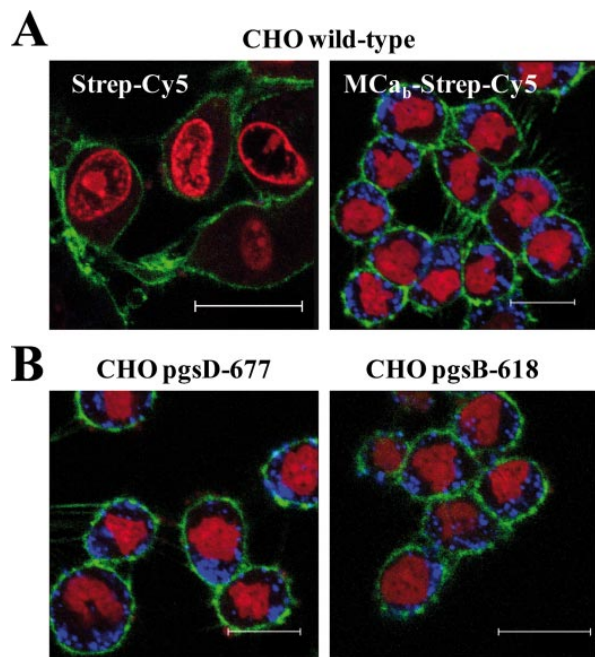


FIGURE 5. Cell distribution of MCA_b-Strep-Cy5 in living wild-type or mutant CHO cells. *A*, confocal images showing the cell penetration of Strep-Cy5 (2 h of incubation) in the absence (left panel) or presence (right panel) of MCA_b (4  m) in wild-type CHO cells. Scale bars, 25  m (left) and 15  m (right bar). *B*, cell distribution of MCA_b-Strep-Cy5 in mutant CHO cells. Scale bars, 15  m (left) and 20  m (right bar). Blue, Strep-Cy5; red, dihydroethidium, nuclei; green, concanavalin A, plasma membrane.

endocytosis. To determine whether the type of endocytosis involved in MCA_b-Strep-Cy5 entry could be altered in GAG-deficient cells, we first analyzed whether it had common features with clathrin-mediated endocytosis. Transferrin is known to enter cells via transferrin receptors through clathrin-mediated endocytosis (24, 25). As shown here, there was an almost complete absence of co-localization between MCA_b-Strep-Cy5 and transferrin-labeled with Alexa Fluor 488 in wild-type as well as in mutant CHO cells (Fig. 6B). These data indicate that the route of entry of Strep-Cy5 when coupled to MCA_b is not through clathrin-mediated endocytosis. It also indicates that the absence of GAGs at the cell surface does not favor clathrin-dependent endocytosis for the cell entry of MCA_b-Strep-Cy5 over other mechanisms of endocytosis. Expression of a dominant-negative mutant of dynamin 2, dynamin 2 K44A, is known to prevent normal clathrin-mediated endocytosis (26). As shown in Fig. 7A, expression of dynamin 2 K44A prevents the entry of transferrin-Alexa Fluor-594 in both wild-type and GAG-deficient CHO cells, confirming that transferrin receptors get internalized by clathrin-mediated endocytosis. In contrast, MCA_b-Strep-Cy3 entry was not prevented by the expression of dynamin 2 K44A (Fig. 7B), clearly indicating that clathrin-mediated endocytosis was not required for the entry of MCA_b when coupled to streptavidin.

Lack of Alteration of the Main Endocytosis Entry Pathway in GAG-depleted Cells—To further identify the route of entry of MCA_b-Strep-Cy5 and analyze the impact of GAG depletion on this process, several inhibitors were tested by FACS on the

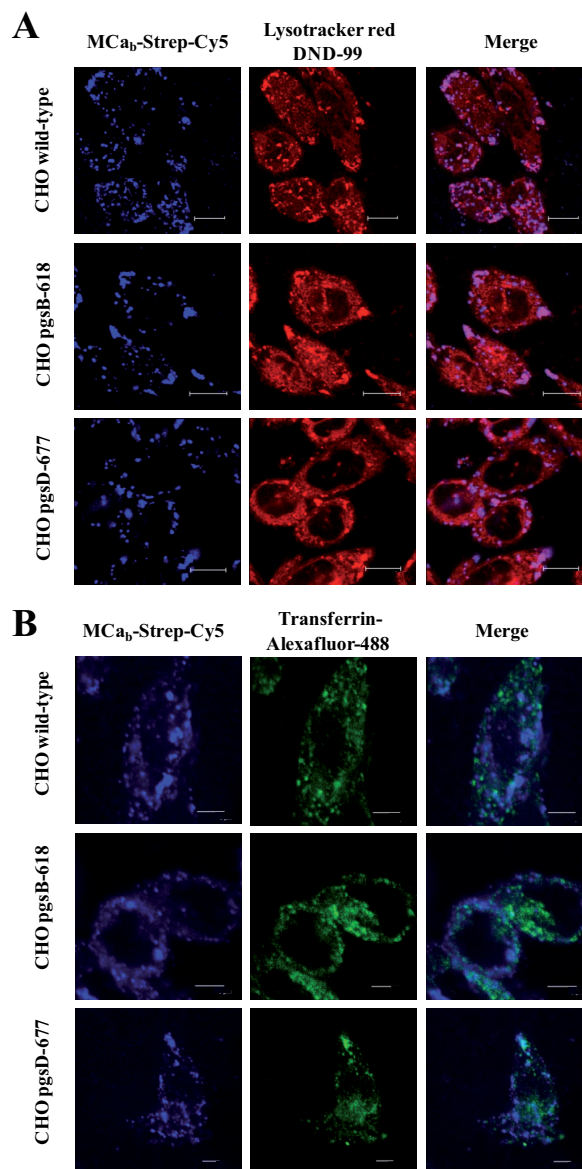


FIGURE 6. MCA_b-Strep-Cy5 entry and endocytosis. *A*, endocytic route of entry of MCA_b-Strep-Cy5. Various CHO cell lines (upper panels, wild type; middle panels, pgsB-618; lower panels, pgsD-677) were incubated 2 h with 1  m of MCA_b-Strep-Cy5, washed, and incubated with 50 nM LysoTracker red DND-99 for 20 min right before confocal acquisition. Scale bars, 10  m (upper panels) and 11  m (middle and lower panels). *B*, different endocytic entry pathways for transferrin-Alexa Fluor 488 and MCA_b-Strep-Cy5. Confocal immunofluorescence images of living wild-type or mutant CHO cells to compare the cell distribution of transferrin-Alexa Fluor 488 and MCA_b-Strep-Cy5. Cells were incubated 2 h with 1  m MCA_b-Strep-Cy5 (blue) along with 25  g/ml transferrin-Alexa Fluor 488 (green), washed, and immediately analyzed by confocal microscopy. Scale bars, 5  m.

entry of MCA_b-Strep-Cy5 in wild-type (Fig. 8A) and pgsB-618 CHO cells (Fig. 8B). These inhibitors were also tested on the entry of transferrin-Alexa Fluor 488 for comparison. Amiloride was tested to block macropinocytosis, methyl- -cyclodextrin to deplete membrane cholesterol and inhibit lipid raft-depend-

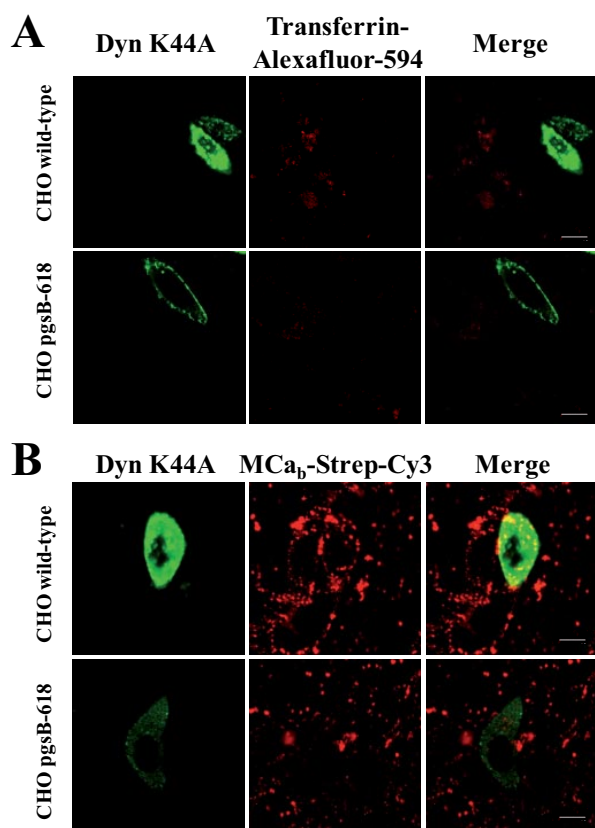


FIGURE 7. Expression of the dominant-negative dynamin 2 K44A mutant blocks clathrin-mediated endocytosis and transferring entry but spares MCA_b-Strep-Cy3 entry. *A*, transferrin entry is inhibited in dynamin 2 K44A transfected wild-type and pgsB-618 mutant CHO cells. *B*, MCA_b-Strep-Cy3 entry is preserved in dynamin 2 K44A-transfected wild-type and pgsB-618 mutant CHO cells. Scale bars, 10 μ m. Note that expression of dynamin 2 K44A mutant was always less in pgsB-618 mutant CHO cells than in wild-type CHO cells, possibly due to a role of GAGs in plasmid entry.

ent pathways, nocodazole to inhibit microtubule formation, and cytochalasin D to inhibit F-actin elongation, required for macropinocytosis and clathrin-dependent endocytosis (27). Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-mediated endocytosis, could not be tested because it produced cell dissociation from the plastic dish surface (data not shown). In wild-type CHO cells, transferrin-Alexa Fluor 488 endocytosis was not affected by amiloride, methyl- β -cyclodextrin, or nocodazole, as expected for clathrin-mediated endocytosis. Cytochalasin D was found to produce a curious 37% increase in the cell entry of transferrin, indicating an alteration in clathrin-dependent endocytosis. In contrast, with the exception of methyl- β -cyclodextrin, all drugs tested were found to inhibit partially the entry of MCA_b-Strep-Cy5 in wild-type CHO cells (Fig. 8A). The lack of effect of methyl- β -cyclodextrin indicates that caveolae-mediated endocytosis is not involved in the entry of MCA_b-Strep-Cy5. The fact that both amiloride and cytochalasin D inhibit MCA_b-Strep-Cy5 cell entry by 80 and 30%, respectively, indicates a significant contribution of macropinocytosis pathway. Cytochalasin D probably acts exclusively on macropinocytosis for the cell entry of MCA_b-Strep-Cy5 as the involvement of the

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

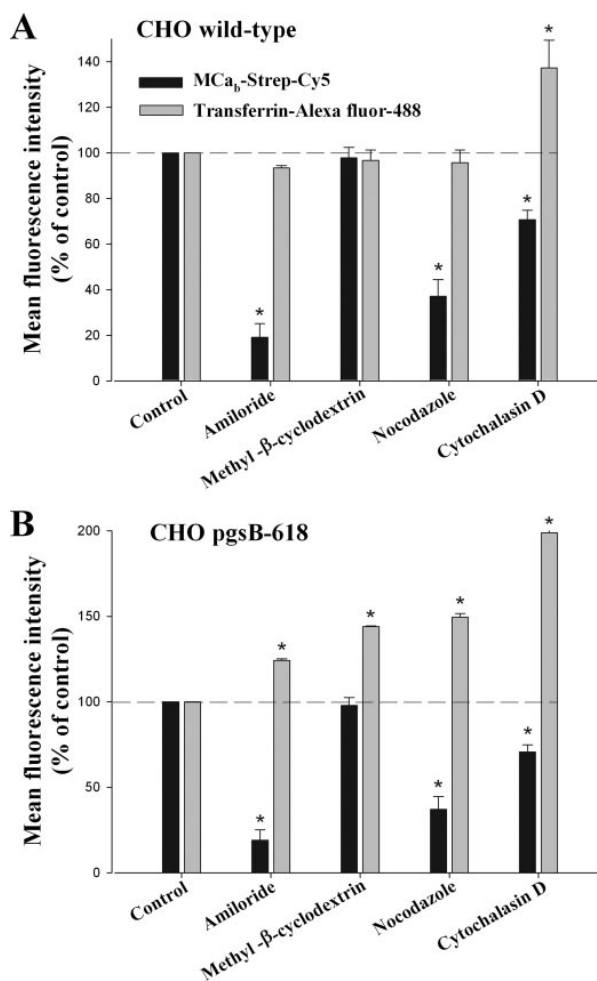


FIGURE 8. Effect of endocytic inhibitors on the entry of transferrin-Alexa Fluor 488 and MCA_b-Strep-Cy5. Data are expressed in percentage of mean control fluorescence as assessed by FACS. Average data are from three experiments. *A*, data for wild-type CHO cells. *B*, data for pgsB-618 CHO cells. Significance is provided as a deviation of three times the S.D. value from 100% (denoted as asterisks).

other major endocytic pathway affected by this drug, clathrin-mediated endocytosis, can be ruled out. Nocodazole, which has a wide range of effects on various endocytosis pathways, also had a great effect, inducing a 63% reduction of MCA_b-Strep-Cy5 cell entry. Thus, the rather segregated effects of endocytosis inhibitors on cell penetration of transferrin and MCA_b-Strep-Cy5 is coherent with their lack of colocalization inside cells (Fig. 6B). These data stress the importance of macropinocytosis as the main entry pathway of Strep-Cy5 when coupled to MCA_b. The same set of drugs was then tested for the cell entry of both transferrin and MCA_b-Strep-Cy5 in GAG-deficient pgsB-618 CHO cells (Fig. 8B). Interestingly, in the absence of GAGs, the effects of the endocytosis inhibitors on MCA_b-Strep-Cy5 entry were not altered, indicating that in the absence of cell surface GAGs, macropinocytosis is still the main route of entry of the complex. This is in perfect agreement with the data shown in Figs. 5 and 6, suggesting similar cell distribution of the complex,

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

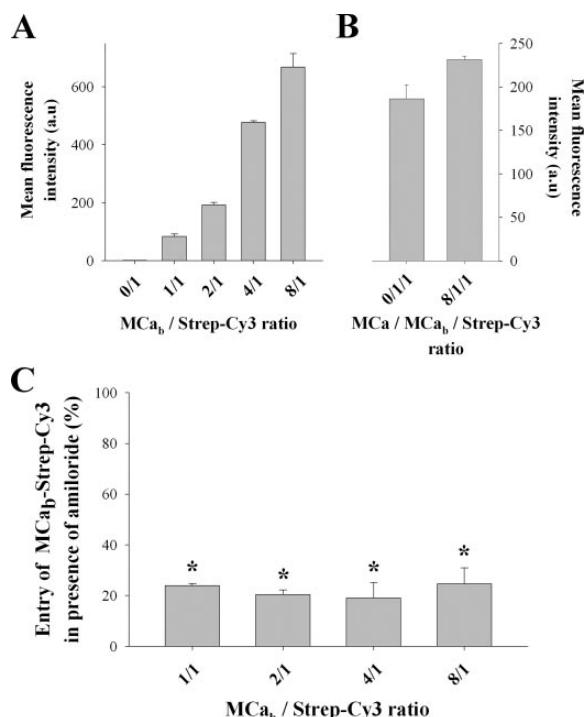


FIGURE 9. Effect of MCA_b/strep ratio on the cell penetration of strep. A, effect of MCA_b/Strep-Cy3 ratio on the total entry of Strep-Cy3 in wild-type CHO cells. B, effect of an 8-fold molar excess of non-biotinylated MCA on the penetration of MCA_b-Strep-Cy3 at a 1:1 molar ratio. C, effect of 5 mM amiloride on Strep-Cy3 entry into wild-type CHO cells as a function of MCA_b/Strep-Cy3 ratio. Significance is provided as a deviation of 3 × the S.D. value from 100% (denoted as asterisks). Strep-Cy3 concentration was kept constant at 1 μM in all experiments. a.u., arbitrary units.

colocalization with LysoTracker red, and identical effects of dynamin 2 K44A expression. Surprisingly, the absence of GAGs had an impact on the effects of the drugs on transferrin entry (Fig. 8B). Although no clear explanation can be provided for this observation, it may suggest that in the absence of GAGs inhibition of alternative endocytosis pathways favors somehow clathrin-mediated endocytosis. These effects remain, however, outside the focus of this study, namely the entry pathways of MCA, but are clear indications of the potential importance of GAGs in endocytosis.

The Molar Ratio MCA_b/Strep-Cy3 Does Not Influence the Type of Endocytosis—Streptavidin molecules are tetramers that can bind up to four MCA_b peptides. It is, therefore, possible that the number of bound peptides may somehow affect the residency time of the complex at the cell surface and thereby influence the mode of cell penetration. To test this hypothesis, various molar ratios of MCA_b and Strep-Cy3 were mixed together to prepare complexes with increased numbers of MCA_b immobilized on Strep-Cy3. The exact molar ratio between MCA_b and Strep-Cy3 can, however, not be warranted by simply mixing various molar ratios of the two molecules. Once these complexes were prepared, their cell entry along with the effect of amiloride was quantified by FACS (Fig. 9). Increasing the molar ratio of MCA_b over Strep-Cy3 from 1:1 to 8:1 dramatically

increased the amount of Strep-Cy3 that penetrates into wild-type CHO cells (Fig. 9A). These data indicate that immobilizing an increasing number of MCA_b onto streptavidin greatly favors the entry of the complex, possibly by multiplying the number of contacts with cell surface components and/or increasing the residency time at the cell surface. In contrast, using increased amounts of non-biotinylated MCA, unable to bind Strep-Cy3, in place of MCA_b did not produce any increase in Strep-Cy3 penetration, indicating that coupling of MCA to Strep-Cy3 was required (Fig. 9B). This result also shows that the association of MCA to cell surface components does not trigger a generalized increase in cell endocytosis that would indirectly favor the penetration of MCA_b-Strep-Cy3 complexes. Finally, Fig. 9C indicates that coupling several MCA_b peptides to streptavidin does not quantitatively alter the effect of 5 mM amiloride, indicating that macropinocytosis remains the predominant mode of entry of the complex regardless of the MCA_b/Strep-Cy3 molar ratio used.

DISCUSSION

HSPGs Are New Cell Surface Targets of MCA That Are Involved in Cell Penetration of This Peptide—Using a Biacore system, we have demonstrated that MCA, a member of a new family of CPPs, directly interacts with HP and HS with affinities in the low micromolar range (between 2 and 5 μM). These values are more or less well correlated to the PC₅₀ values of MCA_b-Strep-Cy5 in CHO cells (around 0.5 μM), suggesting a contribution of HSPGs to the cell penetration of this complex. This slight difference could be related to the fact that each streptavidin molecule has the ability to bind four MCA molecules, thereby increasing the local concentration of the CPP in the vicinity of the cell surface receptors. Indeed, we show here that increasing the molar ratio of MCA_b over streptavidin during complex formation produces an increase in cell penetration efficiency. Alternatively, differences may also be related to the exact nature of the cell surface HSPG involved in MCA interaction. By using HS- and GAG-deficient CHO cell lines, we conclusively demonstrate that HSPGs quantitatively contribute to more than 57% of the cell entry of Strep-Cy5 when coupled to MCA. HS represents the most important GAG since it is responsible for 75% of the GAG contribution. However, because a significant fraction of the total cell entry is conserved in GAG-deficient cells, the entry of MCA_b-Strep-Cy5 does not solely rely on GAGs but also on other cell surface components, with apparent affinities closely related to that of MCA for HSPGs since the PC₅₀ values varied only mildly in GAG-deficient CHO cells. Data presented here and in previous manuscripts (5, 6) indicate that membrane lipids are also cell surface receptors for MCA. For instance, MCA was found to interact with the ganglioside GD3 with a closely related apparent affinity of 0.49 μM. Another important conclusion that can be made from these data is that the increase or the decrease of the penetration efficiency observed with specific mutants of MCA, such as MCA K20A tested herein, results from a modification of the apparent affinity of these MCA mutants for the cell surface components with which they interact. For instance, MCA K20A was found to have reduced apparent affinity for both HS and HP (present data) but also for membrane lipids (6). There is, thus,

an interesting parallel to pursue on the structural determinants of CPP interaction with HSPGs and negatively charged lipids that may ultimately result in the design of better CPP analogues. This observation appears particularly pertinent since the cell entry process of MCA-Strep-Cy5 or MCA-Strep-Cy3 complex, *i.e.* macropinocytosis, seems independent of the type of membrane receptor involved in MCA binding (HSPGs *versus* lipids).

HP Inhibition of the Cell Penetration of MCA-Strep Complex Is Not Limited to the Interaction of This CPP to Cell Surface HSPGs—HP-induced inhibition of CPPs cell entry is generally interpreted as being due to an inhibition of CPP interaction with cell surface HSPGs (28). However, an alternative possibility is that, by neutralizing the basic face of MCA, the interaction of HP with MCA also inhibits the subsequent interaction of MCA with negatively charged lipids of the cells, another surface component for the route of entry of MCA. Three sets of evidence indicate that this interpretation is likely to be correct. First, both soluble HS and HP inhibit the cell entry of MCA_b-Strep-Cy5 to levels beyond that measured for MCA_b-Strep-Cy5 entry in HS- and GAG-deficient CHO cells. Second, soluble HS and HP still produce significant reductions of MCA_b-Strep-Cy5 entry in GAG-deficient CHO cells, clearly indicating an inhibition through an alternate mode of inhibition. Third, incubation of HS with MCA_b produces a reduction in the interaction of MCA_b with several negatively charged lipids, the most dramatic effects being observed for PtdIns(3,4,5)P₃ and phosphatidic acid. These observations indicate that interpretation of the involvement of cell surface HSPGs in the penetration of CPPs based on soluble HP inhibition should be performed carefully. They also confirm the importance of the basic face of CPPs in the mechanism of cell penetration. Finally, the presence of a residual MCA-Strep complex penetration in GAG-deficient CHO cells in the presence of HS or HP might indicate that either the interaction between HSPGs is rapidly reversible or that this interaction does not fully cover the entire molecular surface of MCA required for cell penetration. Further detailed biochemical experiments will be needed to sort out the molecular determinants of MCA involved in HP or HS interaction. Such an investigation will determine to what extent the basic surface of MCA is involved in an interaction with HSPGs.

Macropinocytosis Is the Main Endocytic Pathway Used by MCA When Coupled to Streptavidin in GAG-positive and GAG-deficient CHO Cells—In previous work, we reported that MCA-Strep complex penetration in HEK293 cells was also observed in the presence of amiloride or nystatin, suggesting that a non-endocytic pathway was involved in the penetration process (4). Here, we provide a quantitative analysis of the effects of endocytosis inhibitors on the entry of MCA_b-Strep-Cy5 in CHO cells using a FACS method and show that endocytosis represents the major route of penetration, whereas only 20% of MCA_b-Strep-Cy5 penetration is still observed in the presence of endocytosis inhibitors (amiloride). Interestingly, the amount of MCA_b-Strep-Cy5 taken up in the presence of amiloride is close to the amount of complex taken up in GAG-deficient CHO cells in the presence of HS or HP. The apparent discrepancy between the two studies is likely due to the fact that confocal analysis used in the previous work was not quantitative enough to allow

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

the calculation of the relative importance of each mechanism. Moreover, we cannot rule out the possibility that some endocytosis pathway, insensitive to amiloride or nystatin, may be present in the previously studied HEK293 cell line. This indicates that one needs to be cautious with regard to confocal images that are unfortunately not quantitative enough to rule out one or several cellular mechanisms for cell entry. Use of a marker of endosomes demonstrates that MCA_b-Strep-Cy5 is distributed within endosomes after cell entry, supporting the fact that endocytosis is a predominant route of entry of the cargo when coupled to MCA_b. The total lack of co-localization between transferrin-Alexa Fluor 488 and MCA_b-Strep-Cy5 clearly indicates that clathrin-mediated endocytosis is not at play in the entry of MCA_b-Strep-Cy5. This was further proven by (i) the lack of effect of expression of dynamin 2 K44A, a dominant negative construct that inhibits clathrin-mediated endocytosis but does not prevent MCA_b-Strep-Cy3 entry and (ii) the differential effects of various endocytosis blockers on transferrin-Alexa Fluor 488 and MCA_b-Strep-Cy5 cell entries. The effects of cytochalasin D and of amiloride indicate that macropinocytosis is predominantly involved in the cell entry of MCA_b-Strep-Cy5. This observation is consistent with many other reports that indicate a role of macropinocytosis in cell entry of other CPPs (14, 29). However, the lack of effect of methyl- β -cyclodextrin appears to indicate that endocytosis of MCA_b-Strep-Cy5 is not dependent on lipid rafts or at least on cholesterol availability. Because macropinocytosis appears to be responsible for the uptake of MCA_b-Strep-Cy5/3 in wild-type and GAG-deficient CHO cells alike, it seems that all surface components able to bind MCA, negatively charged HSPGs, and lipids are involved in macropinocytosis. Because of the nature of macropinosomes, which do not fuse with lysosomes and are leaky, it is likely that release of CPPs in the cytosol may occur very slowly. In the case of the Strep-Cy5 cargo, this leakage was, however, not observed when coupled to MCA_b.

Cargo Dependence of MCA Mode of Penetration and/or Release in the Cytosol?—The mechanism of cell penetration of CPPs remains highly debated. There are pro and con arguments in favor of membrane translocation, a process whereby the peptide would flip from the outer face of the plasma membrane to the inner face then be released free into the cytoplasm. Here we do not provide compelling evidence for a translocation mechanism for Strep-Cy5 entry when coupled to MCA_b. On the contrary, the data strongly emphasize the importance of endocytosis in the penetration of the vector/cargo complex. Nevertheless, the issue of the mode of penetration of MCA itself remains open to a large extent. First, there is compelling evidence that MCA has a near-complete pharmacological effect when applied at the extracellular face of cells. Second, the pharmacological site of MCA on the ryanodine receptor has been localized to the cytosol face of the calcium channel. Taken together, these results suggest that MCA must reach the cytosol within seconds or minutes. Two possibilities can be envisioned; (i) MCA may be released within the cytosol from leaky macropinosomes immediately after uptake, but the time scale seems inappropriate, or (ii) when “free”, *i.e.* not coupled to a cargo, MCA may indeed simply translocate through the membrane. This raises immediately the question of the contribution of the

Maurocalcine Interacts with Glycosaminoglycans

cargo to the mode of entry of MCA. Streptavidin is a cargo that can bind four different MCA_b molecules. Linking multiple vectors to a single cargo molecule could theoretically complicate the mode of entry of MCA. Intuitively, one could imagine that multiple attachment points to cell surface components might hamper the translocation of the peptide through the plasma membrane, increase the residency time at the cell surface, and thereby strongly promote macropinocytosis over direct translocation. Experimentally, this is, however, not observed. The fact that amiloride inhibits penetration of MCA_b-Strep-Cy5 complex, prepared with 1 MCA_b for 1 Strep-Cy5, as efficiently as the penetration of MCA_b-Strep-Cy5 complex, prepared with 8 MCA_b for 1 Strep-Cy5, indicates that macropinocytosis is not influenced by the presence of multiple MCA_b molecules. Therefore, the putative difference between free MCA_b and MCA_b-cargo complex might be due to the nature of the cargo rather than its specific properties of MCA_b binding. In addition, the size of the cargo may itself represent a problem for simple diffusion of the complex from "leaky" macropinosomes to the cytosol. Further studies will be required to investigate the contribution of cargo size and nature in the mode of entry and cell distribution (cytosol *versus* endosomes) of the vector. Nevertheless, these data are coherent with many other studies on CPPs, and macropinocytosis is likely to be the main entry route of many other cargoes that will be attached to maurocalcine. Although streptavidin is used as a reporter cargo here (fluorescence property), it is worth mentioning that its ability to bind to several different biotinylated molecules at a time should be considered as a significant advantage for the cell delivery of multiple cargoes with a single MCA vector.

Acknowledgments—We thank Rabia Sadir for the kind preparation of oligosaccharides. We also thank Dr. McNiven MA for providing the cDNA encoding dynamin 2 K44A mutant.

REFERENCES

- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J. G., Blanc, E., Sabatier, J. M., El Ayeb, M., and Darbon, H. (2000) *Proteins* **40**, 436–442
- Esteve, E., Smida-Rezgui, S., Sarkozi, S., Szegedi, C., Regaya, I., Chen, L., Altafaj, X., Rochat, H., Allen, P., Pessah, I. N., Marty, I., Sabatier, J. M., Jona, I., De Waard, M., and Ronjat, M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 37822–37831
- Chen, L., Esteve, E., Sabatier, J. M., Ronjat, M., De Waard, M., Allen, P. D., and Pessah, I. N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 16095–16106
- Esteve, E., Mabrouk, K., Dupuis, A., Smida-Rezgui, S., Altafaj, X., Grunwald, D., Platel, J. C., Andreotti, N., Marty, I., Sabatier, J. M., Ronjat, M., and De Waard, M. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 12833–12839
- Boisseau, S., Mabrouk, K., Ram, N., Garmy, N., Collin, V., Tadmouri, A., Mikati, M., Sabatier, J. M., Ronjat, M., Fantini, J., and De Waard, M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 308–319
- Mabrouk, K., Ram, N., Boisseau, S., Strappazzon, F., Reham, A., Sadoul, R., Darbon, H., Ronjat, M., and De Waard, M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1768**, 2528–2540
- Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 18188–18193
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 2437–2443
- Vives, E., Richard, J. P., Rispal, C., and Lebleu, B. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**, 125–132
- Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017
- Terrone, D., Sang, S. L., Roudaia, L., and Silvius, J. R. (2003) *Biochemistry* **42**, 13787–13799
- Berlose, J. P., Convert, O., Derossi, D., Brunissen, A., and Chassaing, G. (1996) *Eur. J. Biochem.* **242**, 372–386
- Magzoub, M., and Graslund, A. (2004) *Q. Rev. Biophys.* **37**, 147–195
- Wadia, J. S., Stan, R. V., and Dowdy, S. F. (2004) *Nat. Med.* **10**, 310–315
- Foerg, C., Ziegler, U., Fernandez-Carreado, J., Giralt, E., Rennert, R., Beck-Sicking, A. G., and Merkle, H. P. (2005) *Biochemistry* **44**, 72–81
- Sandgren, S., Cheng, F., and Belting, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38877–38883
- Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., and Futaki, S. (2007) *Biochemistry* **46**, 492–501
- Laguri, C., Sadir, R., Rueda, P., Baleux, F., Gans, P., Arenzana-Seisdedos, F., and Lortat-Jacob, H. (2007) *PLoS ONE* **2**, e1110
- Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imbert, A., and Lortat-Jacob, H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 8288–8296
- Vives, R. R., Imbert, A., Sattentau, Q. J., and Lortat-Jacob, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 21353–21357
- Vives, R. R., Sadir, R., Imbert, A., Rencurosi, A., and Lortat-Jacob, H. (2002) *Biochemistry* **41**, 14779–14789
- Sarrazin, S., Bonnaffe, D., Lubineau, A., and Lortat-Jacob, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 37558–37564
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 585–590
- Kurten, R. C. (2003) *Adv. Drug Delivery Rev.* **55**, 1405–1419
- Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003) *Nature* **422**, 37–44
- Sun, T. X., Van Hoek, A., Huang, Y., Bouley, R., McLaughlin, M., and Brown, D. (2002) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **282**, 998–1011
- Mano, M., Teodosio, C., Paiva, A., Simoes, S., and Pedrosa de Lima, M. C. (2005) *Biochem. J.* **390**, 603–612
- Nascimento, F. D., Hayashi, M. A., Kerkis, A., Oliveira, V., Oliveira, E. B., Radis-Baptista, G., Nader, H. B., Yamane, T., Tersariol, I. L., and Kerkis, I. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 21349–21360
- Rinne, J., Albarran, B., Jylhava, J., Ihalaenen, T. O., Kankaanpaa, P., Hytonen, V. P., Stayton, P. S., Kulomaa, M. S., and Vihinen-Ranta, M. (2007) *BMC Biotechnol.* **7**, 1

Dans ce travail, nous apportons de nouvelles données sur le mécanisme d'entrée de la MCa. En effet, ce peptide interagit avec les glycosaminoglycanes (GAGs) tels que l'Héparine Sulfate (HS) et l'Héparine (HP) de manière dose-dépendante. L'utilisation d'un analogue caractérisé par une faible activité de translocation (MCa K20A) montre une faible affinité apparente pour ces GAGs, ce qui suggère un lien direct entre l'interaction aux GAGs et l'internalisation cellulaire de la MCa.

En plus, nos résultats nous ont incités à déterminer le mécanisme d'internalisation du peptide dans les cellules CHO. Ainsi l'utilisation des inhibiteurs de l'endocytose (nocodazole, cytochalasin) montre bien, par quantification en cytométrie en flux, que l'entrée du complexe MCa-streptavidine dans les cellules CHO diminue clairement. Ces résultats suggèrent que l'endocytose est le mécanisme majeur de la pénétration de la MCa. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de la macropinocytose (amiloride) inhibe considérablement (63%) l'entrée du complexe dans les cellules ce qui montre bien que l'internalisation de la MCa est médié par ce type d'endocytose. Cependant, l'utilisation de lignées cellulaires CHO déficientes en GAGs montre que la moitié de la pénétration cellulaire est conservée mais qu'elle dépend toujours de la macropinocytose. Nous concluons donc que, malgré l'importance des GAGs de la surface cellulaire pour la délivrance cellulaire, leur absence n'inhibe pas la pénétration du peptide parce qu'il semblerait que la liaison aux lipides membranaires pourrait également activer la macropinocytose.

Par ailleurs, nos résultats mettent en lumière l'influence de la nature et de la taille du cargo ainsi que du type cellulaire dans le mode d'entrée du peptide. Il serait donc plausible que le couplage de la MCa à un autre cargo puisse emprunter un autre mécanisme d'entrée.

CHAPITRE II

Conception d'un analogue de la maurocalcine pour la délivrance de différents cargos à l'intérieur des cellules

Introduction

Plusieurs études se sont intéressées récemment, à de nouvelles approches qui permettraient l'entrée directe de protéines ou de peptides d'intérêts thérapeutiques dans un grand nombre de cellules (Ford *et al.*, 2001; Wadia et Dowdy, 2002, Langel 2002). Toutefois, le développement de peptides ou de protéines à vocation thérapeutique reste encore restreint du fait de plusieurs limitations; à savoir (a) la faible perméabilité et la sélectivité de la membrane cellulaire aux peptides et protéines, (b) la présence de peptides en concentrations

suffisantes pour un effet biologique, (c) le maintien de l'intégrité du peptide dans les cellules et (d) la sélectivité vis-à-vis de la cible ou des compartiments cellulaires. Par ailleurs, ces restrictions ont été partiellement levées par la découverte des CPPs qui sont utilisés pour faciliter le transport des macromolécules imperméantes comme les protéines, les acides nucléiques et les drogues (Lindgren *et al.*, 2000 ; Morris *et al.*, 2000; Gariepy *et al.*, 2001). En plus, ces molécules réagissent, à faible concentration, sans énergie, de manière efficace (transduction de 100 % des cellules), rapide (de l'ordre de 5 à 15 min), et ce dans tous les types cellulaires, *in vivo* et *in vitro*.

Les deux vecteurs peptidiques les plus utilisés à ce jour sont dérivés de protéines et sont doués d'une propriété de transfert intercellulaire, il s'agit des peptides Tat et pénétratine. Ces peptides ont été utilisés dans la vectorisation d'une large variété de composés, entre autre les drogues (Temsamani et Vidal, 2004).

Dans ce cadre et dans le but de mieux caractériser les propriétés vecteurs de la MCa, pour l'internalisation et l'adressage de substances d'intérêt, nous nous sommes intéressés à coupler une variété de molécules imperméables et perméables au peptide. Etant donnée que la structure chimique de la MCa contient des ponts disulfures qui peuvent compliquer le couplage à ces molécules cargos, surtout dans le cas d'un couplage covalent, nous avons opté pour l'utilisation d'un mutant dépourvu d'une activité cytotoxique mais ayant un grand potentiel de pénétration cellulaire (Mabrouk *et al.*, 2007).

Au cours de ce travail, un mutant de la MCa (analogue) a été synthétisé en remplaçant chacune des six cystéines du peptide par l'acide L- α -aminobutyrique (analogue isostérique de la cystéine). La cytotoxicité, le potentiel de pénétration de cet analogue ainsi que sa capacité à faire délivrer plusieurs cargos (streptavidine, peptide, Quantum Dot (QD), doxorubicine (Dox) ont été étudiés.

La première partie de ce travail a fait l'objet de la publication suivante (Article II) :

ARTICLE II

Design of a disulfide-less, pharmacologically inert, and chemically competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells

Narendra Ram¹, Norbert Weiss², Isabelle Texier-Nogues³, **Sonia Aroui**¹, Nicolas Andreotti⁴, Fabienne Pirollet¹, Michel Ronjat¹, Jean-Marc Sabatier⁴, Hervé Darbon⁵, Vincent Jacquemond², and Michel De Waard¹

1 Institut des neurosciences de Grenoble INSERM : U836, CHU Grenoble, CEA : DSV/IRTSV, Université Joseph Fourier - Grenoble I, Bat. Edmond J.Safran, chemin Fortuné Ferrini, BP170 La Tronche, 38042 Grenoble Cedex 9,FR.

2 PICM, Physiologie intégrative, cellulaire et moléculaire CNRS : UMR5123, Université Claude Bernard -Lyon I, Bât. R. Dubois 43, Bvd du 11 Novembre 1918 69622 VILLEURBANNE CEDEX,FR.

3 LETI, Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information CEA : DRT/LETI, MINATEC 17, rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9,FR.

4 ERT 62 Ambrilia Biopharma S.A. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, Faculté de Médecine Nord, 13916 Marseille,FR.

5 AFMB, Architecture et fonction des macromolécules biologiques CNRS : UMR6098, Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, Université de Provence - Aix-Marseille I, 31 Chemin Joseph Aiguier 13402 MARSEILLE CEDEX 20,FR.

The Journal of Biological Chemistry (2008)



Published in final edited form as:

J Biol Chem. 2008 October ; 283(40): 27048–27056. doi:10.1074/jbc.M804727200.

Design of a disulfide-less, pharmacologically inert, and chemically competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells

Narendra Ram¹, Norbert Weiss², Isabelle Texier-Nogues³, Sonia Aroui¹, Nicolas Andreotti⁴, Fabienne Pirollet¹, Michel Ronjat¹, Jean-Marc Sabatier⁴, Hervé Darbon⁵, Vincent Jacquemond², and Michel De Waard^{1,*}

¹ Institut des neurosciences de Grenoble INSERM : U836, CHU Grenoble, CEA : DSV/IRTSV, Université Joseph Fourier - Grenoble I, Bat. Edmond J. Safran, chemin Fortuné Ferrini, BP170 La Tronche, 38042 Grenoble Cedex 9, FR.

² PICM, Physiologie intégrative, cellulaire et moléculaire CNRS : UMR5123, Université Claude Bernard - Lyon I, Bât. R. Dubois 43, Bvd du 11 Novembre 1918 69622 VILLEURBANNE CEDEX, FR.

³ LETI, Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information CEA : DRT/LETI, MINATEC 17, rue des Martyrs, 38054, Grenoble Cedex 9, FR.

⁴ ERT 62 Ambrilia Biopharma S.A. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, Faculté de Médecine Nord, 13916 Marseille, FR.

⁵ AFMB, Architecture et fonction des macromolécules biologiques CNRS : UMR6098, Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, Université de Provence - Aix-Marseille I, 31 Chemin Joseph Aiguier 13402 MARSEILLE CEDEX 20, FR.

Abstract

Maurocalcine is a 33-mer peptide initially isolated from the venom of a Tunisian scorpion. It has proved itself valuable as a pharmacological activator of the ryanodine receptor, and has helped the understanding the molecular basis underlying excitation-contraction coupling in skeletal muscles. Because of its positively charged nature, it is also an innovative vector for the cell penetration of various compounds. We report a novel maurocalcine analog with improved properties: (i) the complete loss of pharmacological activity, (ii) preservation of the potent ability to carry cargo molecules into cells, and (iii) with coupling chemistries not affected by the presence of internal cysteine residues of maurocalcine. We did this by replacing the six internal cysteine residues of maurocalcine by isosteric 2-aminobutyric acid residues and by adding an additional N-terminal biotinylated lysine (for a proof of concept analog) or an N-terminal cysteine residue (for a chemically-competent coupling analogue). Additional replacement of a glutamate residue by alanyl at position 12 further improves the potency of these analogues. Coupling to several cargo molecules or nanoparticles are presented to illustrate the cell penetration potency and usefulness of these pharmacologically inactive analogs.

* Correspondence should be addressed to: Michel De Waard michel.dewaard@ujf-grenoble.fr.

*The abbreviations used are: CD, Circular Dichroism; CHO, Chinese Hamster Ovary cells; CPP, Cell Penetrating Peptide; DHE, dihydroethidium; DHP, Dihydropyridine; DMSP, Dimethylsulfoxide; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter; FDB, Flexor Digitorum Brevis; MCa, maurocalcine; PBS, Phosphate Buffer Saline; PEG, Polyethylene glycol; QD, Quantum Dot; RyR1, Ryanodine Receptor type I; SD, Standard Deviation; SR, Sarcoplasmic Reticulum; Strep-Cy5, Streptavidin-cyanine5.

Keywords

Animals; CHO Cells; Cricetinae; Cricetulus; Disulfides; chemistry; Drug Carriers; chemical synthesis; chemistry; pharmacology; Humans; Mice; Muscle; Skeletal; cytology; metabolism; Scorpion Venoms; chemical synthesis; genetics; pharmacology; Scorpions; genetics; metabolism

Maurocalcine (MCA) is a highly basic 33-mer peptide isolated from the venom of the scorpion *Scorpio maurus palmatus*. It efficiently binds to the ryanodine receptor in skeletal muscles (RyR1 isoform) (1) and promotes channel opening to promote calcium release from the sarcoplasmic reticulum (SR). This pharmacological effect of MCA can be indirectly monitored through the stimulation it exerts on [³H]-ryanodine binding (2). In muscle fibers, MCA produces a transient loss of voltage control of Ca²⁺ release from RyR1 channels. This effect is due to an alteration of repolarization-induced closure of RyR1 channels, a process normally under the control of voltage-dependent dihydropyridine (DHP)-sensitive calcium channels (3). This function of MCA is due to a partial sequence homology between MCA and a cytoplasmic loop of the DHP-sensitive channel (2). These observations explain why MCA, along with other members of the same family of toxins such as imperatoxin 1A (4), hemicalcin (5), and opicalcin 1 and 2 (6), are useful both for their pharmacological properties and for deciphering fine molecular details of the excitation-contraction coupling process.

Recently, MCA has also proven of interest for its property of efficiently crossing the plasma membrane, either alone or when coupled to a membrane-impermeant cargo protein (2,7). MCA is a highly charged peptide with 12 basic residues out of 33, and a net global positive charge of +8. Most of these residues are on one face of the molecule, the opposite face being mostly hydrophobic in nature. The rich content in basic amino acid residues of MCA is reminiscent of that of all cell penetrating peptides (CPPs) characterized so far (Tat, penetratin and poly-R). Hence, MCA can be classified within an emerging family of toxin CPPs that have no structural homologies apart from their content in basic residues. Recently, a new toxin, crotamin, has been purified from the venom of a South American snake. It also behaves as a CPP but apparently with a preference for dividing cells (8). The great diversity in CPP sequences observed so far suggests that designing new MCA CPP analogues should be easy. This tolerance in sequence variation is possibly due to the diverse nature of membrane receptors implicated in CPP cell translocation. These receptors nevertheless possess a single point in common: they all appear to interact with CPPs on the basis of electrostatic interactions. On the contrary, the structural characteristics of the interaction between MCA and RyR1 appear far more constrained. A single mutation within MCA, the replacement of an Arg residue by an alanyl, abolishes the pharmacological effect of MCA but has only mild effects on its cell penetration efficacy (9). Nevertheless, segregating the pharmacological properties from the cell penetrating properties proved more complex than expected on the sole basis of amino acid substitutions of MCA (9). This appears to be due to structural imperatives of the molecule since it has four functions to fulfill: first, possess the attributes of a CPP, second, conserve sequence homology with the DHP-sensitive calcium channel, third, bind to RyR1 and fourth, activate this latter channel. Many residues contribute both to the pharmacological effects and the cell penetration properties, namely some basic residues that make the functional segregation difficult with simple amino acid substitutions.

To both circumvent these difficulties and take advantage of the flexibility in structural constraints required for MCA cell penetration, we sought a novel strategy for the design of an MCA analogue that would lose its pharmacological activity while retaining most of its cell penetration efficacy. As determined by ¹H-NMR, MCA folds along an inhibitor cystine knot motif with a disulfide bridge pattern of Cys³–Cys¹⁷, Cys¹⁰–Cys²¹, and Cys¹⁶–Cys³². It contains three β -strands that run from amino acid residues 9–11 (strand 1), 20–23 (strand 2),

and 30–33 (strand 3), with β -strands 2 and 3 forming an antiparallel β -sheet (10). In earlier studies on another toxin, maurotoxin (MTX), active on voltage-gated potassium channels, it was found that the disulfide bridges of the peptide play an essential role in the three-dimensional structure of the toxin and thus on its activity (11). We therefore adopted a similar strategy for the design of a novel analogue of MCA in which we replaced all native cysteine residues, engaged in the three disulfide bridges, by isosteric 2-aminobutyric acid residues. The goal was to obtain a structurally-altered analogue displaying a complete loss of pharmacological activity but preserving the positively charged nature of the peptide, a property required for the efficient cell penetration of a CPP. To further validate this analogue, three derivatives were produced that comprise either an N-terminal biotinylated lysine residue with or without an alanyl substitution of Glu¹², previously shown to favor cell penetration (9), or an N-terminal cysteine residue for coupling chemistries to various cargoes. This chemical synthesis was accompanied by pharmacological assays, toxicity experiments, and proof of concept that cargo penetration is fully conserved. The data indicate that cysteine replacement within MCA can produce potent cell-penetrating analogues of MCA devoid of pharmacological activity.

Experimental Procedures

Reagents

Streptavidin-Cy5 (Strep-Cy5) was from Amersham Biosciences (USA), dihydroethidium (DHE) from Molecular Probes (USA), and rhodamine- and FITC-conjugated concanavalin A were from AbCys and Sigma, respectively. Doxorubicin was from Alexis Biochemicals (USA). The TK705-amino-(polyethyleneglycol) quantum dots (QD) with surface activated amine groups were purchased from InVitrogen. [³H]-ryanodine was from Perkin-Elmer (USA).

Peptide synthesis

MCA_b was synthesized as previously described (7). MCA_b-Abu, MCA_b-Abu E12A and FITC-Gpép-Cys were purchased from the Department of Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara (Italy). Cys-MCA-Abu was synthesized by NeoMPS (France). MTX_b-Abu was assembled by the group of Dr. JM Sabatier (France).

Formation of MCA_b/, MCA_b-Abu/, MCA_b-Abu E12A/, or MTX_b-Abu/Strep-Cy5 complexes

Soluble Strep-Cy5 was mixed with four molar equivalents of MCA_b, MCA_b-Abu, MCA_b-Abu E12A or MTX_b-Abu for 2 hrs at 37°C in the dark in phosphate-buffered saline (PBS, in mM: NaCl 136, Na₂HPO₄ 4.3, KH₂PO₄ 1.47, KCl 2.6, CaCl₂ 1, MgCl₂ 0.5, pH 7.2).

Conjugation of Cys-MCA-Abu to various cargoes

Cys-MCA-Abu was conjugated to a FITC-Gpép-Cys molecule (sequence derived from G β ₁: FITC-beta-AGITSVAFSRSGRLLLAGYDDFN-Abu-NIWDAMKGDRA-C-OH) according to the method used by Davidson *et al.* (12). Briefly, an equimolar mixture of Cys-MCA-Abu and FITC-Gpép-Cys was heated to 65°C for 15 min and then incubated at 37°C for 1 hr. The complex was purified by fast protein liquid chromatography.

Cys-MCA-Abu was also conjugated to doxorubicin. Briefly, doxorubicin. HCl (1 mg/ml) was suspended in PBS pH 8.0 and conjugated to Cys-MCA-Abu using succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (Pierce) according to the protocol of Liang *et al.* (13). Successful coupling was followed by a 16.5% SDS-PAGE and UV detection of the resulting conjugated doxorubicin-linker-Cys-MCA-Abu peptide.

QD were also conjugated to Cys-MCA-Abu. The amino groups of the QD ($\approx$ 100 to 120 functions per particle) were first converted into a maleimide coating as described (14), thereby yielding QD_M. Briefly, QD (1 nmol) were incubated for 4 hrs in the dark at room temperature

in PBS in the presence of 4-maleimidobutyric acid *N*-hydrosuccinimide ester (1.8 μmol , in anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO)), then purified using NAP-5 columns (Amersham Biosciences). 20 μL of tris-(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride solution 0.5 M was added to 100 nmol of the Cys- MCA-Abu in 80 μL of water for 30 min, and then incubated overnight at room temperature with QD_M in the presence of 1 mM EDTA pH 7.4. Non-reacted maleimide groups were quenched for 20 min by adding 2-mercaptoethanol in excess (500 nmol). The QD_M-Cys-MCA-Abu conjugates were purified using NAP-5 columns (Amersham Biosciences). Surface modifications of QD were detected by 1% agarose gel electrophoresis in a TAE buffer pH 8, and imaged by fluorescence using a 633 nm excitation wavelength and collecting emitted light above 700 nm. The hydrodynamic diameter of the QD_M-Cys-MCA-Abu nanoparticles measured using a Zetasizer Nano (Malvern Instruments) were 25 nm in PBS (20.5 nm for non-modified QD). The QD_M-Cys- MCA-Abu concentration was calculated using 532 nm absorbance measurements (QD molar extinction coefficient $\epsilon = 2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 532 nm).

Cell culture

Wild-type Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells (from ATCC) were maintained at 37°C in 5% CO₂ in F-12K nutrient medium (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen) and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin (Invitrogen). MDA-MB-231 cells from ATCC were grown in Leibovitz L15 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin. Media used for the culture of cerebellar granule neurons was based on Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) containing 10 unit/ml penicillin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 2 mM L-glutamine, and 10 mM HEPES, 25 mM KCl and 10% fetal bovine serum. Primary cultures were prepared from 6-day-old S/IOPS NMRI mice (Charles River Laboratories), as described previously (15).

Preparation of heavy SR vesicles

Heavy SR vesicles were prepared following the method of Kim *et al.* (16). Protein concentration was measured by the Biuret method.

Isolation and preparation of flexor digitorum brevis muscle fibers

Experiments were performed on single skeletal fibers isolated from the *flexor digitorum brevis* (FDB) muscles from 4-to 8-week old OF1 mice (Charles River Laboratories, France) in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (87/848) and of the European Community (86/609/EEC). Procedures for enzymatic isolation of single fibers and partial insulation of the fibers with silicone grease were as previously described (17,18). In brief, mice were killed by cervical dislocation after halothane (Sigma-Aldrich, France) inhalation before removal of the muscles. Muscles were treated with 2 mg/ml collagenase type I (Sigma-Aldrich) in Tyrode solution for 60 min at 37°C. Single fibers were then isolated by triturating the muscles in the experimental chamber. The major part of a single fiber was electrically insulated with silicone grease (Rhodia Siliconi Italia, Treviolo, Italia) so that whole-cell voltage-clamp could be achieved on a short portion of the fiber extremity. All experiments were performed at room temperature (20–22°C).

Structural analyses of MCA_b, MCA_b-Abu, MCA_b-Abu E12A by circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra were recorded on a Jasco 810 dichrograph using 1 mm-thick quartz cells. Spectra were recorded between 180 and 260 nm at 0.2 nm/min and were averaged from three independent acquisitions. The spectra were corrected for water signal and smoothed by using a third-order least squares polynomial fit.

[³H]-ryanodine binding assay

Heavy SR vesicles (1 mg/ml) were incubated at 37°C for 3 hrs in an assay buffer composed of 5 nM [³H]-ryanodine, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM CaCl₂ (pCa=5), and 20 mM HEPES, pH 7.4. 1 μM MCa_b, MCa_b-Abu or MCa_b-Abu E12A was added to the assay buffer just prior to the addition of heavy SR vesicles. [³H]-ryanodine bound to heavy SR vesicles was measured by filtration through Whatmann GF/B glass filters followed by three washes with 5 ml of ice-cold washing buffer composed of 150 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7.4. Filters were then soaked overnight in 10 ml scintillation cocktail (Cybscint, ICN) and bound radioactivity determined by scintillation spectrometry. Non-specific binding was measured in the presence of 20 μM cold ryanodine. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times. All data are presented as mean ± S.D.

Fluorescent measurements under voltage-clamp conditions

An RK400 patch-clamp amplifier (BioLogic, France) was used in whole-cell configuration as previously described (18). Voltage-clamp was performed with a microelectrode filled with the intracellular-like solution (in mM: 120 K glutamate, 5 Na₂-ATP, 5 Na₂-phosphocreatine, 5.5 MgCl₂, 5 D-glucose, 5 HEPES adjusted to pH 7.2 with KOH). Indo-1 (Molecular Probes, USA) was present in this solution at 0.2 mM for fluorescence measurements under voltage-clamp conditions. The extracellular solution contained (in mM): 140 TEA-methanesulphonate, 2.5 CaCl₂, 2 MgCl₂, 0.002 tetrodotoxin, 10 HEPES, pH 7.2. The tip of the microelectrode was inserted through the silicon, within the insulated part of the fiber. Membrane depolarizations were applied every 30 s from a holding command potential of -80 mV. For the present set of measurements, the cytoplasm was dialyzed with the microelectrode solution which contained the calcium dye Indo-1 and a given peptide to be tested (200 μM for MCa_b-Abu and MCa_b-Abu E12A, and 100 μM for MCa_b). In order to facilitate intracellular dialysis, the electrode tip was broken within the silicon-insulated portion of the fiber by pushing it back and forth a few times towards the bottom of the chamber. Under these conditions, intracellular equilibration of the solution was awaited for 30 min. Equilibration was followed from the time course of increase of indo-1 fluorescence in the tested portion of the fiber. Indo-1 fluorescence was measured on an inverted Nikon Diaphot epifluorescence microscope equipped with a commercial optical system allowing the simultaneous detection of fluorescence at 405 nm (*F*₄₀₅) and 485 nm (*F*₄₈₅) by two photomultipliers (IonOptix, Milton, MA) upon 360 nm excitation. Background fluorescence at both emission wavelengths was measured next to each fiber tested and was then subtracted from all measurements. In an earlier study, we showed that 10–100 μM levels of MCa were necessary to affect voltage-activated Ca²⁺ release in intact mammalian skeletal muscle fibers (3). For this reason, and despite the cell penetration properties of MCa and of its derivatives, it is easier and less costly to apply these compounds intracellularly through the voltage-clamp electrode rather than in the extracellular medium.

Calibration of the Indo-1 response and [Ca²⁺]_{intra} calculation

The standard ratio method was used with the parameters: $R = F_{405}/F_{485}$, with R_{min} , R_{max} , K_D and β having their usual definitions. Results were either expressed in terms of Indo-1 percent saturation or in actual free calcium concentration (18,19). *In vivo* values for R_{min} , R_{max} and β were measured using procedures previously described (17). No correction was made for Indo-1 Ca²⁺ binding and dissociation kinetics.

MTT assay

Primary cultures of cerebellar granule neurons were seeded into 96 well micro plates at a density of approximately 8×10^4 cells/well. After 4 days of culture, the cells were incubated for 24 hrs at 37°C with 10 μM MCa_b, MCa_b-Abu, Cys-MCa-Abu or MCa_b E12A-Abu. Control wells containing cell culture medium alone or with cells, both without peptide addition, were

included in each experiment. The cells were then incubated with 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) for 30 min. Conversion of MTT into purple colored MTT formazan by the living cells indicates the degree of cell viability. The crystals were dissolved in DMSO and the optical density was measured at 540 nm using a microplate reader (Biotek ELx- 800, Mandel Scientific Inc.) for quantification of cell viability. All assays were run in triplicate.

Flow cytometry

MCA_b/, MCA_b-Abu/, MCA_b-Abu E12A or MTX_b-Abu/Strep-Cy5 complexes were incubated for 2 hrs with CHO cells to allow cell penetration. Control condition was represented by an incubation of cells with Strep-Cy5 alone. The cells were then washed twice with PBS to remove the excess extracellular complexes. Next, the cells were treated with 1 mg/ml trypsin (Invitrogen) for 10 min at 37  C to remove remaining membrane-associated extracellular cell surface-bound complexes. Cell suspension was centrifuged at 500 g and resuspended in PBS. Flow cytometry analyses were performed with live cells using a Becton Dickinson FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Data were obtained and analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Live cells were gated by forward/side scattering from a total of 10,000 events. Mean fluorescence values were determined from Gaussian fits of the resulting histograms and plotted as a function of complex concentration. Mean values of intracellular fluorescence for Strep-Cy5 alone incubation (less than 1% of the fluorescence observed for the lowest concentration of any of the various MCA/Strep-Cy5 complexes) were also subtracted.

Analysis of the subcellular localization of various MCA/or MTX/cargo complexes by confocal microscopy

For Strep-Cy5 complexes, 4   M of MCA_b, MCA_b-Abu, MCA_b-Abu E12A or MTX_b-Abu were coupled to 1   M Strep-Cy5 as described above. CHO cells were incubated with the resulting complexes for 2 hrs, and then washed with DMEM alone. Immediately after washing, the nucleus was stained with 1   g/ml DHE for 20 min, and then washed again with DMEM. After this step, the plasma membrane was stained with 5   g/ml of FITC-conjugated concanavalin A for 3 min. Cells were washed once more, but with PBS. For the FITC-Gpep-Cys-Cys-MCA-Abu complex, 1   M of the conjugate was incubated with CHO cells for 2 hrs, the plasma membrane stained with 5   g/ml of rhodamine-conjugated concanavalin A. For the QD_M-Cys-MCA-Abu complex, 50 nM of the complex was incubated with CHO cells for 2 hrs, and the nuclei stained with 1   g/ml DHE for 20 min. For the doxorubicin-linker-Cys-MCA-Abu complex, 3   M of the conjugate was incubated with MDA-MB-231 for 2 hrs, followed by staining of the plasma membrane with 5   g/ml of FITC-conjugated concanavalin A for 3 min. In all experiments, live cells were immediately analyzed by confocal laser scanning microscopy using a Leica TCS-SP2. Alexafluor-488 (excitation at 488 nm), rhodamine and doxorubicin (excitation at 543 nm), or Cy5 and QD_M (excitation at 642 nm) were sequentially excited and emission fluorescence collected in z-confocal planes of 10–15 nm steps. Images were merged in Adobe Photoshop 7.0.

RESULTS

Synthesis of disulphide-less analogs of MCA

Fig. 1A illustrates the three-dimensional solution structure of MCA with three disulphide bridges. The aim of this study was to design a MCA analog for which convenient chemical coupling could be performed by using an N-terminal additional cysteine residue. As shown, MCA already contains six cysteine residues that contribute to the folding of the peptide to form an inhibitor cysteine knot motif. Adding an additional cysteine residue at the N-terminus may significantly change the normal folding of the peptide and the classical disulfide bridge

arrangement (C₁-C₄, C₂-C₅, and C₃-C₆) in an unpredicted manner. In turn, this could significantly affect the pharmacological activity and cell-penetration properties of the resulting molecule(s). To facilitate chemical coupling strategies of MCa to cargo molecules, we investigated the requirement of disulfide bridges on MCa's pharmacology and cell penetration properties. Several analogs were synthesized, each with an N-terminal biotinylated lysine for easy coupling to fluorescent streptavidin molecules (our reporter cargo for this study): MCa_b, intact with the native disulfide bridges, MCa_b-Abu in which we replaced all internal cysteine residues by isosteric 2-aminobutyric acid (Abu, Fig. 1B), and MCa_b-Abu E12A, an analog of MCa_b-Abu in which Glu¹² was replaced by alanyl, a substitution known to improve cell penetration efficacy of MCa_b (9) (Fig. 1C). We would expect that removing the disulfide bridges of MCa might affect its pharmacology more than its cell penetration properties for two reasons. First, disulfide bridge patterns are known to contribute to the pharmacological activity of toxins (20,21). Second, the structural requirements for the pharmacological activity of MCa were shown to be more stringent than those required for cell penetration as probed by alanine scanning of MCa (9). Finally, we synthesized MTX_b-Abu, a biotinylated version of MTX that has no cell penetrating properties on its own and that acts on voltage-dependent potassium channels (Fig. 1D). This peptide, in which we also replaced six internal cysteine residues by Abu derivatives, as for the MCa_b-Abu peptide, was used as a negative control in cell penetration experiments.

Removing disulfide bridges in MCa disrupts the secondary structure of the peptide

Circular dichroism analyses were performed for MCa_b, MCa_b-Abu, and MCa_b-Abu E12A (Fig. 2). As shown, the spectra for MCa_b-Abu and MCa_b-Abu E12A differed significantly from MCa_b indicating the alteration of secondary structures of the peptides. These observations are coherent with a role of disulfide bridges in the acquisition/stabilization of secondary structures of toxins (11). These data clearly indicate that blocking disulfide bridge formation in MCa is a successful strategy to alter the structure of MCa.

Cysteine replacement by Abu derivatives produces pharmacologically-inert MCa analogues

MCa is known to bind to RyR1 from skeletal muscles (2). Upon binding, it modifies the conformation of this intracellular calcium channel in such a way that it favours binding of [³H]-ryanodine to its receptor, probably by converting low affinity binding sites to high affinity one. The effect of 1 μM MCa_b on [³H]-ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum (SR) containing RyR1 was confirmed in this study (Fig. 3). An average stimulation in binding of 59.7-fold was measured (n=3). The value of this stimulation depends upon the basal level of binding and can occasionally be lower, down to 7-fold (not shown). Importantly, the two analogs in which the cysteine residues were replaced by Abu derivatives, MCa_b-Abu and MCa_b-Abu E12A, had no significant effect on [³H]-ryanodine binding indicating that the structural impact of these substitutions fully blocked the effect of MCa on RyR1. Slight reductions in [³H]-ryanodine binding were observed although these effects were not significant. Higher concentrations of these two analogs were also without effect (not shown). The E12A substituted analogue thus proved no better than MCa_b-Abu in spite of the fact that a similar mutation in the folded MCa has higher affinity for RyR1 (9).

We also investigated the effect of these analogs on Ca²⁺ homeostasis in muscles fibers. The effects of the three peptides MCa_b, MCa_b-Abu and MCa_b-Abu E12A were tested on the free Ca²⁺ transients elicited by voltage-clamp depolarizations in single skeletal muscle fibers from mouse. Fig. 4A shows representative Indo-1 saturation traces obtained in response to pulses from -80 mV to +10 mV of 5, 10, 20 and 50 ms duration in (from top to bottom) a control fiber, a fiber dialyzed with 100 μM MCa_b, a fiber dialyzed with 200 μM MCa_b-Abu or a fiber dialyzed with 200 μM MCa_b-Abu E12A, respectively. These high concentrations of peptides were chosen to ensure that effective intracellular levels could be reached after equilibration

(see Methods). As previously described (3), MCA_b produced a remarkable change in the time course of the Ca²⁺ transients: it prevented membrane repolarization-induced complete turn off of SR Ca²⁺ release, resulting in a prolonged elevation of the cytoplasmic [Ca²⁺] after the end of the pulses. This was obviously not the case in the two fibers treated respectively with MCA_b-Abu and MCA_b-Abu E12A, for which the Ca²⁺ transients yielded properties very similar to the ones of the control fiber. Corresponding mean values for the peak Δ[Ca²⁺] during the pulse, and the final Δ[Ca²⁺] at the time of the end of the record, are presented in Fig. 4B,C. For instance, MCA_b produced a mean final Δ[Ca²⁺] value of 0.164 ± 0.032 (n=4) following a pulse of 20 ms, whereas MCA_b-Abu and MCA_b-Abu E12A produced only values of 0.019 ± 0.009 (n=9) and 0.016 ± 0.008 (n=11), respectively, compared to 0.017 ± 0.007 (n=10) for the control condition. There was thus no significant difference in the values for the peak Δ[Ca²⁺], and the final Δ[Ca²⁺] between control fibers and fibers treated with either MCA_b-Abu or MCA_b-Abu E12A clearly demonstrating a complete loss of MCA-induced activity on SR Ca²⁺ release for these two compounds. The effect of MCA likely results from competition with a physiological interaction between the DHP receptors and RyR1 (3) explaining why such high concentrations are required. We conclude that replacement of the cysteine in MCA by Abu derivatives produces non-folded and pharmacologically-inert analogs.

Conserved cell penetration properties of disulfideless MCA analogues

Biotinylated MCA, MCA_b, favours the efficient penetration of fluorescently-labelled streptavidine (Strep) (7,9,22), through macropinocytosis (23). The cell penetration of MCA_b/Strep complexes involves one or multiple steps of attachment to the membrane through binding to cell surface glycosaminoglycans and negatively charged lipids. The complex can be found predominantly in endosomes, leading to a punctate cytoplasmic distribution, a pattern that is supposedly linked to the nature of the cargo rather than the vector itself. Here, we investigated whether the disulfide-less analogues of MCA_b were capable of carrying Strep-Cy5 into CHO cells (Fig. 5A). As shown, 1 μM of Strep-Cy5 alone is unable to enter CHO cells. This was true for 100% of the cells examined by confocal microscopy (n=200). However, when coupled to either MCA_b, MCA_b-Abu or MCA_b-Abu E12A in a 4 to 1 ratio and incubated for 2 hrs with living CHO cells, the resulting complexes gave punctate staining. Here again, 100% of the cells were positively stained by Strep-Cy5 (n=200 for each condition). This punctate staining is an indication of endosomal distribution further confirming that it may be linked to the nature of the cargo rather than the vector, since similar distributions are observed for the MCA analogs despite the structural changes in the vector. In contrast, no cell penetration of Strep-Cy5 was observed in CHO cells using a biotinylated analogue of MTX, MTX_b-Abu, a voltage-gated K⁺ channel blocker (Fig. 5B; 0% of n=200 cells examined by confocal microscopy). This indicates that MCA_b-Abu is unlikely to penetrate non-specifically into cells owing to its amphipatic nature.

In order to obtain half-maximal Penetration Concentration values (PC₅₀) and the extent of total penetration of the complex, quantification of cell penetration by fluorescence activated cell sorting (FACS) was performed. Quantification is a way to distinguish the cell penetration efficacies of various MCA analogs (9) or of various cell lines (23). As shown in Fig. 6, after 2 hrs incubation, both MCA_b-Abu and MCA_b-Abu E12A analogs were less effective than MCA_b since the total Strep-Cy5 fluorescence entering CHO cells at maximally effective concentration of the peptides (10 μM) was reduced on average by 28% and 59% for MCA_b-Abu E12A and MCA_b-Abu, respectively (Fig. 6). It is of interest that the E12A mutant was more effective than the analog without mutation. A similar observation was made with the folded version of this mutation (9). This effect is most likely due to an increase in the basic content of the molecule. With regard to PC₅₀ values, only slight reductions in the efficacies of the analogs were observed. In these experiments, we measured PC₅₀ values of 669 ± 27 nM for MCA_b/Strep-Cy5 (n=3), 910 ± 51 nM for MCA_b-Abu/Strep-Cy5 (n=3) and 1042 ± 89 nM

for MCA_b-Abu E12A/Strep-Cy5 (n=3). Therefore, in the case of disulfide-less analogs, maximal cell penetration of Strep-Cy5 could be obtained by only using slightly increased peptide concentrations.

Adding an N-terminal cysteine residue to a disulfide-less MCA analog produces a chemically-competent peptide for the cell penetration of various cargoes

Although the use of Strep brings proof of concept, it remains a useless cargo for many biological applications, especially if it concentrates into endosomes. We therefore produced a novel disulfide-less analogue of MCA in which we simply replaced the N-terminal biotinylated lysine by a cysteine residue in order to make various chemical coupling strategies possible (Cys-MCA-Abu whose sequence is shown in Fig. 7A). Next, this peptide was coupled to various cargoes using several chemistries and investigated for its ability to enter cells (Fig. 7B-D). Cys-MCA-Abu was first coupled to a FITC fluorescent peptide containing a C-terminal cysteine residue. The coupling consisted in favoring the formation of a disulfide bridge among the two peptides. At 1 μ M, this complex entered CHO cells (100% of the cells by confocal microscopy, n=200) whereas incubation of CHO cells with 1 μ M FITC-labeled peptide alone resulted in no cell penetration (Fig. 7B; 0% of n=200 cells observed). The FITC-peptide complex stained diffusely the cells indicating that it reached both the cytoplasm and the nucleus either through direct plasma membrane translocation or through endosomal escape. Since the Strep and FITC complexes distribute differently in the cell, it appears that the cargo rather than the vector determines the cell distribution. Cys-MCA-Abu was also coupled to doxorubicin, an anti-tumor drug, which penetrates into MDA-MB-231 cells by itself, and concentrates in nuclei where it acts on DNA replication. The chemical coupling was performed using a cross-linker, allowing a directional coupling with the unique amino group of doxorubicin and the SH function of the cysteine residue of Cys-MCA-Abu. As shown, incubation of MDA-MB-231 cells with either 3 μ M doxorubicin or doxorubicin-linker-Cys-MCA-Abu resulted in significantly different cell distributions (Fig. 7C). Covalent linkage of doxorubicin with Cys-MCA-Abu produced a marked cytoplasmic localization, also diffuse, in marked contrast to the predominantly nuclear distribution of doxorubicin. In 96% of the cells examined (n=200), the coupling to Cys-MCA-Abu resulted in a cytoplasmic distribution of doxorubicin. Finally, near-infrared emitting quantum dots from Invitrogen, with amine surfaces, were linked to Cys-MCA-Abu using maleimide chemistry. Maleimide was added to QD yielding QD_M, that could further be linked to the SH function of the Cys residue of Cys-MCA-Abu. Incubation of 50 nM of QD_M-Cys-MCA-Abu with CHO cells resulted in cell penetration with a diffuse distribution in both the cytoplasm and the nucleus (Fig. 7D; 100% of cells observed; n=200). No penetration was observed with QD_M incubation alone (0% of cells, n=200). The rather efficient penetration observed with such a low concentration of QD_M-Cys-MCA-Abu might be explained by the high potential of Cys-MCA-Abu grafting at the surface of QD_M (about 100 to 120 maleimide converted functions at the surface of a single QD).

Cell toxicity of MCA analogues

To be considered as good cell penetrating vectors, peptides must have limited cell toxicity. We investigated cerebellar granule cell survival after incubation with 10 μ M of free vector peptide for 24 hrs (Fig. 8). This cell system is generally used for the evaluation of neuronal survival. It is more stringent than the use of cell lines that are more resistant to toxic agents. The conditions used in this study were deliberately extreme considering the conditions required for the cell penetration of our vectors. First, incubation times in the range of an hour are largely sufficient; second, cell penetration is observed at lower concentrations than 10 μ M; and third, we have evidence suggesting that intracellular concentrations of cell penetrating peptides increase markedly when cells are incubated with the vector alone rather than in complex with the cargo. Nevertheless, the experimental conditions used here indicate that only one of the analog had a significant effect on neuronal survival (MCA_b-Abu, mean survival of $74.3 \pm 4.9\%$,

n=6), whereas all other analogs were without significant effects despite of the conditions used here (n=6 for each condition).

CONCLUDING REMARKS

By simple substitution of the six cysteine residues of MCa, we have produced a series of analogs that are devoid of secondary structure and therefore of pharmacological activity. These analogs nevertheless possess cell-penetrating properties that are closely related to those established for native MCa. This finding indicates that the proper folding of MCa is not essential for the membrane translocation. Similarly, the spatial separation of a basic face and a hydrophobic face of MCa seems of little importance for cell penetration. It cannot be excluded however that during the translocation process itself, when the peptide interacts with negatively charged lipids, it may adopt a conformation close to that of native MCa. The observation that MTX_b-Abu, used as a negative control, does not penetrate cells indicates that MCa-Abu does not act as a detergent by means of its amphipathic nature. Slight increase in effective concentrations or reductions in total transport capacities of these analogs barely counterbalance the benefits of the loss of pharmacological effects or the ability to graft an extra-N-terminal cysteine residue to the sequence for versatile cargo coupling strategies. Our results further indicate that the Cys-MCa-Abu vector is valuable for the cell delivery of a variety of cargoes. The cytoplasmic localization of the delivered cargoes using this vector should be invaluable for many biological applications for which targeting to this compartment are an absolute requirement. For future applications, it might be recommended to assess the cell toxicity of the vector/cargo complexes of interest in the conditions of the application. The benefits of all cell penetrating peptides undoubtedly lie in the value of penetration/toxicity concentration ratio of the formed complexes, a value that needs to be determined for each application.

Acknowledgements

We thank the team of Pr. Rémy Sadoul for help with cerebellar granule cell cultures. We also thank Dr. Jonathan Coles for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from Inserm and the Fond de Valorisation of the CEA. Narendra Ram is a fellow of the Région Rhône-Alpes and is supported by an Emergence grant to M.D.W.

References

1. Altafaj X, Cheng W, Esteve E, Urbani J, Grunwald D, Sabatier JM, Coronado R, De Waard M, Ronjat M. *J Biol Chem* 2005;280:4013–4016. [PubMed: 15591063]
2. Esteve E, Smida-Rezgui S, Sarkozi S, Szegedi C, Regaya I, Chen L, Altafaj X, Rochat H, Allen P, Pessah IN, Marty I, Sabatier JM, Jona I, De Waard M, Ronjat M. *J Biol Chem* 2003;278:37822–37831. [PubMed: 12869557]
3. Pouvreau S, Csernoch L, Allard B, Sabatier JM, De Waard M, Ronjat M, Jacquemond V. *Biophys J* 2006;91:2206–2215. [PubMed: 16782801]
4. el-Hayek R, Lokuta AJ, Arevalo C, Valdivia HH. *J Biol Chem* 1995;270:28696–28704. [PubMed: 7499390]
5. Shahbazzadeh D, Srairi-Abid N, Feng W, Ram N, Borchani L, Ronjat M, Akbari A, Pessah IN, De Waard M, El Ayeub M. *Biochem J* 2007;404:89–96. [PubMed: 17291197]
6. Zhu S, Darbon H, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J. *Faseb J* 2003;17:1765–1767. [PubMed: 12958203]
7. Boisseau S, Mabrouk K, Ram N, Garmy N, Collin V, Tadmouri A, Mikati M, Sabatier JM, Ronjat M, Fantini J, De Waard M. *Biochim Biophys Acta* 2006;1758:308–319. [PubMed: 16545341]
8. Nascimento FD, Hayashi MA, Kerkis A, Oliveira V, Oliveira EB, Radis-Baptista G, Nader HB, Yamane T, Tersariol IL, Kerkis I. *J Biol Chem* 2007;282:21349–21360. [PubMed: 17491023]
9. Mabrouk K, Ram N, Boisseau S, Strappazzon F, Rehaïm A, Sadoul R, Darbon H, Ronjat M, De Waard M. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:2528–2540. [PubMed: 17888395]
10. Mosbah A, Kharrat R, Fajloun Z, Renisio JG, Blanc E, Sabatier JM, El Ayeub M, Darbon H. *Proteins* 2000;40:436–442. [PubMed: 10861934]

11. di Luccio E, Matavel A, Opi S, Regaya I, Sandoz G, M'Barek S, Carlier E, Esteve E, Carrega L, Fajloun Z, Rochat H, Loret E, de Waard M, Sabatier JM. *Biochem J* 2002;361:409–416. [PubMed: 11772414]
12. Davidson TJ, Harel S, Arboleda VA, Prunell GF, Shelanski ML, Greene LA, Troy CM. *J Neurosci* 2004;24:10040–10046. [PubMed: 15537872]
13. Liang JF, Yang VC. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15:5071–5075. [PubMed: 16168650]
14. Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, Gambhir SS, Chen X. *Nano Lett* 2006;6:669–676. [PubMed: 16608262]
15. Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS. *J Neurosci* 1987;7:2203–2213. [PubMed: 2886565]
16. Kim DH, Ohnishi ST, Ikemoto N. *J Biol Chem* 1983;258:9662–9668. [PubMed: 6309780]
17. Collet C, Allard B, Tournier Y, Jacquemond V. *J Physiol* 1999;520(Pt 2):417–429. [PubMed: 10523411]
18. Jacquemond V. *Biophys J* 1997;73:920–928. [PubMed: 9251808]
19. Csernoch L, Bernengo JC, Szentesi P, Jacquemond V. *Biophys J* 1998;75:957–967. [PubMed: 9675196]
20. Fajloun Z, Ferrat G, Carlier E, Fathallah M, Lecomte C, Sandoz G, di Luccio E, Mabrouk K, Legros C, Darbon H, Rochat H, Sabatier JM, De Waard M. *J Biol Chem* 2000;275:13605–13612. [PubMed: 10788477]
21. Fajloun Z, Mosbah A, Carlier E, Mansuelle P, Sandoz G, Fathallah M, di Luccio E, Devaux C, Rochat H, Darbon H, De Waard M, Sabatier JM. *J Biol Chem* 2000;275:39394–39402. [PubMed: 10970898]
22. Esteve E, Mabrouk K, Dupuis A, Smida-Rezgui S, Altafaj X, Grunwald D, Platel JC, Andreotti N, Marty I, Sabatier JM, Ronjat M, De Waard M. *J Biol Chem* 2005;280:12833–12839. [PubMed: 15653689]
23. Ram, N., Aroui, S., Jaumain, E., Sadoul, R., Mabrouk, K., Ronjat, M., Lortat-Jacob, H., De Waard, M. (submitted)

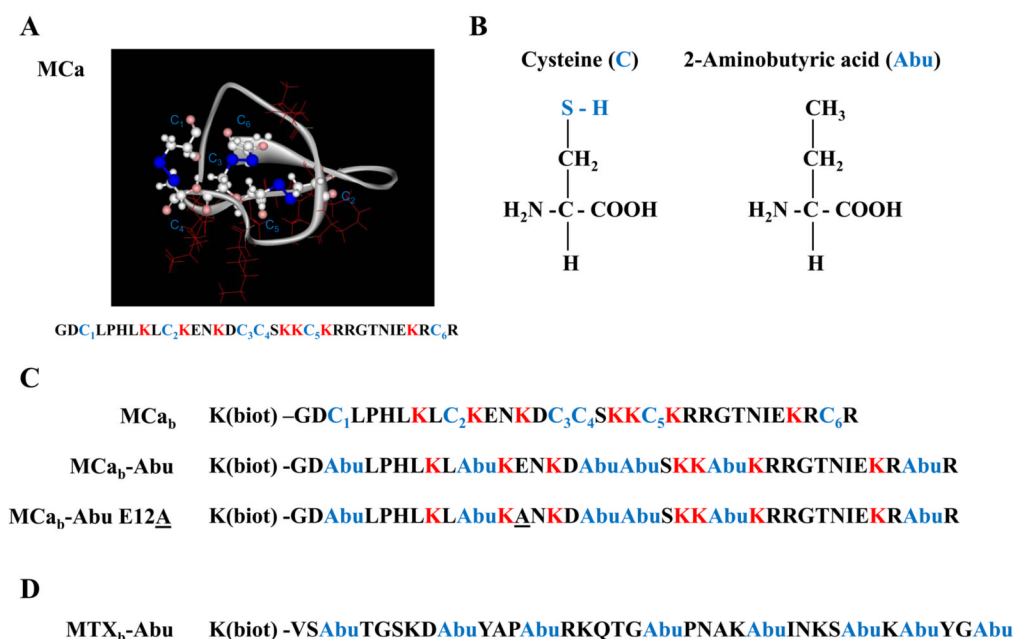


Fig. 1.

MCa analogues, MCa_b-Abu and MCa_b-Abu E12A. **A.** Ribbon representation of the 3D solution structure of MCa illustrating the positions of the three disulfide bridges C₁-C₄, C₂-C₅ and C₃-C₆. S-S bonds are shown in blue. The positions of positively charged lysines, essential for cell penetration, are shown in red. **B.** Differences in side chain between cysteine residues and 2-aminobutyric acid (Abu) used for substitution of all cysteine residues in MCa amino acid sequence. **C.** Amino acid sequences of three different MCa analogs used in this study. A fourth analog is shown in Fig. 7A. **D.** Amino acid sequence of MTX_b-Abu, an analog of MTX in which all cysteine residues are replaced by Abu, and an extra biotinylated lysine residue added at the N-terminus. Note that MTX contains six basic amino acid residues in its sequence.

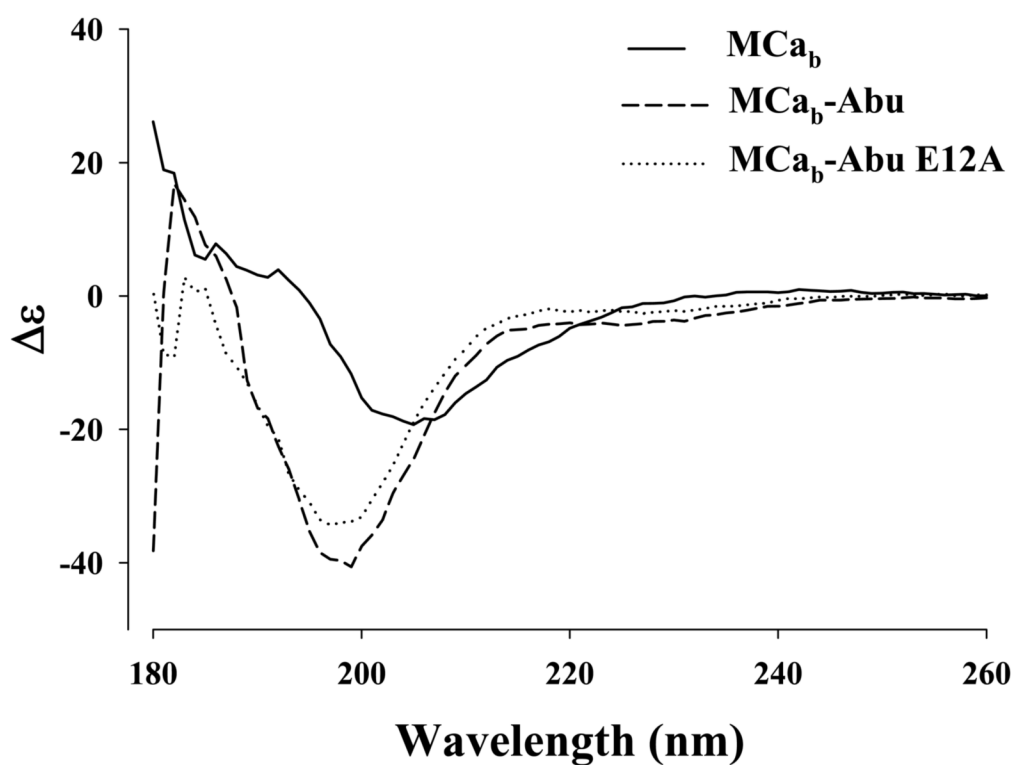


Fig. 2.

Determination of the secondary structures of MCa_b , $\text{MCa}_b\text{-Abu}$ and $\text{MCa}_b\text{-Abu E12A}$ by circular dichroism. Each spectrum presented is the mean of three independent acquisitions taken at a concentration of 50 μM in pure water at 20°C.

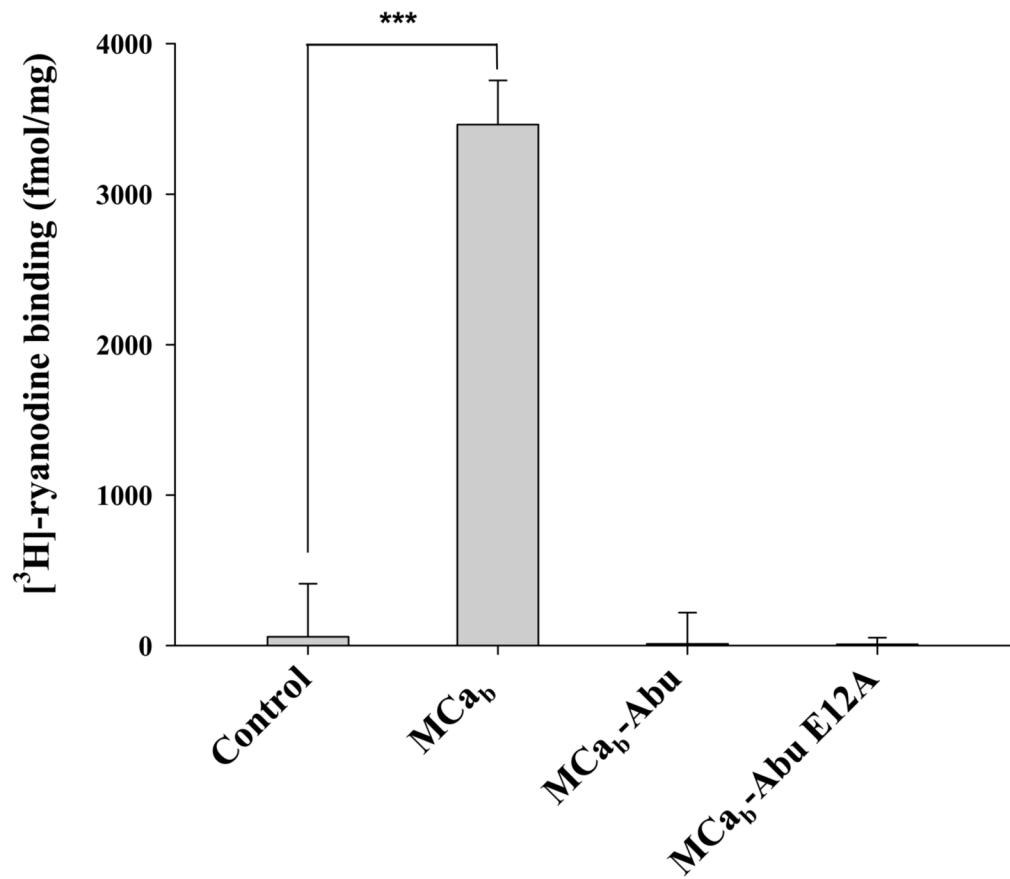


Fig. 3.

Effect of 1 μ M MCa_b, MCa_b-Abu or MCa_b-Abu E12A on [³H]-ryanodine binding onto heavy SR vesicles. Specific [³H]-ryanodine binding was measured as described under *Materials and Methods*. Control binding has been performed in the absence of MCa analog.***, $p \leq 0.01$. Note the loss of effect upon cysteine replacement by Abu derivatives. The experiment was repeated three times with similar results.

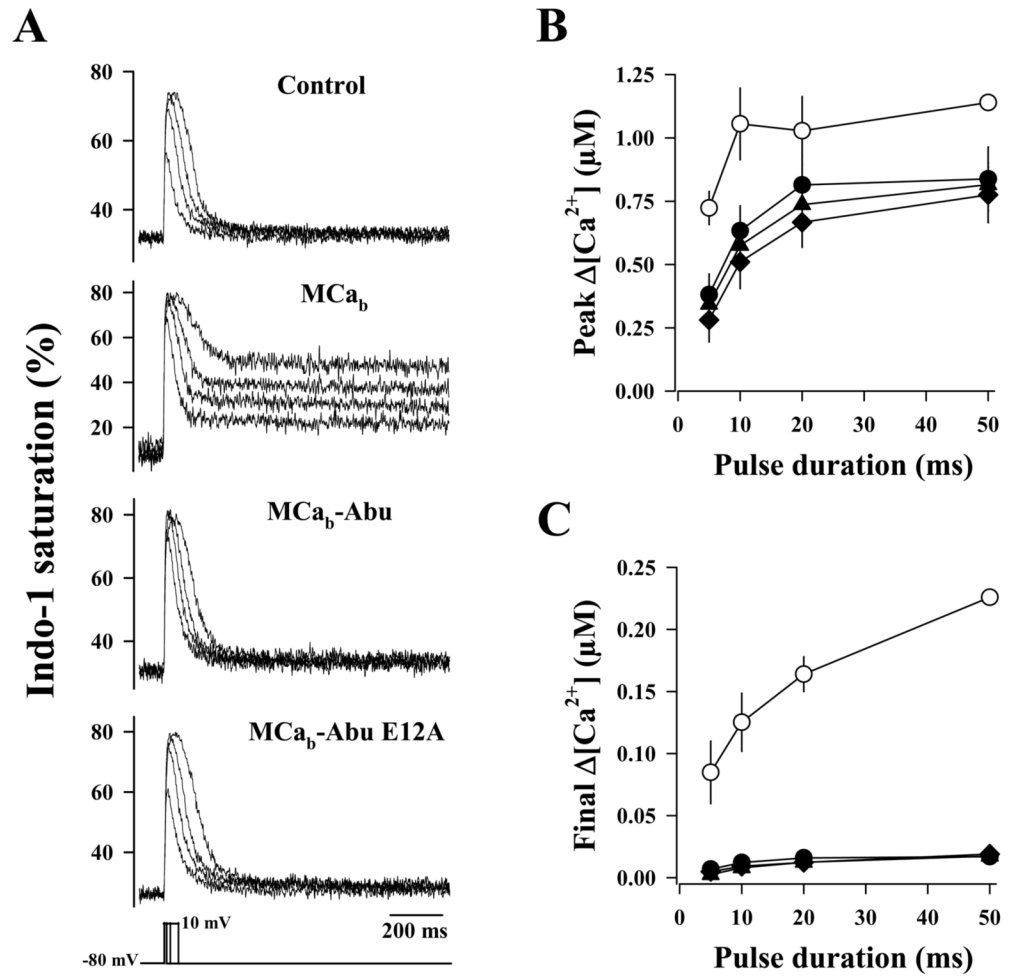
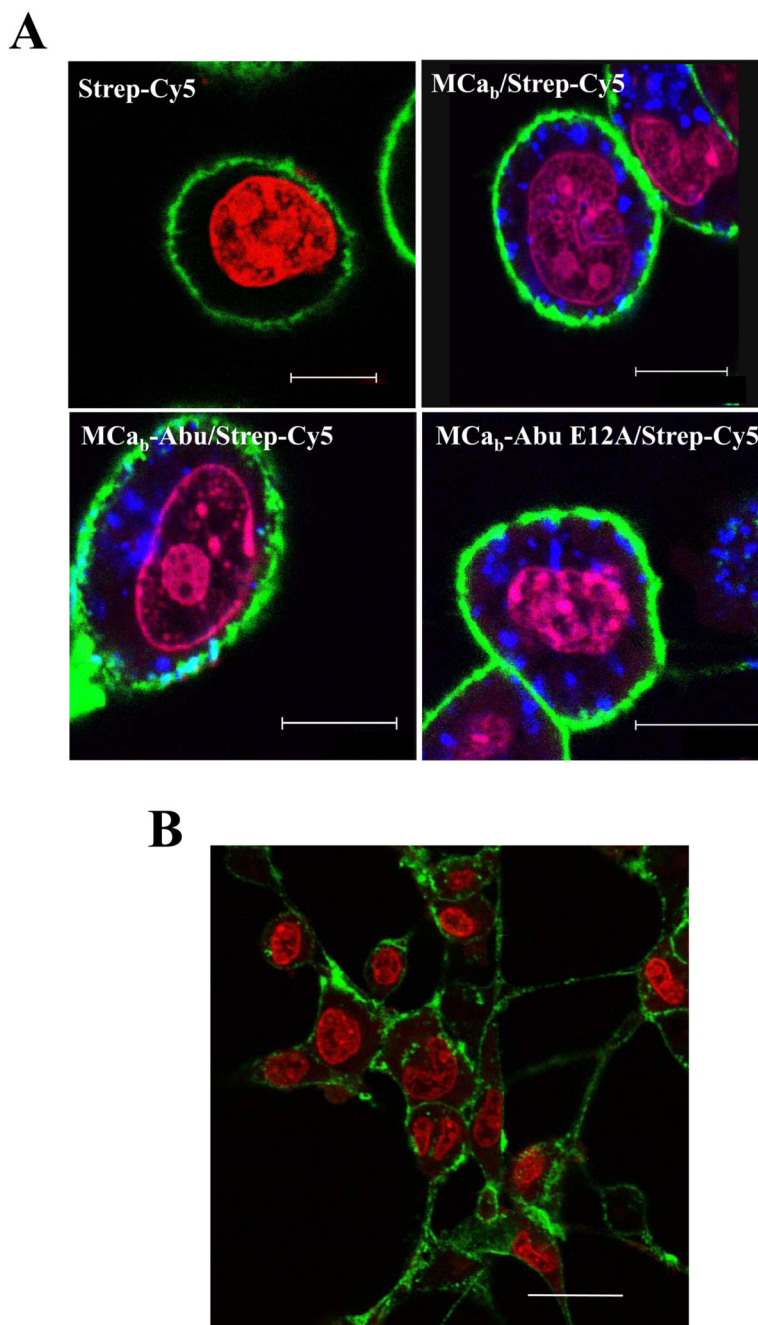
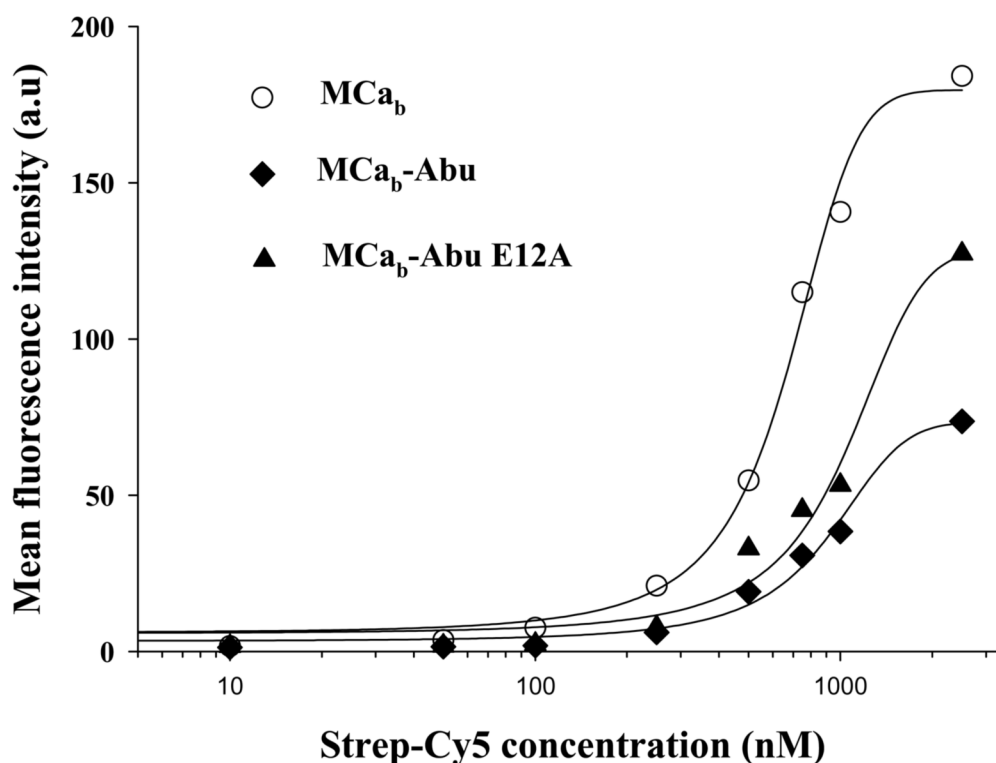


Fig. 4.

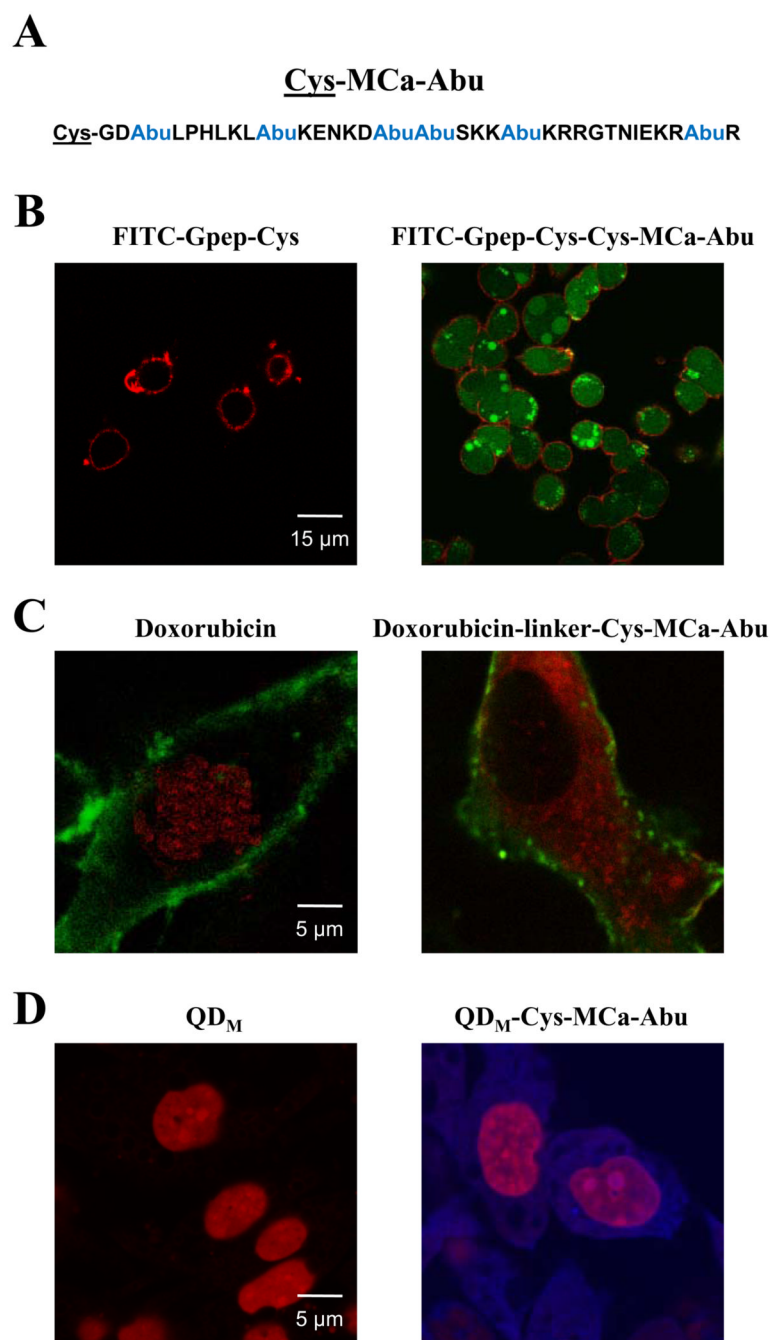
Effects of MCA_b, MCA_b-Abu and MCA_b-Abu E12A on voltage-activated sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release. **A.** Indo-1 Ca²⁺ records in response to membrane depolarizations of increasing duration in a control fiber and in fibers dialyzed, respectively, with MCA_b (100 μM), MCA_b-Abu (200 μM) and MCA_b-Abu E12A (200 μM). **B, C.** Corresponding mean values for peak $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$, and final $\Delta[\text{Ca}^{2+}]$ at the end of the record in control fibers ($n=11$) and in fibers dialyzed with either MCA_b ($n=3$), MCA_b-Abu ($n=10$) or MCA_b-Abu E12A ($n=3$). Note the loss of pharmacological consequences of replacing cysteine by Abu derivatives.

**Fig. 5.**

Distribution of MCA_b/, MCA_b-Abu/and MCA_b-Abu E12A/Strep-Cy5 in CHO cells. **A.** Confocal images showing the cell penetration of Strep-Cy5 (2 hrs incubation) in the absence or presence of 4 μ M MCA_b, MCA_b-Abu or MCA_b-Abu E12A in CHO cells. Colors: blue (Strep-Cy5), red (nuclei, DHE) and green (plasma membrane, concanavalin A). Note the lack of differences in cell distribution between Strep-Cy5 and the MCA analogues used. The punctate distribution is linked to the use of streptavidin as cargo. Scale bars: 10 μ m. **B.** Confocal image of CHO cells showing that 4 μ M MTX_b-Abu is unable to deliver Strep-Cy5 inside cells (2 hrs incubation). Color code as in A. Scale bar: 15 μ m.

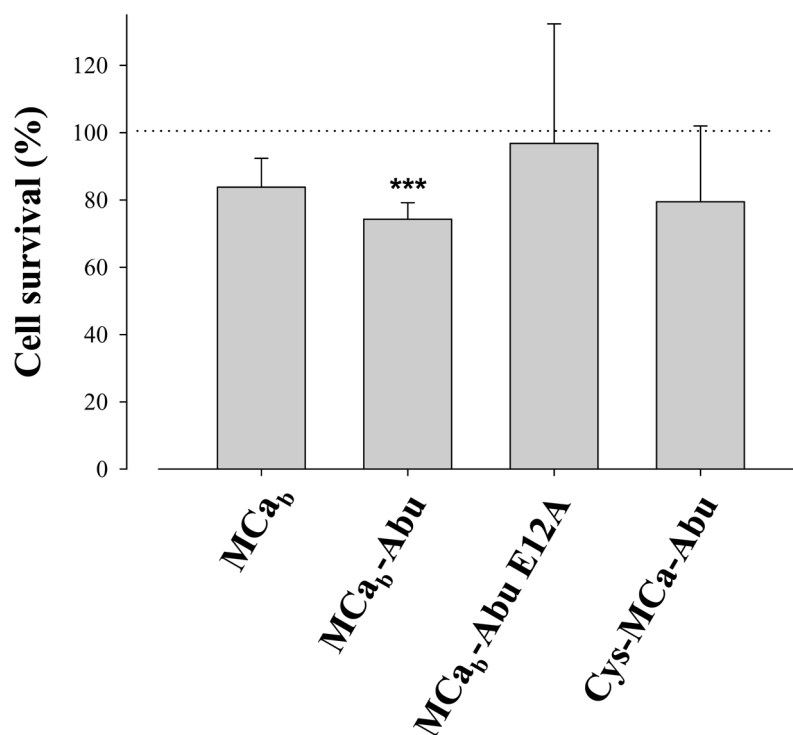
**Fig. 6.**

Mean cell fluorescence intensities (MFI) as a function of the concentration of cell penetrating complexes for each MCA analog. Indicated concentrations are for Strep-Cy5 (10 nM to 2.5 μ M). The ratio MCA analog/Strep-Cy5 was 4/1. Data were fitted by a sigmoid equation of the type $MFI = MFI_{max} / (1 + \exp(-(x-PC_{50})/b))$ where $MFI_{max} = 180 \pm 6$ a.u. (MCA_b), 73 ± 4 a.u. (MCA_b-Abu) and 129 ± 8 a.u. (MCA_b-Abu E12A), $b = 200 \pm 18$ (MCA_b), 301 ± 38 (MCA_b-Abu) and 344 ± 64 (MCA_b-Abu E12A), and half-penetration concentration values $PC_{50} = 669 \pm 27$ nM (MCA_b), 910 ± 51 nM (MCA_b-Abu) and 1042 ± 89 nM (MCA_b-Abu E12A). a.u.: arbitrary units. The MFI values are obtained from a fit of the FACS histograms ($n=10,000$ events in each case). Representative example of $n=3$ experiments. Experiments could not be averaged because the different photomultiplier settings were not calibrated.

**Fig. 7.**

Design of a cell-penetrating analog for the efficient coupling and delivery of a variety of cargoes. **A.** primary amino acid sequence of the Cys-MCa-Abu analog. This analogue is identical to MCa_b-Abu except that the N-terminal K(biot) has been replaced by an N-terminal cysteine residue. **B.** Cell penetration of FITC-Gpep-Cys when covalently linked to Cys-MCa-Abu (right panel, 1 μ M concentration, 2 hrs incubation with CHO cells). No penetration is observed for 1 μ M FITC-Gpep-Cys alone (left panel). Code colors: red, concanavalin-A-rhodamine, and green, FITC label. **C.** Cell penetration of 3 μ M doxorubicin or the covalently linked complex, doxorubicin-linker-Cys-MCa-Abu, in MDA-MB-231 cells. Note that doxorubicin alone goes to the nucleus (red, left panel), whereas coupled to Cys-MCa-Abu it

concentrates in the cytoplasm. Green: concanavalin-A-FITC for plasma membrane staining. *D*. Cell penetration of 50 nM quantum dots (QD) alone (left panel) or coupled after maleimide modification of QDs to Cys-MCa-Abu in CHO cells (right panel). Code colors: red, nuclei (DHE) and blue, QDs. From *B* to *D*, note the diffuse cytoplasmic staining of the cargoes when coupled to Cys-MCa-Abu.

**Fig. 8.**

Neuronal toxicity of MCa analogues. Neuronal survival after 24 hrs incubation with 10 μ M of each MCa analogue was assessed with the MTT assay. No significant differences in neuronal survival were observed between the analogues.***, survival affected with mean + 3 S.D. < 100%. Average of 6 data points.

Nous avons pu montrer, que par une simple substitution des six cystéines de la M_{Ca}, on a produit un analogue dépourvu de sa structure secondaire ainsi que de son activité pharmacologique sur le récepteur RyR₁, notamment du fait qu'il ne se lie pas au récepteur RyR₁. Néanmoins, cet analogue (M_{Ca}_{Abu}) garde bien la propriété de la pénétration cellulaire de la M_{Ca} native, même si elle est légèrement inférieure. Ceci montre bien que le motif de repliement (ICK, Inhibitor Knot Motif) de la structure tridimensionnelle du peptide n'est pas essentiel pour la translocation membranaire. Cependant, il reste probable que pendant le processus de translocation même de M_{Ca}_{Abu}, son interaction avec les charges négatives des lipides membranaires lui fasse adopter une conformation voisine du M_{Ca}. Des études RMN dédiées à cette question seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Nos résultats nous ont incité à montrer que l'addition d'une cystéine du côté N-terminale à cet analogue (Cys-M_{Ca}_{Abu}) a rendu possible le couplage d'une variété de cargos utilisant différentes stratégies de couplage. Cys-M_{Ca}_{Abu} a été couplé chimiquement à :

- Un peptide marqué au FITC et contenant une cystéine du côté C-terminal. Le couplage consiste à favoriser la formation d'un pont disulfure entre les deux peptides
- La Dox en utilisant un 'cross-linker' qui permet la liaison entre le groupement amine de la drogue et la fonction SH du peptide.
- Des quantum dots (QD), avec des surfaces amines, qui ont été couplés en utilisant le maleimide additionné aux QD (rendues QDM) et qui favorise la liaison à la fonction SH du peptide.

L'étude des propriétés de pénétration de ces complexes formés Cargos-Cys-M_{Ca}_{Abu} a montré que l'analogue M_{Ca}_{Abu} est un puissant vecteur pour la délivrance d'une variété de cargos et ce dans différents modèles cellulaires. Nous avons pu constater aussi que la localisation intracellulaire de ces complexes diffère de la localisation du cargo seul et semblerait être déterminée par ce dernier plutôt que par le vecteur utilisé.

ARTICLE III

Maurocalcine as a Non Toxic Drug Carrier Overcomes Doxorubicin Resistance in the Cancer Cell Line MDA-MB 231

Sonia Aroui,^{1,2,3} Narendra Ram,^{1,2} Florence Appaix,^{1,2} Michel Ronjat,^{1,2} Abderraouf Kenani,³ Fabienne Pirollet,^{1,2} and Michel De Waard^{1,2,4}

1 INSERM, U836, Calcium Channels, Functions and Pathologies BP 170, Grenoble Cedex 9 38042, France.

2 Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences BP 170, Grenoble Cedex 9 38042, France.

3 05/UR/09-09, Molecular Mechanisms and Pathologies, Faculté de Médecine de Monastir 5019, Monastir Tunisia.

Pharmaceutical Research (2008)

Maintenant que nous avons montré que l'analogue M_{Ca}Abu préserve sa propriété de vecteur avec une chimie de couplage non affectée par les résidus cystéines du peptide, une étude plus élargie au cours de ce travail de thèse a porté sur le couplage de cet analogue à la Dox. La caractérisation du complexe (cytotoxicité, bio-distribution et internalisation) comparativement à la drogue seule a été aussi réalisée et l'ensemble de ces propriétés a été comparé à des complexes similaires de la Dox conjuguée aux peptides Tat et pénétratine (Pen).

Nous avons choisis la Dox parce qu'elle est largement utilisée en chimiothérapie anticancéreuse, notamment dans le traitement de tumeurs solides tel que le cancer du sein, du foie et des poumons. La chimie de couplage que nous avons adoptée s'agit d'une liaison de la fonction amine de la drogue à la cystéine du côté N-terminale des peptides par un 'cross-linker'. La Dox ne renferme qu'un seul groupement amine susceptible d'être couplé, ce qui facilite le couplage et réduit d'autant le nombre de sous-produits. La drogue a aussi l'avantage d'être fluorescente ce qui permet de visualiser sa pénétration cellulaire sans avoir recours à l'addition d'autres fluorochromes.

Il nous a donc semblé intéressant, de choisir un modèle cellulaire présentant une résistance à la Dox et de vérifier si par les complexes Dox-CPPs synthétisés, on pourrait contourner cette résistance à la Dox qui demeure actuellement un défi dans les traitements anticancéreux. Il est bien établi que la résistance clinique aux drogues est la raison majeure de l'échec du traitement du cancer. Maintenant, environ 50% des cancers humains sont complètement résistants à la chimiothérapie ou bien répondent transitoirement jusqu'à ce qu'ils ne soient plus affectés par les drogues anticancéreuses généralement utilisées.

Ce phénomène est généralement désigné sous le nom de 'multidrug resistance' (MDR) (Sawicka et *al.*, 2004). Des mécanismes divers sont présumés être responsables du phénotype MDR, par exemple la conversion intracellulaire de la drogue en métabolites moins actifs ainsi que la diminution de l'expression de topoisomérase II dans les cellules MDR. Par ailleurs, le mécanisme le mieux caractérisé, expliquant la faible accumulation intracellulaire de la drogue, est la surexpression de protéines des pompes de flux qui sont énergie-dépendantes telle que la P-glycoprotéine (Pgp). Cette protéine membranaire est capable de refouler les

drogues du cytoplasme et, de ce fait, de réduire leur concentration intracellulaire (Seelig *et al.*, 2005).

Pour réaliser cette étude, nous avons employé deux lignées cellulaires du cancer du sein qui diffèrent par leur sensibilité à la Dox. Les cellules MCF7 qui sont décrites sensibles à la Dox et les cellules MDA-MB 231 qui lui sont résistantes. Cette différence de sensibilité à la drogue a été expliquée par la surexpression des protéines de réparation des coupures double brin de l'ADN, Rad51 dans les cellules MDA-MB 231 et non pas dans les cellules MCF7 qui présentent un niveau faible de la protéine (Henning *et al.*, 2007). Il a été aussi démontré que l'activité catalytique de la topoisomérase II dans l'extrait nucléaire de la lignée MDA-MB 231, est réduite par rapport à la lignée MCF7 (Sharma *et al.*, 1995).

Les résultats de ce travail ont fait l'objet de la publication suivante: Article III:

Research Paper

Maurocalcine as a Non Toxic Drug Carrier Overcomes Doxorubicin Resistance in the Cancer Cell Line MDA-MB 231

Sonia Aroui,^{1,2,3} Narendra Ram,^{1,2} Florence Appaix,^{1,2} Michel Ronjat,^{1,2} Abderraouf Kenani,³ Fabienne Pirollet,^{1,2} and Michel De Waard^{1,2,4}

Received June 3, 2008; accepted November 4, 2008

Purpose. The aim of this study is to overcome tumour cell resistance that generally develops after administration of commonly used anti-cancer drugs, such as doxorubicin.

Methods. Recently, cell penetrating peptides have been used for their ability to deliver non-permeant compounds into cells. One such cell penetrating peptide, maurocalcine, has been isolated from the venom of a Tunisian scorpion. Herein, we report the effects of doxorubicin covalently coupled to an analogue of maurocalcine on drug-sensitive or drug-resistant cell lines MCF7 and MDA-MB 231.

Results. We demonstrated the *in vitro* anti-tumoral efficacy of the doxorubicin maurocalcine conjugate. On a doxorubicin-sensitive cancer cell line, the maurocalcine-conjugated form appears slightly less efficient than doxorubicin itself. On the contrary, on a doxorubicin-resistant cancer cell line, doxorubicin coupling allows to overcome the drug resistance. This strategy can be generalized to other cell penetrating peptides since Tat and penetratin show similar effects.

Conclusion. We conclude that coupling anti-tumoral drugs to cell penetrating peptides represent a valuable strategy to overcome drug resistance.

KEY WORDS: cell-penetrating peptide; doxorubicin; drug delivery systems; drug resistance; maurocalcine.

INTRODUCTION

During the last 15 years, numerous peptides able to translocate across the plasma membrane within seconds to minutes and termed cell-penetrating peptides (CPPs) have been characterized (1). The 60 amino-acid-long homeodomain of the *Drosophila* transcription factor Antennapedia

was the first CPP discovered and shown to serve as a signal for the internalization of other polypeptides (2,3). Its penetration and translocation properties were further restricted to a peptide of 16 residues, corresponding to the 43–58 third helix of this DNA binding domain and thereafter called penetratin (Pen) (4,5). Now, along with Pen, multiple CPPs (peptides derived from the HIV1-Tat protein, synthetic 7–9 homoarginine peptides, chimera peptides such as transportan, model amphipathic peptide, etc...) are intensively studied to facilitate penetration of various molecules or particles of different sizes inside cells and are considered as important tools in drug delivery (6–8).

Maurocalcine (MCa) is a 33-mer toxin derived from the venom of the Tunisian scorpion *Scorpio maurus palmatus* which activates the ryanodine receptor type 1 (RyR1), an intracellular calcium channel involved in excitation–contraction coupling in skeletal muscle cells (9). Because of its ability to modulate calcium responses of intact skeletal myotubes, it was hypothesized to also behave as a CPP (10). The demonstration of MCa's vector properties was made by using biotinylated MCa coupled to fluorescent streptavidin. This complex was shown to enter various cell types within minutes and in all cell types tested, a common feature of CPPs (11). Numerous mutants of MCa were then designed in order to unravel the most active residues for its pharmacological and penetration activities (12). MCa folds following an Inhibitor Cystine Knot arrangement with three disulfide bridges (13).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11095-008-9782-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

¹ INSERM, U836, Calcium Channels, Functions and Pathologies BP 170, Grenoble Cedex 9 38042, France.

² Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences BP 170, Grenoble Cedex 9 38042, France.

³ UR09-09, Molecular Mechanisms and Pathologies, Faculté de Médecine de Monastir 5019, Monastir Tunisia.

⁴ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: michel.dewaard@ujf-grenoble.fr)

ABBREVIATIONS: Con A, Concanavalin A; CPP, Cell Penetrating Peptide; Dox, Doxorubicin; FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting; FITC, Fluorescein IsoThioCyanate; MCa, Maurocalcine; MCa_{Abu}, Maurocalcine analogue with cysteine residues replaced with L-  -aminobutyric acid; MTT, 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide; PBS, Phosphate Buffered Saline; Pen, Penetratin; RyR1, Ryanodine Receptor type 1; SMCC, Succinimidyl 4-[N-Maleimidomethyl]Cyclohexane-1-Carboxylate.

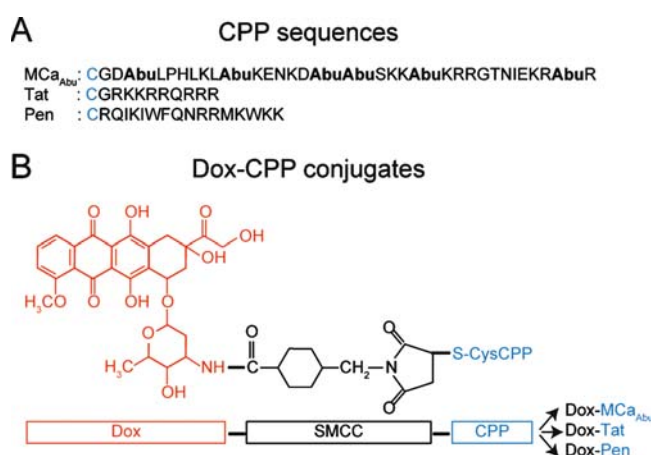


Fig. 1. Scheme of the Dox–CPP cell delivery complexes. **A** Amino acid sequences of the CPPs used for conjugation (single letter code). The extra cysteine used for chemical conjugation of Dox is indicated in blue. Mutated cysteine residues of MCa, replaced by Abu residues, are in bold. **B** Chemical structure of Dox (red) and SMCC crosslinker (black) bound to Cys–CPP (blue). Synthesis of peptides and coupling method with Dox are described in *Materials and Methods*. Resulting conjugates are indicated in the far right.

Taking into account that studies of the mode of entry of the CPPs have shown that the CPPs 3D-structure is dispensable for their translocation performances (8,14), a disulfide-less mutant called MCa_{Abu} was synthesized by replacing the six cysteine residues of MCa with the L- α -aminobutyric acid residue, Abu. Interestingly, this MCa mutant was devoid of effect on [³H]-ryanodine binding onto RyR1 from sarcoplasmic reticulum vesicles, whereas its penetration activity was mainly retained (15).

Doxorubicin (Dox) is one of the most used anticancer drugs, in particular in the treatment of breast cancer patients (16,17). Unfortunately, resistance to this agent is common and thereby the development of new drugs or alternative drug delivery systems to overcome the unsuccessful outcome of patients treatment is desirable (18,19). Mechanisms of cell resistance to Dox, as well as those behind enhanced Dox uptake and retention are intensively studied on various cancer cell lines (18,20,21). Current models used are cancer cell lines selected *in vitro*, such as low- and high-invasive breast carcinoma MCF7 and MDA-MB 231 cells, respectively representing Dox-sensitive and Dox-resistant cells (21–24). Using cancer model cell lines, various methods have been developed to improve doxorubicin efficacy and/or delivery. These methods comprise so far: (a) entrapping the drug in submicron carriers like liposomes, (b) using polymeric micelles, (c) coupling to nanoparticles or lactosaminated human albumin (25–29).

In this work, to gain insight into the potential of MCa as an efficient CPP for drug delivery and for overriding drug resistance, we have examined the intracellular delivery and subcellular distribution of MCa_{Abu} peptide covalently coupled to Dox into MCF7 and MDA-MB 231 cell lines and studied the cytotoxicity of this complex comparatively to Dox. We compared these properties with similar complexes of Dox linked to two archetypical poly-cationic CPPs, Pen and Tat, a HIV1-Tat derived peptide of ten amino acids. The results obtained indicate that MCa_{Abu} is a good peptide vector for

the cell entry of Dox and that the coupling strategy does not prevent Dox toxicity. In addition, coupling of Dox to CPPs permits to overcome the observed Dox resistance of MDA-MB 231 cells.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis and Purification of Doxorubicin–Peptide Conjugates. The MCa_{Abu} peptide was synthesized with an additional cysteine residue at its amino terminus by NeoMPS S.A. Similarly modified Tat peptide and Pen were synthesized by UFPeptides s.r.l. Dox (Alexis Biochemicals) was covalently bound to the cysteinylated peptides using the bifunctional cross-linker Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC, Pierce) according to the method described by Liang *et al.* (30) with a 3-fold increase in Dox concentration over the original description to allow better yield of coupling. Briefly, Dox.HCl was dissolved in DMSO and then diluted to 1 mg/ml in a 3 ml phosphate buffer solution, pH: 8.0. Triethylamine (40 μ l) and SMCC (270 μ l, 10 mg/ml) were added and left for 2 h at room temperature. The pH was adjusted to 5.5, before adding the peptide solution (15 mg/ml, 300 μ l) containing MCa_{Abu}, Pen or Tat and the mixture was incubated 2 h at room temperature for coupling. Because of its toxicity, all precautions for handling Dox were taken according to the Material Safety Data Sheet delivered by the manufacturer. Unreacted reagents were removed by chromatography on a 1 ml HiTrap Heparin HP (GE Healthcare) column operated with an ÄKTApurifier System, at a 1 ml/min flow rate. According to the manufacturer recommendations, the binding buffer was 10 mM Na₂HPO₄, pH=7.0. After ten volumes of washing, the column was eluted with a linear 0–2 M NaCl gradient in binding buffer. Simultaneous monitoring of absorbance at 215 (peptide bond) and 480 nm (intrinsic fluorescence of Dox) wavelengths allowed the detection of fractions containing Dox–CPPs complexes. Fractions were also analyzed by Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE) of peptides onto 16.5% Ready Gel® Tris–Tricine Gels from Biorad. For all experiments, the Dox–CPPs conjugates were used as such in the cell culture media.

Cells and Cell Culture. Culture media and supplements were purchased from InVitrogen. All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂ in a Hera cell 150 humidified incubator (Thermo). MDA-MB 231 cells from ATCC were grown in Leibovitz L15 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum and 10,000 U/ml streptomycin and penicillin. MCF7 (ATCC) were cultured in DMEM medium supplemented as above with additional bovine insulin (10 μ g/ml).

MTT Cell Viability Assay. MCF7, MDA-MB 231 cells were seeded into 96-well plates and treated with various concentrations of free or conjugated Dox for 24 h to 72 h. The number of living cells in culture was measured with a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction assay (CellQuanti-MTT™, Gentaur) according to the manufacturer specifications, slightly modified as described in Mabrouck *et al.* (12), except that the MTT reagent was incubated for 3 h at 37°C. Results were plotted as percent of cytotoxicity and dose-response curves were fitted

Maurocalcine as Good Doxorubicin Delivery Vector

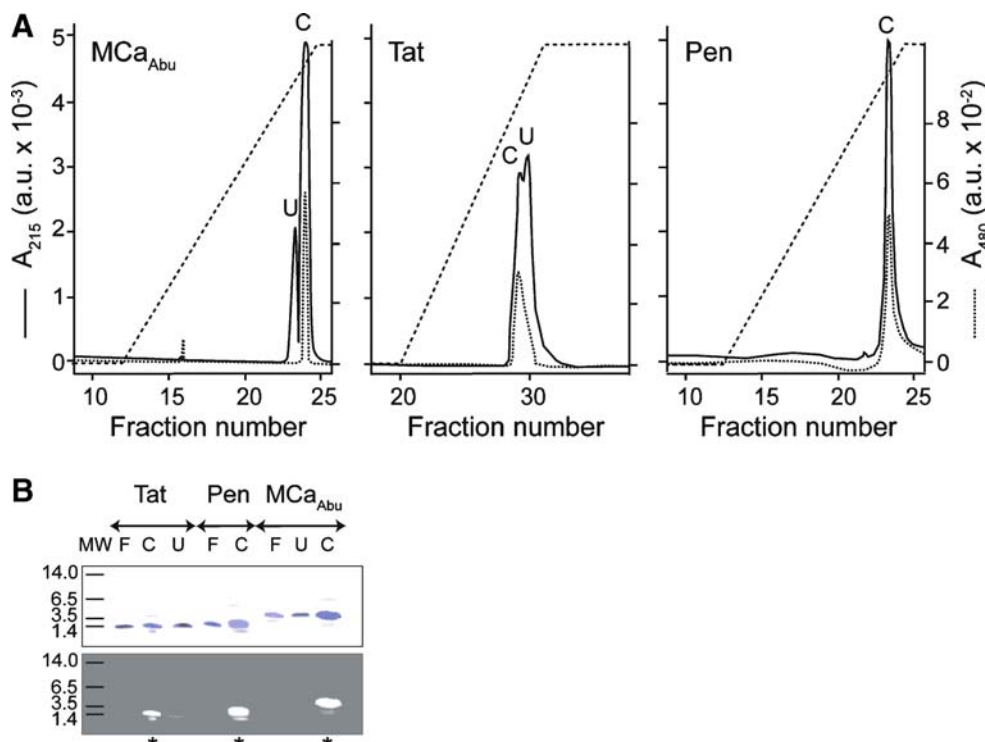


Fig. 2. Purification and biochemical characterization of the Dox–CPPs delivery complexes. **A** Heparin chromatography profiles of the three Dox–CPPs. Purification protocol is described in *Materials and Methods*. Absorbance at 215 nm (A_{215} , —) of the peptide bonds was monitored during the elution by the 0–2 M NaCl salt gradient (---) in parallel to the Dox absorbance at 480 nm (A_{480} ,). Peak fractions are denoted C and U. **B** SDS-PAGE analysis of peak fractions. Two microliters of C or U fractions were analyzed by electrophoresis on 16.5% Tris–tricine gels which were fixed, stained by G-250 Coomassie blue and visualized under white (upper panel) or ultraviolet light (lower panel). Control lanes, labelled F, were loaded with solutions of free peptides. * indicates the C fraction that contains the Dox–CPP conjugate and U lanes show pure uncoupled peptides, with however a slight contamination by Dox coupled peptide in case of Tat.

using SigmaPlot10 in order to determine the 50% effective concentration (EC_{50}).

Flow Cytometry. Innate fluorescence of Dox allowed us to use flow cytometry and live cell confocal microscopy to study penetration and localization of free or conjugated-Dox. MDA-MB 231 and MCF7 were cultured overnight in 24 well plates with or without free or CPP-conjugated drug and washed twice with Phosphate Buffered Saline (PBS) solution to remove extracellular drugs. Next, cells were treated with 1 mg/ml trypsin (Invitrogen) for 10 min at 37°C to remove remaining cell surface-bound drugs and detach cells from the dish surface. The cell suspension was centrifuged at 500 $\times g$ and resuspended in PBS. Flow cytometry analyses were performed on live cells by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) using a FACS-Calibur flow cytometer, BD Biosciences). Live cells were gated by forward/side scattering from a total of 10,000 events. Data obtained were analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences).

Confocal Microscopy. Cells were grown in 3.5 cm diameter cell culture dishes overnight and incubated with 1 or 5 μM Dox or Dox–CPPs for 2 or 24 h as specified in the *Results* section. Immediately after two PBS washes, 1 μM Syto 40 (Molecular Probes) was added for 20 min for nucleus staining. Cells were washed again with PBS and plasma membrane labeling was performed using 5 min incubation with 5 $\mu g/ml$ FITC-conjugated concanavalin A

(Con A, Sigma). After a last wash with PBS, cells were immediately analyzed by confocal laser scanning microscopy using a Leica TCS-SP2 operating system with a 20 $\times$ water immersion objective. FITC ($\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=520$ nm), Syto 40 ($\lambda_{ex}=405$ nm, $\lambda_{em}=450$ nm) and Dox ($\lambda_{ex}=470$ nm, $\lambda_{em}=590$ nm) were sequentially excited and each emitted fluorescence was collected in z-confocal planes of 10–15 nm steps. Pseudocolors used were: red for Dox, green for Con A and blue for Syto 40.

RESULTS

Characterization of Doxorubicin–CPP Complexes. MCa has recently been characterized as a CPP (11). Mutation analyses indicated that an analogue of MCa devoid of disulfide bridges, MCa_{Abu}, which lacks pharmacological activity, represents a promising CPP (15). As a proof of concept that MCa_{Abu} represents a useful vector for the delivery of the anti-tumoral drug Dox and has the ability to overcome drug resistance, MCa_{Abu} was chemically conjugated to Dox. Other CPPs, extensively used in numerous other applications, Tat and Pen, were also used for conjugation to Dox to compare the cell delivery properties and antitumoral activities of the resulting conjugates to those of Dox–MCa_{Abu}. All CPP sequences used in the manuscript are shown in

Fig. 1A. CPPs were synthesized with an extra amino terminal cysteine residue to allow a strategy of covalent coupling to the reactive amino group of Dox. To this end, the membrane-permeable heterobifunctional SMCC crosslinker was used to conjugate Dox to cysteinylated CPPs according to a procedure previously described by Liang *et al.* (30). A scheme of the expected Dox–CPPs conjugates is presented in Fig. 1B. The coupling conditions were set with a higher Dox concentration over CPP in order to favor completion of the conjugation reaction. All the conjugates were purified onto a heparin column as described in the [Materials and Methods](#) section (30) (Fig. 2). Unreacted reagents (free Dox and crosslinker) were eliminated at the washing step. Non-

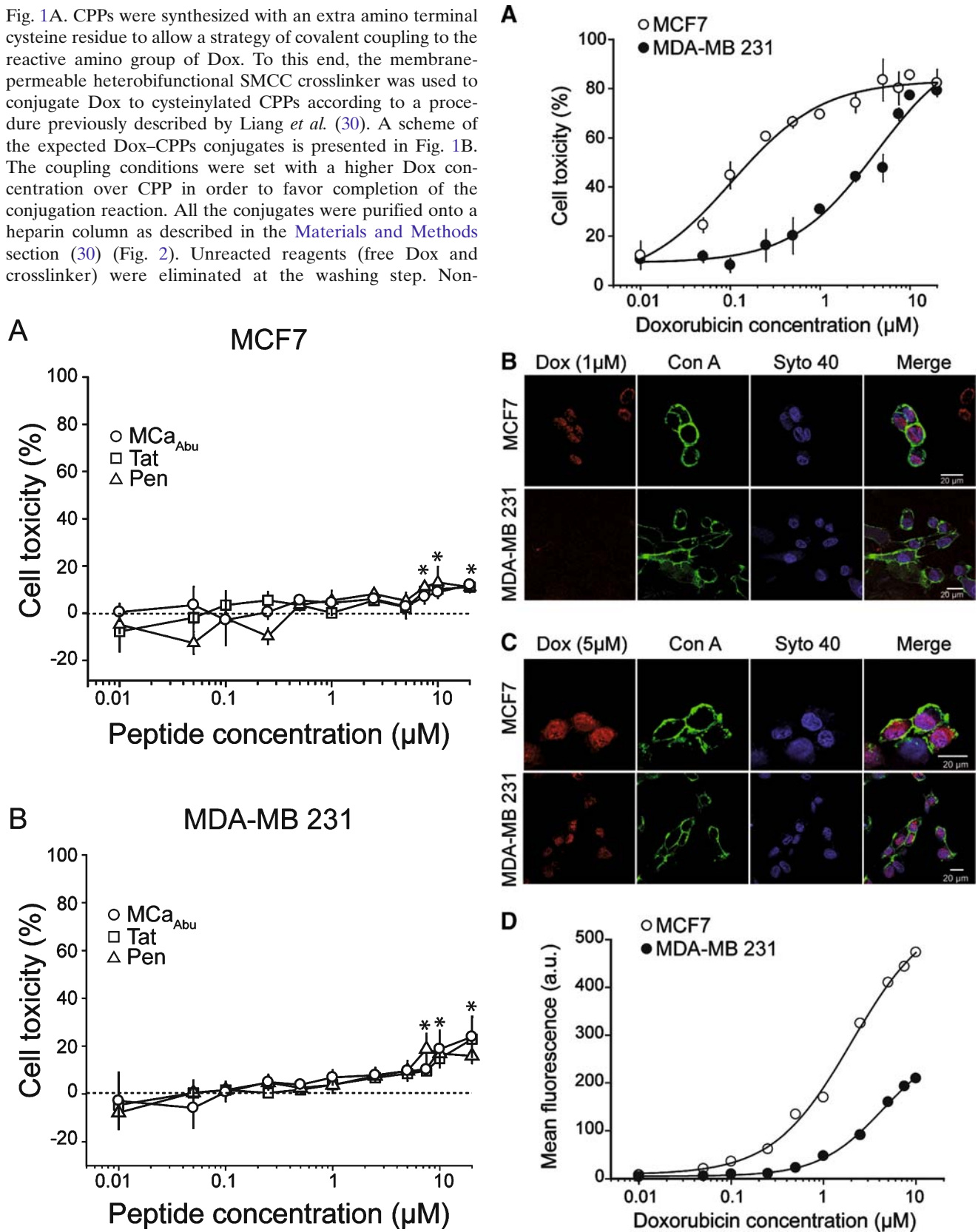


Fig. 3. Cell toxicity of MCA_{Abu}, Tat and Pen peptides on MCF7 and MDA-MB 231 cells. Peptides were applied at various concentrations on MCF7 (**A**) and MDA-MB 231 (**B**) cells for 24 h before performing the MTT assay, as described in [Materials and Methods](#). Asterisks denote significant deviation from baseline (mean value $\pm$ 3 SD values).

conjugated peptides and conjugates were separated by the NaCl linear concentration gradient according to their strength of ionic interaction with heparin (Fig. 2A). The peptide and Dox contents of the eluates were monitored by measuring

Maurocalcine as Good Doxorubicin Delivery Vector

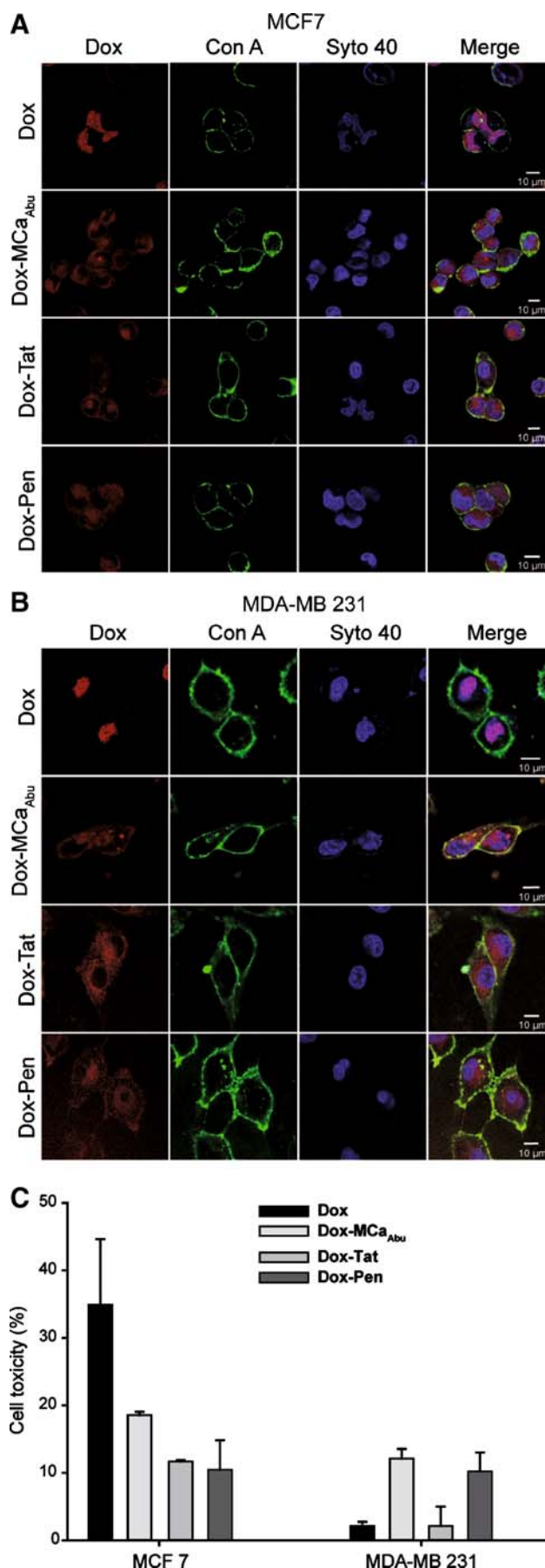
Fig. 4. Study of free Dox cytotoxicity and accumulation in MCF7 and MDA-MB 231 cell lines. **A** Dose-response curve evaluating Dox cytotoxicity by the MTT assay on MCF7 and MDA-MB 231 cells. Dox incubation time with cells was 24 h. Data were fitted with sigmoid functions and yield EC_{50} values of $0.10 \pm 0.02 \mu M$ (MCF7) or $2.7 \pm 1.4 \mu M$ (MDA-MB 231) and maximal toxicity of $83.4 \pm 5.0\%$ (MCF7) and $90.7 \pm 17.1\%$ (MDA-MB 231). **B** Representative confocal images of MCF7 (upper panels) and MDA-MB 231 cells (lower panels) showing Dox (red), Con A (green) and Syto 40 (blue) labelling, as well as merge pictures. Incubation time of 24 h with $1 \mu M$ Dox. **C** Same as in (B) except for a Dox concentration of $5 \mu M$. **D** Dose-response curve evaluating Dox accumulation in cells by FACS analysis of MCF7 and MDA-MB 231 cells. Dox incubation time with cells was 24 h. Data were fitted with sigmoid functions and yield EC_{50} values of $1.56 \pm 0.21 \mu M$ (MCF7) or $2.92 \pm 0.28 \mu M$ (MDA-MB 231) and maximal fluorescence values of 442 ± 20 a.u. (MCF7) and 200 ± 9 a.u. (MDA-MB 231).

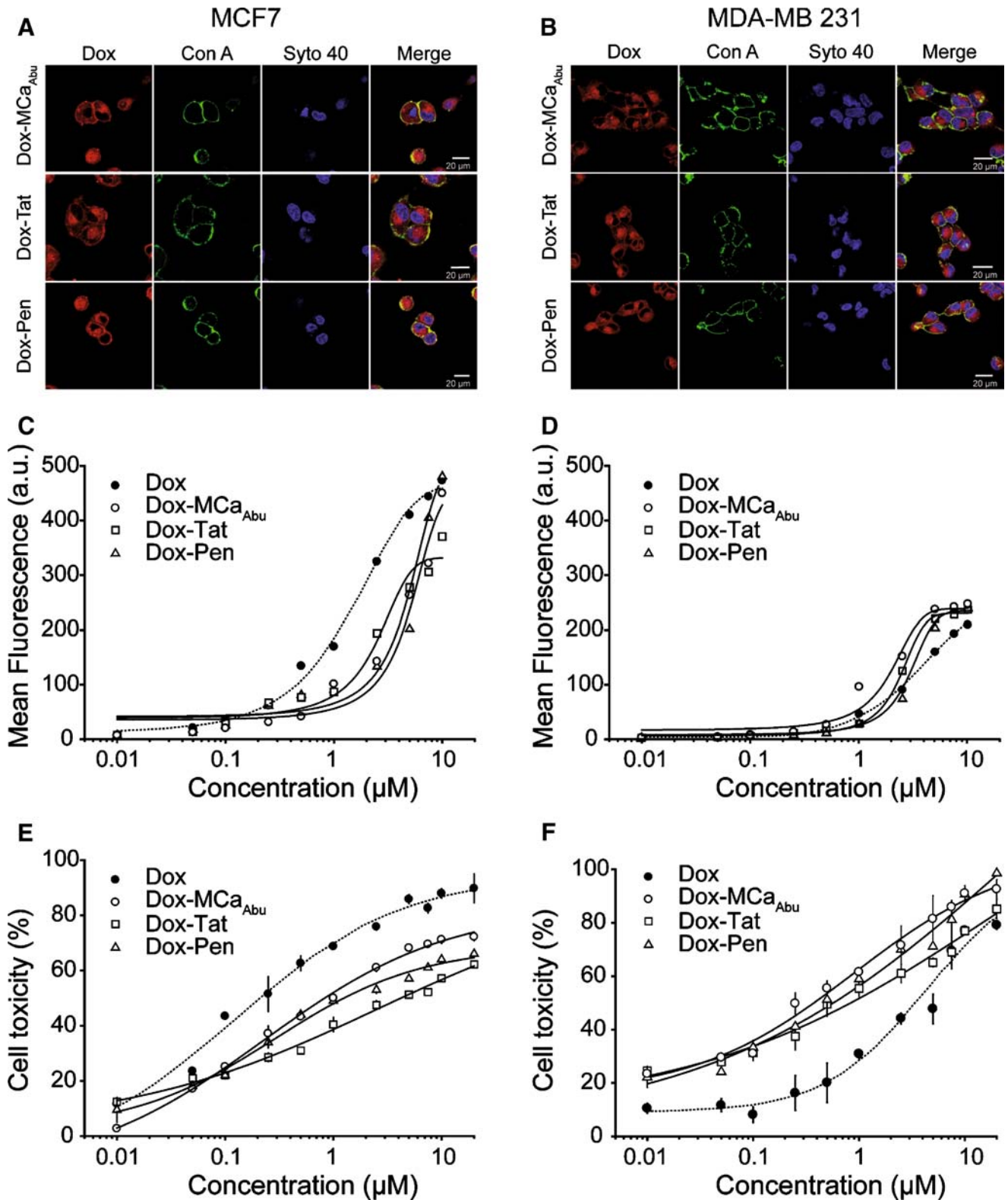
light absorbance at 215 nm wavelength for peptide bonds and at 480 nm for Dox. The conjugation reaction with Pen appeared to be complete since the eluate from the column emerges as a single peak. For Tat, roughly 50% of peptide was found to be bound to Dox, whereas coupling was higher in the case of MCa_{Abu} (75% according to peaks' surface). SDS-PAGE analysis of the peak fractions under white or UV light further assessed the efficiency of Dox conjugation to the peptides (Fig. 2B). Absence of differences in the apparent molecular sizes of the conjugates and free peptides indicates the lack of crosslinking between peptides. UV analysis of the fractions revealed the efficient conjugation of Dox to the various peptides (C fractions). The concentrations of Dox-CPP conjugates in the solutions were estimated by measuring absorption at 480 nm and plotting against a calibration curve with known concentrations of free Dox (Supplementary data).

Cell Toxicity of the CPP Vectors Used. Before examining the cell toxicity of the Dox-CPP conjugates, the cell toxicity of free peptides was investigated on both MCF7 and MDA-MB 231 cell lines (Fig. 3). As shown, incubation for 24 h of these cell lines with free MCa_{Abu} , Tat, or Pen up to a concentration of $5 \mu M$ produces no toxicity; the toxicity values observed were not significant from baseline and lower than 9%. However, above $5 \mu M$, all peptides produced a limited cell toxicity that ranges between 11 and 24%. Interestingly, there was no significant difference observed among the various CPPs indicating that they should all represent equipotent vectors for the delivery of Dox into these cell types.

Difference in Dox Toxicity Between MCF7 and MDA-MB 231 Cell Lines. In control experiments, the suitability of the two cell lines for the study of Dox resistance was validated by studying the cell toxicity of free Dox (Fig. 4). MCF7 and MDA-MB 231 cells were incubated for 24 h with increasing concentrations of free Dox whose toxicity was evaluated with an MTT cell viability assay. As expected,

Fig. 5. Subcellular localization and cytotoxicity of free or conjugated Dox in MCF7 and MDA-MB 231 cells after short time treatments. **A** Confocal images of living MCF7 cells comparing the distribution of Dox fluorescence for free Dox (upper panels) or CPP-conjugated Dox (three lower panels) after a 2 h incubation. Cells were incubated with a drug concentration of $5 \mu M$. **B** Same as in (A) but for MDA-MB 231 cells. **C** Cell toxicity of Dox and Dox-CPP conjugates evaluated with the MTT test in the same experimental conditions as in (A) and (B).





MCF7 and MDA-MB 231 cells show strong differences in the drug sensitivity (Fig. 4A). For MCF7 cells, cytotoxicity appeared at 20 nM Dox and increased to $83.5 \pm 8.5\%$ at 5 μM. In contrast, MDA-MB 231 cell death occurred at concentrations above 200 nM and efficient killing of $79.1 \pm$

1.5% was observed at 20 μM Dox. The EC_{50} for Dox toxicity is estimated at 0.1 ± 0.02 μM for MCF7, whereas it reaches 2.7 ± 1.4 μM for MDA-MB 231. MDA-MB 231 cells thus show a 27-fold relative resistance to Dox. To examine whether this difference in sensitivity to Dox is linked to a defect in Dox

Maurocalcine as Good Doxorubicin Delivery Vector

◀ **Fig. 6.** Localization, penetration and cytotoxicity of CPP-conjugated Dox in MCF7 and MDA-MB 231 cells after 24 h treatment. **A** Confocal images illustrating Dox–CPP distribution in MCF7 cells for each CPP after 24 h incubation at 5 μ M. **B** Same as in (A) but in MDA-MB 231 cells. **C** FACS analyses of dose-dependent cell penetration of Dox–CPPs after 24 h incubation with MCF7 cells. The dose-dependence of Dox is given in dashed line for comparison (data from Fig. 4D). Data were fitted by sigmoid functions yielding EC_{50} values of 4.6 ± 0.8 μ M (Dox–MCA_{Abu}), 2.3 ± 0.4 μ M (Dox–Tat) and 5.8 ± 0.9 μ M (Dox–Pen), and maximal fluorescence values of 451 ± 50 a.u. (Dox–MCA_{Abu}), 332 ± 20 a.u. (Dox–Tat) and 568 ± 77 a.u. (Dox–Pen). **D** Same as in (C) for MDA-MB 231 cells with EC_{50} values of 1.9 ± 0.2 μ M (Dox–MCA_{Abu}), 2.4 ± 0.1 μ M (Dox–Tat) and 3.3 ± 0.1 μ M (Dox–Pen), and maximal fluorescence values of 242 ± 12 a.u. (Dox–MCA_{Abu}), 231 ± 2 a.u. (Dox–Tat) and 240 ± 3 a.u. (Dox–Pen). **E** Cell cytotoxicity of Dox–CPPs determined by MTT assays after 24 h incubation of MCF7 cells with Dox conjugate. Data were fitted by sigmoid functions yielding EC_{50} values of 0.37 ± 0.09 μ M (Dox–MCA_{Abu}), 0.37 ± 0.11 μ M (Dox–Tat) and 0.25 ± 0.05 μ M (Dox–Pen), and maximal toxicity values of $67.6 \pm 3.4\%$ (Dox–MCA_{Abu}), $54.5 \pm 2.2\%$ (Dox–Tat) and $58.9 \pm 2.3\%$ (Dox–Pen). *Dashed line* represents cell toxicity of free Dox (data from Fig. 4A). **F** Same as in (E) for MDA-MB 231 cells with EC_{50} values of 0.32 ± 0.10 μ M (Dox–MCA_{Abu}), 0.25 ± 0.11 μ M (Dox–Tat) and 0.41 ± 0.15 μ M (Dox–Pen), and maximal toxicity values of $84.9 \pm 3.6\%$ (Dox–MCA_{Abu}), $71.8 \pm 3.3\%$ (Dox–Tat) and $83.2 \pm 4.4\%$ (Dox–Pen).

accumulation or distribution, the entry of Dox in both cell lines was investigated both by confocal microscopy and by FACS. Using an intermediate concentration of 1 μ M of Dox, incubated for 24 h as in the toxicity experiments, Dox was found to concentrate in the nuclei of MCF7 cells after analysis by confocal microscopy. In contrast, Dox is barely visible at this concentration in MDA-MB 231 cells (Fig. 4B). However, when using a higher concentration of Dox, 5 μ M, at which both cell lines undergo cell death, Dox was not only visible in MCF7 cells, but also in the nuclei of MDA-MB 231 cells (Fig. 4C). In both cell lines, and at toxic concentration, Dox appears mainly in the nuclei of cells, but some fluorescence is also detected in cytoplasmic patches in some cells. One should keep in mind that this distribution is observed on mainly dying cells and requires confirmation at times of Dox incubation where no toxicity is observed (see Fig. 5). In any case, these data indicate that higher concentrations of Dox are required to detect its presence in MDA-MB 231 cells, a property that may be at the basis of part of Dox resistance of this cell line. To confirm that Dox accumulation in MDA-MB 231 cells is limited compared to the one in MCF7 cells, a quantitative study was initiated by FACS. As shown in Fig. 4D, the mean fluorescence of Dox measured at 1 μ M after 24 h of incubation is negligible in MDA-MB 231 cells, whereas it represents 35.8% of the maximal achievable fluorescence value in MCF7 cells. In addition, the maximal achievable Dox fluorescence value is 2.2-fold higher in MCF7 cells than in MDA-MB 231 cells (as measured at 10 μ M). These data indicate that MCF7 cells more readily accumulate intracellular Dox than MDA-MB 231 cells, and that this accumulation occurs at slightly lower concentrations (EC_{50} value of 1.5 ± 0.2 μ M for MCF7 versus 2.9 ± 0.3 μ M for MDA-MB 231 cells). The EC_{50} values of Dox accumulation into cells, measured by FACS, should not be compared to the EC_{50} values determined for toxicity. There is possibly a

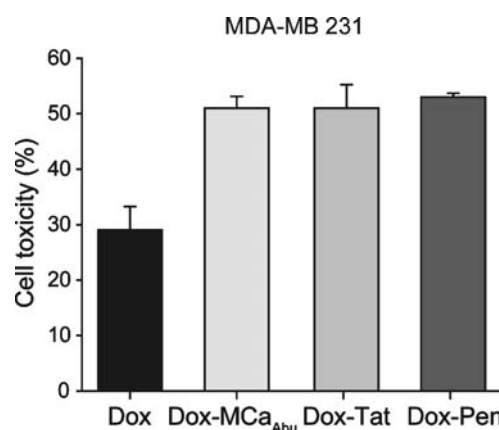


Fig. 7. Long-term cytotoxicity of 10 nM free Dox and Dox–CPP conjugates in MDA-MB 231 cells. MTT assay for MDA-MB 231 cells after 72 h of incubation with 10 nM Dox or Dox–CPPs.

threshold of toxicity induction by Dox that is lower than the threshold of fluorescence detection by FACS. However, the combined information indicates that these two cell lines are adequate to study the effects of Dox–CPP on drug resistance of both cell lines.

Comparative Cell Distribution and Cytotoxicity Between Dox and Dox–CPPs After Short Term Cell Exposure. The effect of Dox conjugation on cell distribution and cytotoxicity was evaluated on short term exposure (2 h). A concentration of 5 μ M was chosen to ensure Dox fluorescence detection by confocal microscopy (Fig. 5). As shown, MCF7 or MDA-MB 231 cells exhibit similar patterns of cell distribution of Dox or Dox–CPP conjugates. In both cell lines, there was a marked difference in cell distribution of Dox–CPP comparatively to free drug. As observed in other conditions (Fig. 4), Dox concentrates mainly in the nuclei in both cell lines (Fig. 5A, B). In sharp contrast, Dox–CPP conjugates were found diffuse into the cytoplasm of both cell lines (Fig. 5A,B). Obviously, conjugation of Dox to CPPs prevented the accumulation of Dox into the nuclei of the cells. However, since Dox fluorescence is intrinsically low, we cannot exclude that a fraction of Dox–CPP reaches the nucleus but remains undetected. Next, the cytotoxic effects of 5 μ M Dox or Dox–CPPs on these two cell lines were investigated using the MTT test after this 2 h of drug incubation (Fig. 5C). Interestingly, 2 h of incubation with 5 μ M Dox MCF7 cells is sufficient to induce $34.9 \pm 9.7\%$ of MCF7 cell killing (Fig. 5C). This cytotoxicity value is decreased to 18.6 ± 0.5 , 11.7 ± 0.2 and $10.4 \pm 4.4\%$ when using Dox conjugated to MCA_{Abu}, Tat or Pen, respectively, instead of Dox. This reduced efficacy may be related to the change in Dox localization upon conjugation to CPPs as the primary mode of Dox action is related to nuclear functions (31). In contrast however, a 2 h incubation of MDA-MB 231 cells with 5 μ M Dox produces almost no cell toxicity ($2.1 \pm 0.6\%$) further confirming the cell resistance to Dox. This toxicity value was significantly enhanced to $12.1 \pm 1.4\%$ for Dox–MCA_{Abu} conjugate. A similar enhancement was noticed for Dox–Pen conjugate ($10.2 \pm 2.8\%$). No significant change was observed when using the Dox–Tat conjugate. These data seem to indicate that using CPP conjugates of Dox can reverse the cell resistance to Dox. This may possibly be due to a reduced cell

extrusion of Dox when conjugated to CPP (32). Of note, the levels of the observed Dox–CPPs toxicities are quite low and at a concentration where some cell toxicity of CPPs alone was observed for longer exposure times (Fig. 3). In order to be more conclusive, another set of experiments were designed with longer exposure times.

Long-Term Exposure to Dox–CPP of MDA-MB 231 Cells Overcomes Dox-Resistance. Exposure of cells to 5 μ M Dox–CPPs for 24 h yields strong Dox fluorescence in the cytoplasm of both cell types (Fig. 6A,B). This pattern of distribution is similar to that observed for 2 h incubation (Fig. 5). However, the greater apparent intensities in fluorescence seem to indicate that longer exposure times to the conjugated drug allow a greater accumulation in cells. A quantification by FACS analysis of Dox fluorescence of the Dox–CPP conjugates indicate that both cell lines accumulate significant amounts of Dox–CPP with a similar concentration threshold (around 500 nM) with a saturation close to 10 μ M (Fig. 6C,D). In MCF7 cells, this accumulation occurs at higher concentration for Dox–CPPs than for free Dox indicating CPP conjugation does not represent an advantage in this cell line (Fig. 6C). In contrast, accumulation of Dox–CPPs is slightly improved over free Dox accumulation in MDA-MB 231 cells, suggesting that Dox conjugation could be interesting for this cell line (Fig. 6D). Next, dose-responses curves of cytotoxicity of Dox–CPP conjugates were investigated. As suggested by the FACS data, Dox–CPP conjugates turned out to be less efficient to promote cell death of MCF7 cells (Fig. 6E). Dox–MCA_{Abu} was the most efficient Dox–CPP conjugate leading to a maximal cell toxicity of $67.6 \pm 3.4\%$ of cell death and with an EC_{50} of $0.37 \pm 0.09 \mu$ M. Other Dox–CPPs behaved similarly to Dox–MCA_{Abu} but with lower toxicities (on average 54% of maximal toxicity for Dox–Tat). In comparison, the EC_{50} value for free Dox was $0.1 \pm 0.02 \mu$ M and the maximal cell toxicity was $83.5 \pm 8.5\%$ (Fig. 4A). These data indicate that for MCF7 cells, conjugation of Dox to CPPs significantly reduces the efficacy of Dox both in terms of effective concentration and maximal effect. In contrast, in MDA-MB 231 cells, Dox–CPP conjugates were more toxic than free Dox (Fig. 6F). Dox–MCA_{Abu} induced cell death with an EC_{50} value of $0.32 \pm 0.10 \mu$ M and with a maximal effect of $84.9 \pm 3.6\%$. In comparison, Dox was far less efficient with an EC_{50} of $2.7 \pm 1.4 \mu$ M and a maximal effect of $79.1 \pm 1.5\%$ (Fig. 4B). Thus, in conclusion, conjugation of Dox to CPPs produces similar dose-responses for toxicity in MCF7 and MDA-MB 231 cells but achieves better efficiency in MDA-MB 231 cells than in MCF7. The observed improvement in cytotoxicity observed for Dox–CPP conjugates over free Dox in MDA-MB 231 cells clearly indicates that this strategy for Dox delivery and efficacy is an advantage in this cell line. A striking observation made upon analysis of the cytotoxicity of Dox–CPPs is that the conjugates appear to possess a cytotoxic effect even at very low concentrations (10 nM). This was particularly evident for MDA-MB 231 cells (Fig. 6F). This observation suggested that very long exposures at minimal Dox–CPP concentration may represent a viable strategy for inducing cell death.

Cytotoxic Effects of Long-Term Exposures of MDA-MB 231 Cells to Low Concentrations of Free Dox and Dox–CPPs. Long-term exposures of MDA-MB 231 cells to 10 nM Dox or one of the three Dox–CPP conjugate was investigated

with the MTT test (Fig. 7). As shown, 72 h incubation with 10 nM free Dox produces $29.0 \pm 4.2\%$ of cell toxicity for MDA-MB 231 cells, compared to $10.5 \pm 1.9\%$ after 24 h (see Fig. 6F). Again, exposure of MDA-MB 231 cells to Dox–CPP conjugates turned out to induce more efficient toxic effects than free Dox and kills an average of 50% MDA-MB 231 cells after 72 h (Fig. 7). These data show also that long-term exposure to low concentrations of a Dox–MCA_{Abu} conjugate is as efficient as the long-term exposure to Dox–Tat and Pen conjugates to induce MDA-MB 231 cell death.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate that an analogue of MCA acts as a potent vector for the cell delivery of Dox into Dox-resistant and Dox-sensitive cell lines. Covalent coupling of Dox to several CPPs is reported, and their use in overcoming Dox-resistance in MDA-MB 231 cells evaluated. The data indicate that three CPPs (MCA analogue, Tat, and Pen) are equipotent both in terms of concentration-dependence and maximal efficacy to induce cell death in both cell lines. Various aspects of the data gathered within this report are discussed hereunder.

To perform this study we have used two cell lines that differ in their sensitivity to Dox. Reasons for a difference in Dox sensitivity of cancer cell lines are multiple. The most studied mechanism concerns the heterogeneous level of multidrug resistance that is mediated by ABC-transporters such as p-glycoprotein (P-gp), multidrug resistance related protein 1 (MRP1) or breast cancer resistance protein (BCRP). These proteins favour the efflux of chemotherapeutic agents (33,34). Less-well studied mechanisms include (35): (a) subcellular localization of the drug (36), (b) detoxification reactions that involve glutathione and glutathione-dependent enzymes such as glutathione S-transferase, glutathione peroxidase or reductase (37), (c) alteration in topoisomerase II activity, (d) increasing DNA repair to drug-induced damage, and (e) disruption in apoptotic signalling pathways. In our experiments, MDA-MB 231 cells had a lower tendency to accumulate free Dox than MCF7 cells suggesting that greater efflux might be at the basis of the differences in Dox sensitivity of both cell lines. Our data indicate that coupling Dox to CPPs significantly alters the sensitivity of both cell lines to Dox. MCF7 cells become less sensitive, whereas MDA-MB 231 cells acquire a greater sensitivity to Dox. Interestingly, both cell types become almost equally sensitive to Dox when the drug is coupled to any one of the three CPPs used herein. These data may indicate that coupling of Dox to CPPs may alter the balance between the multiple resistance pathways. One evident change was the subcellular localization of the drug which shifted from a nuclear distribution to a predominant cytoplasmic one. It should be mentioned however that such a shift in cellular distribution is presumably not expected to increase cell sensitivity to Dox since the main target of cytotoxic action of Dox is thought to be the nuclear topoisomerase II. Since Dox fluorescence is visible only at high concentration by confocal microscopy, we suggest that CPPs could also deliver Dox to the nucleus, but at a lower not detectable concentration. Indeed, we observed that CPPs also

Maurocalcine as Good Doxorubicin Delivery Vector

overcome MDA-MB 231 Dox resistance at 10 nM, a concentration at which free Dox is not detectable in cells.

CPPs are cell penetration peptides that tend to accumulate into cells because of their basic properties. Besides they possess DNA binding abilities (38) that may come as a synergistic factor for DNA targeting. Our data indicate that cell distribution of Dox is not a reliable indicator of its toxicity effect. Other possible reasons for the greater efficacy of Dox coupled to CPPs in MDA-MB 231 cells may include alterations in efflux pathways or in detoxification reactions. We favour a less efficient efflux of the drug that remains trapped into cells due to its coupling to CPP. CPPs thus appear as useful vectors not only for their cell penetration efficacies but also to counteract efflux mechanisms. Definitive proof that alteration of Dox efflux pathways is responsible for increased Dox sensitivity will require additional experiments.

The results obtained herein underline the value of CPPs as delivery vectors for bioactive molecules. Generally, CPPs are used for their ability to carry across the cell membrane an important number of impermeable compounds including drugs, peptides, proteins such as antibodies, oligonucleotides, peptide nucleic acids, DNA or some inorganic compounds (for example nanoparticles) (6,8). For these compounds, the use of CPPs has evident advantages since they overcome the limited availability of these products inside cells. This technological advantage has permitted the development of numerous applications of basic, therapeutic, diagnostic, imaging or technical importance (6,8). The use of CPPs to promote the cell entry of compounds that are already membrane permeable (such as Dox) is obviously less evident. As a matter of fact, their use in this case is seldom reported. However, our data illustrate the benefit of using CPPs for altering the stability, efficacy and cell compartment targeting of the drug. Improvements could be brought to this strategy by grafting additional signal sequences to CPPs for their targeting to defined cell compartments. Enhanced nuclear targeting and enhanced efficacy of a Dox-CPP complex may be obtained by adding a Nuclear Localization Sequence (NLS) to the peptide sequence. This chimera strategy may be extended to cell targeting sequence for *in vivo* application where Dox-CPP delivery could be directed to tumors rather than being diffusely taken up by the entire organism. Such an application has successfully been designed for Dox alone coupled to a cyclic pentapeptide (39).

In this study, we have further validated the use of MCA as cargo delivery vector. A biotinylated derivative of MCA has been used for the cell entry of streptavidin in a various number of experimental conditions (11,40). Since then, an analogue of MCA, devoid of disulfide bridges, MCA_{Abu}, has been synthesized and shown to be pharmacologically inert on RyR1 but efficient for the cell delivery of cargoes⁶. Because this analogue was shown to be less efficient than wild-type MCA for cell delivery of streptavidin, one could suggest that better analogues than MCA_{Abu} may still be designed and tested (12,15). Nevertheless, the data obtained indicate that MCA_{Abu} is no less efficient than Tat or Pen for the intracellular delivery of Dox. Similar concentration-dependence for Dox delivery was obtained by FACS and equivalent cell toxicity on both MCF7 and MDA-MB 231 cells were observed. One important observation made herein during this comparative analysis of CPPs is that Dox-CPP is delivered diffusely into the

cytoplasm regardless of the CPP sequence used. This is an important indication that all three CPP complexes use similar routes of cell entry in both cell lines. This observed cytoplasmic distribution is in sharp contrast to the punctuate distribution of streptavidin when MCA is used as vector. Combined, these observations indicate that the nature and/or size of the cargo plays an important role in the mechanism of cell entry; Dox-CPP entering presumably via translocation across the lipid bilayer. Alternatively, we cannot exclude that Dox-CPP enters cells by macropinocytosis, but an additional step consisting of endosomal escape, accumulates into the cytoplasm after.

In conclusion, we have demonstrated that MCA_{Abu} is as effective as other CPPs for the efficient delivery of Dox into cells. This vector-based delivery can overcome the reduced Dox sensitivity observed in MDA-MB 231 cells over MCF7 cells. Future research avenues will be developed by designing tumor-targeting Dox-CPPs and/or specific cell compartmentalized Dox-CPP analogues with improved cell toxicities. The efficacy of Dox-CPP will be evaluated in *in vivo* tumor models with a special emphasis to low concentrations of Dox-CPPs which were shown to be efficient *in vitro* during long-term exposures. Other applications are envisioned such as evaluating *in vitro* and *in vivo* the efficacy of drugs grafted to MCA_{Abu} and that possess different cellular targets (41-44).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Inserm and a grant from the Life Sciences Division innovation program of the Commissariat à l'Energie Atomique. SA acknowledges the support of the D l gation Générale de la Recherche Scientifique et Technique (Tunisia) and the University of Monastir and University Joseph Fourier for their joint PhD training program.

REFERENCES

1. J. Howl, I. D. Nicholl, and S. Jones. The many futures for cell-penetrating peptides: how soon is now. *Biochem. Soc. Trans.* **35**:767-769 (2007).
2. F. Perez, A. Joliot, E. Bloch-Gallego, A. Zahraoui, A. Triller, and A. Prochiantz. Antennapedia homeobox as a signal for the cellular internalization and nuclear addressing of a small exogenous peptide. *J. Cell Sci.* **102**(Pt 4):717-722 (1992).
3. A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and A. Prochiantz. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* **88**:1864-1868 (1991).
4. D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **269**:10444-10450 (1994).
5. D. Derossi, G. Chassaing, and A. Prochiantz. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol.* **8**:84-87 (1998).
6. M. Mae, and U. Langel. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**:509-514 (2006).
7. M. Zorko, and U. Langel. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**:529-545 (2005).
8. J. Temsamani, and P. Vidal. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov. Today.* **9**:1012-1019 (2004).
9. Z. Fajloun, R. Kharrat, L. Chen, C. Lecomte, E. Di Luccio, D. Bichet, M. El Ayeb, H. Rochat, P.D. Allen, I.N. Pessah, M. De Waard, and J.M. Sabatier. Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett.* **469**:179-185 (2000).

10. E. Esteve, S. Smida-Rezgui, S. Sarkozi, C. Szegedi, I. Regaya, L. Chen, X. Altafaj, H. Roachat, P. Allen, I. N. Pessah, I. Marty, J. M. Sabatier, I. Jona, M. De Waard, and M. Ronjat. Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca^{2+} release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**:37822–37831 (2003).
11. E. Esteve, K. Mabrouk, A. Dupuis, S. Smida-Rezgui, X. Altafaj, D. Grunwald, J. C. Platel, N. Andreotti, I. Marty, J. M. Sabatier, M. Ronjat, and M. De Waard. Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **280**:12833–12839 (2005).
12. K. Mabrouk, N. Ram, S. Boisseau, F. Strappazon, A. Reham, R. Sadoul, H. Darbon, M. Ronjat, and M. De Waard. Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**:2528–2540 (2007).
13. A. Mosbah, R. Kharrat, Z. Fajloun, J. G. Renisio, E. Blanc, J. M. Sabatier, M. El Ayebe, and H. Darbon. A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins.* **40**:436–442 (2000).
14. G. Drinand, and J. Temsamani. Translocation of protegrin I through phospholipid membranes: role of peptide folding. *Biochim. Biophys. Acta.* **1559**:160–170 (2002).
15. N. Ram, N. Weiss, I. Texier-Nogues, S. Aroui, N. Andreotti, F. Pirollet, M. Ronjat, J. M. Sabatier, H. Darbon, V. Jacquemond, and M. De Waard. Design of a disulfide-less, pharmacologically-inert and chemically-competent analog of maurocalcine for the efficient transport of impermeant compounds into cells. *J. Biol. Chem.* **283**:27048–27056 (2008).
16. G. Bonadonna, M. Zambetti, A. Moliterni, L. Gianni, and P. Valagussa. Clinical relevance of different sequencing of doxorubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and Fluorouracil in operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**:1614–1620 (2004).
17. M. Colozza, E. de Azambuja, F. Cardoso, C. Bernard, and M. J. Piccart. Breast cancer: achievements in adjuvant systemic therapies in the pre-genomic era. *Oncologist.* **11**:111–125 (2006).
18. H. L. Wong, R. Bendayan, A. M. Rauth, H. Y. Xue, K. Babakhanian, and X. Y. Wu. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **317**:1372–1381 (2006).
19. G. Szakacs, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe, and M. M. Gottesman. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**:219–234 (2006).
20. L. Smith, M. B. Watson, S. L. O'Kane, P. J. Drew, M. J. Lind, and L. Cawwell. The analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol. Cancer Ther.* **5**:2115–2120 (2006).
21. J. C. Mallory, G. Crudden, A. Oliva, C. Saunders, A. Stromberg, and R. J. Craven. A novel group of genes regulates susceptibility to antineoplastic drugs in highly tumorigenic breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **68**:1747–1756 (2005).
22. M. de la Torre, X. Y. Hao, R. Larsson, P. Nygren, T. Tsuruo, B. Mannervik, and J. Bergh. Characterization of four doxorubicin adapted human breast cancer cell lines with respect to chemotherapeutic drug sensitivity, drug resistance associated membrane proteins and glutathione transferases. *Anticancer Res.* **13**:1425–1430 (1993).
23. D. S. Kim, S. S. Park, B. H. Nam, I. H. Kim, and S. Y. Kim. Reversal of drug resistance in breast cancer cells by transglutaminase 2 inhibition and nuclear factor-kappaB inactivation. *Cancer Res.* **66**:10936–10943 (2006).
24. Y. Fang, R. Sullivan, and C. H. Graham. Confluence-dependent resistance to doxorubicin in human MDA-MB-231 breast carcinoma cells requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Exp. Cell Res.* **313**:867–877 (2007).
25. M. Hruby, C. Konak, and K. Ulbrich. Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin. *J. Control Release.* **103**:137–148 (2005).
26. F. Tewes, E. Munier, B. Antoon, L. Ngaboni Okassa, S. Cohen-Jonathan, H. Marchais, L. Douziech-Eyrolles, M. Souce, P. Dubois, and I. Chourpa. Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**:488–492 (2007).
27. U. Massing, and S. Fuxius. Liposomal formulations of anticancer drugs: selectivity and effectiveness. *Drug Resist. Updat.* **3**:171–177 (2000).
28. G. Di Stefano, M. Lanza, F. Kratz, L. Merina, and L. Fiume. A novel method for coupling doxorubicin to lactosaminated human albumin by an acid sensitive hydrazone bond: synthesis, characterization and preliminary biological properties of the conjugate. *Eur. J. Pharm. Sci.* **23**:393–397 (2004).
29. G. Di Stefano, L. Fiume, M. Domenicali, C. Busi, P. Chieco, F. Kratz, M. Lanza, A. Mattioli, M. Pariali, and M. Bernardi. Doxorubicin coupled to lactosaminated albumin: effects on rats with liver fibrosis and cirrhosis. *Dig. Liver Dis.* **38**:404–408 (2006).
30. J. F. Liang, and V. C. Yang. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**:5071–5075 (2005).
31. K. R. Hande. Clinical applications of anticancer drugs targeted to topoisomerase II. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**:173–184 (1998).
32. F. Shen, S. Chu, A. K. Bence, B. Bailey, X. Xue, P. A. Erickson, M. H. Montrose, W. T. Beck, and L. C. Erickson. Quantitation of doxorubicin uptake, efflux, and modulation of multidrug resistance (MDR) in MDR human cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **324**:95–102 (2008).
33. S. Modok, H. R. Mellor, and R. Callaghan. Modulation of multidrug resistance efflux pump activity to overcome chemoresistance in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**:350–354 (2006).
34. F. J. Sharom. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics.* **9**:105–127 (2008).
35. D. Nielsen, C. Maare, and T. Skovsgaard. Cellular resistance to anthracyclines. *Gen. Pharmacol.* **27**:251–255 (1996).
36. G. J. Schuurhuis, T. H. van Heijningen, A. Cervantes, H. M. Pinedo, J. H. de Lange, H. G. Keizer, H. J. Broxterman, J. P. Baak, and J. Lankelma. Changes in subcellular doxorubicin distribution and cellular accumulation alone can largely account for doxorubicin resistance in SW-1573 lung cancer and MCF-7 breast cancer multidrug resistant tumour cells. *Br. J. Cancer.* **68**:898–908 (1993).
37. L. I. McLellan, and C. R. Wolf. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat.* **2**:153–164 (1999).
38. A. Ziegler, and J. Seelig. High affinity of the cell-penetrating peptide HIV-1 Tat-PTD for DNA. *Biochemistry.* **46**:8138–8145 (2007).
39. Y. van Hensbergen, H. J. Broxterman, Y. W. Elderkamp, J. Lankelma, J. C. Beers, M. Heijn, E. Boven, C. Hoekman, and H. M. Pinedo. A doxorubicin-CNGRC-peptide conjugate with prodrug properties. *Biochem. Pharmacol.* **63**:897–908 (2002).
40. S. Boisseau, K. Mabrouk, N. Ram, N. Garmy, V. Collin, A. Tadmouri, M. Mikati, J. M. Sabatier, M. Ronjat, J. Fantini, and M. De Waard. Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**:308–319 (2006).
41. G. A. Gusarova, I. C. Wang, M. L. Major, V. V. Kalinichenko, T. Ackerson, V. Petrovic, and R. H. Costa. A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment. *J. Clin. Invest.* **117**:99–111 (2007).
42. Y. Kim, A. M. Lillo, S. C. Steiniger, Y. Liu, C. Ballatore, A. Anichini, R. Mortarini, G. F. Kaufmann, B. Zhou, B. Felding-Habermann, and K. D. Janda. Targeting heat shock proteins on cancer cells: selection, characterization, and cell-penetrating properties of a peptidic GRP78 ligand. *Biochemistry.* **45**:9434–9444 (2006).
43. S. E. Perea, O. Reyes, Y. Puchades, O. Mendoza, N. S. Vispo, I. Torrens, A. Santos, R. Silva, B. Acevedo, E. Lopez, V. Falcon, and D. F. Alonso. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.* **64**:7127–7129 (2004).
44. M. Hirose, M. Takatori, Y. Kuroda, M. Abe, E. Murata, T. Isada, K. Ueda, K. Shigemi, M. Shibasaki, F. Shimizu, M. Hirata, K. Fukazawa, M. Sakaguchi, K. Kageyama, and Y. Tanaka. Effect of synthetic cell-penetrating peptides on TrkA activity in PC12 cells. *J. Pharmacol. Sci.* **106**:107–113 (2008).

Nous nous sommes intéressés à développer l'activité vectrice du nouvel analogue MCA_{Abu} pour la délivrance de la Dox afin de mettre en valeur l'utilité thérapeutique de ce vecteur et nous avons également utilisé les peptides Tat et Pen dans notre étude dans le but de comparer leur activités à celle de la MCA_{Abu}.

Avant de procéder au couplage, l'analyse de la cytotoxicité des trois peptides sur les cellules MDA-MB 231 et les cellules MCF7 a été réalisée. Nos résultats montrent bien que ces CPPs ne sont pas cytotoxiques et qu'ils devraient tous représenter de puissants vecteurs pour l'entrée de la Dox dans ces types cellulaires.

Par ailleurs, nous avons confirmé que les modèles cellulaires MCF7 et MDA-MB 231 utilisés présentent une sensibilité différente à la Dox comme le montrent les travaux réalisés par Kim et *al.*, (2006). En effet les cellules MDA-MB 231 montrent bien une résistance relative à la Dox 27 fois supérieure à celle des cellules MCF7. Cette différence a été attribuée à la faible accumulation et à la distribution de la drogue dans les cellules MDA-MB 231, surtout aux faibles concentrations de Dox. Ceci suggère qu'un efflux membranaire est à la base de cette différence de sensibilité à la Dox entre les deux lignées.

Dans le but d'augmenter la pénétration de la Dox dans les cellules MDA-MB 231, nous avons opté pour un couplage covalent de la drogue à la MCA_{Abu} ainsi qu'à la Tat et à la Pen. Une étude comparative a été réalisée en parallèle pour étudier l'effet des complexes formés sur la cytotoxicité, la bio-distribution et la pénétration dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.

L'internalisation cellulaire des trois complexes Dox-MCA_{Abu}, Dox-Tat et Dox-Pen a été analysée par microscopie confocale et par cytométrie en flux. Nos résultats ont montré une localisation cytoplasmique des trois peptides couplés et ce dans les deux types cellulaires. La cytométrie en flux a mis en évidence une pénétration cellulaire plus importante des Dox-CPPs dans les cellules MDA-MB 231 par rapport aux cellules MCF7. Le test de cytotoxicité a révélé que les conjugués ont aussi une cytotoxicité dépendante du taux de leur internalisation et ce d'une manière équipotente.

D'une manière très intéressante, nos résultats montrent que le couplage de la Dox à chacun des trois peptides modifie significativement la sensibilité des deux lignées à la drogue. Ainsi, les cellules MDA-MB 231 sont devenues plus sensibles à la Dox. Ceci peut être expliqué par le fait que le couplage de la Dox aux CPPs pourrait altérer la balance entre de multiples mécanismes de résistance. D'une manière surprenante, la plus forte toxicité de la Dox conjuguée s'accompagne d'un changement de la distribution cellulaire de la Dox (du noyau vers le cytoplasme). Vraisemblablement, un tel changement de distribution ne peut pas être corrélé à l'effet cytotoxique plus important observé avec les Dox-CPPs étant donné que la cible de la Dox est la Topoisomérase II nucléaire. Ceci nous laisse penser qu'il est probable que les CPPs ont pu délivrer la Dox au noyau mais à une concentration non discernable par microscopie et que la distribution intracellulaire observée n'est pas un indicateur fiable de l'effet cytotoxique de la drogue. Il est aussi possible que la plus grande efficacité de la Dox couplée observée sur les cellules MDA-MB 231 pourrait être due à une diminution de l'efflux membranaire ou à des réactions de détoxification. De ce fait il est probable que le couplage de la drogue diminue d'une manière ou d'une autre son refoulement à l'extérieure de la cellule.

L'ensemble de ces données montre clairement que l'analogue utilisé, la MCa_{Abu} représente un puissant vecteur pour l'internalisation de l'agent antitumoral, la Dox, d'autant plus qu'il est capable de contrecarrer également des mécanismes d'efflux et surmonter la résistance des cellules MDA-MB 231 à cette drogue. Cet effet a été également observé avec les peptides Tat et Pen. Nos résultats mettent aussi en valeur l'utilisation de ces CPPs dans l'internalisation des composés perméables, en l'occurrence, la Dox.

CHAPITRE III

Etude du type de mort induite par la Dox et les conjugués Dox-CPPs dans les cellules MDA-MB 231

Dans le but de mieux cerner les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activité cytotoxique de la Dox et des Dox-CPPs, nous nous sommes intéressés à l'étude du type de mort induite par nos composés dans le modèle cellulaire MDA-MB 231. Le choix de cette lignée découle du fait que la conjugaison de la Dox aux CPPs rend ces cellules plus sensibles à la drogue. Il nous semble donc important de mieux comprendre les mécanismes qui seraient à l'origine de cette déviation de sensibilité.

Il existe actuellement différentes voies par lesquelles les cellules meurent dont deux sont principalement étudiées. La voie de la mort cellulaire accidentelle ou nécrose et la voie de la mort cellulaire programmée ou apoptose qui est la voie la plus souvent décrite. En effet, la plupart des agents antitumoraux peuvent induire un phénomène d'apoptose. Cette apoptose

implique une cascade d'évènements génétiquement programmés conduisant à des modifications morphologiques caractéristiques de la cellule qui reflètent le démantèlement systématique de ses composants essentiels. Deux voies principales ont été caractérisées conduisant à l'apoptose:

* La voie intrinsèque ou mitochondriale qui met en scène 3 acteurs principaux, les caspases, les protéines de la famille Bcl-2, et la molécule adaptatrice APAF-1, autour de la mitochondrie.

* La voie extrinsèque qui met en jeu les récepteurs de mort, Fas/CD95 et récepteurs de TRAIL (DR4 et DR5). Brièvement, l'activation de Fas ou de DR4/DR5 par leurs ligands ou par un médicament anticancéreux entraîne la fixation du côté cytoplasmique, au niveau du domaine de mort, de la molécule adaptatrice FADD. Il s'ensuit l'arrimage d'une caspase (caspase-8 ou -10) pour former un complexe nommé DISC. Ces protéases ainsi activées vont à leur tour activer d'autres caspases telles que les caspases -3, -6, ou -7 qui vont cliver divers substrats importants dans le maintien de l'intégrité cellulaire et conduire à l'apoptose. Les différentes voies d'activation de l'apoptose sont soumises à une étroite régulation négative faisant intervenir des protéines de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1), les IAPs ou FLIP. Toutefois, ces voies ne sont pas activées en même temps dans la même cellule et par un seul type de médicament. Ceci expliquerait la différence de cytotoxicité observée dans les cellules cancéreuses en réponse aux médicaments. C'est pour cette raison qu'il serait important de connaître les voies de transduction du signal apoptotique ainsi que les molécules impliquées dans ce processus pour tout nouveau médicament afin de mieux définir, définitivement, les protocoles de chimiothérapie les plus efficaces.

Précédemment, plusieurs publications (Hannun Y, 1997 ; Wang *et al.*, 1999 ; Gamen *et al.*, 2000 ; Young-Woo *et al.*, 2005) avaient reporté que la Dox induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaires *via* l'activation des caspases et l'implication de la voie mitochondriale. Néanmoins, cette apoptose est induite par de fortes doses de Dox. Par contre, à de faibles doses, des facteurs exogènes (TRAIL, TNF α) doivent intervenir aussi pour induire l'apoptose.

Au cours de cette thèse, nous étudions pour la première fois le type de mort induite par la Dox couplée à des CPPs (Tat, Pen et MCA_{Abu}).

Les résultats de ce travail ont fait l'objet des articles IV et V respectivement:

ARTICLE IV

Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231

Sonia Aroui^{1, 2,3}, Souhir Brahim¹, Michel De Waard^{2,3}, Jacqueline Bréard⁴, Abderraouf Kenani¹

¹Unité 05/UR/09-09, Mécanismes Moléculaires et Pathologies, Faculté de Médecine de Monastir, 5019 Monastir Tunisie.

²INSERM U836, Calcium channels, functions and pathologies, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France.

³Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France.

⁴INSERM U749, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

Cancer Letters (2009)



Contents lists available at ScienceDirect

Cancer Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/canlet


Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231

Sonia Aroui^{a,b,c}, Souhir Brahim^a, Michel De Waard^{b,c}, Jacqueline Br  ard^d, Abderraouf Kenani^{a,*}

^a Unité 05/UR/09-09, Mécanismes Moléculaires et Pathologies, Faculté de Médecine de Monastir, 5019 Monastir, Tunisia

^b INSERM U836, Calcium Channels, Functions and Pathologies, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

^c Université Joseph Fourier, Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

^d INSERM U749, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2009

Received in revised form 14 April 2009

Accepted 27 April 2009

Keywords:

Doxorubicin

Cell-penetrating peptide

Apoptosis

Mitochondria

Bcl-2

Caspases

ROS

ABSTRACT

Doxorubicin (Dox) is a commonly used drug to treat various types of cancers. Previously, we demonstrated that coupling Dox to cell-penetrating peptides (CPPs) represent a valuable strategy to overcome drug resistance in MDA-MB 231 breast cancer cells. In the present study, we evaluated the properties of these Dox conjugates (Dox–CPPs) in terms of apoptosis induction. Dox–CPPs were found to induce apoptotic death in MDA-MB 231 cells at a lower dose than that needed for unconjugated Dox. Cell death induction was associated with Bax oligomerisation, release of cytochrome c, caspase activation, chromatin condensation and internucleosomal degradation. However, whereas Bcl-2 overexpression was very potent in inhibiting apoptosis triggered by Dox, this anti-apoptotic protein was largely inefficient in preventing Dox–CPPs-induced apoptosis. These observations suggest that mitochondrial disruption is the main event in Dox-induced apoptotic signaling but that Dox–CPPs are probably able to trigger additional apoptotic pathways independent of mitochondrial events. Thus, the higher efficacy of Dox conjugated to CPPs in apoptosis induction might not be due exclusively to increased drug accumulation but also to the activation of multiple apoptotic pathways.

   2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cell-penetrating peptides (CPPs) attract an increasing interest in contemporary drug research because they could

be used as very efficient drug delivery systems into desired cell targets [1]. In a previous study, we have demonstrated that an unfolded analogue of the maurocalcine peptide (MCa_{Abu}) acts as a potent vector for the cell delivery of Dox into two models of breast cancer cell lines MDA-MB 231, relatively Dox-resistant, and MCF7, Dox-sensitive, respectively. In addition, we have validated that the Dox–MCa_{Abu} conjugate is as effective as Dox–Tat and Dox–Penetratin (Pen) conjugates for overcoming reduced Dox sensitivity in MDA-MB 231 compared to MCF7 cells [2]. The aim of the present study was to assess the processes involved in the death of MDA-MB 231 cells treated with Dox–CPPs conjugates.

Abbreviations: CPP, cell-penetrating peptide; DHE, dihydro-ethidium; DMSO, dimethyl sulfoxide; Dox, doxorubicin; FACS, fluorescence activated cell sorting; FITC, fluoresceine isothiocyanate; MCa, maurocalcine; MCa_{Abu}, maurocalcine analogue with cysteine residues replaced with L-  -aminobutyric acid; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide; NAC, N-acetylcysteine; PBS, phosphate buffered saline; Pen, penetratin; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species.

* Corresponding author. Tel.: +216 73 46 22 00; fax: +216 73 46 07 37.

E-mail address: raouf.kenani@fmm.rnu.tn (A. Kenani).

0304-3835/\$ - see front matter    2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.canlet.2009.04.044

Two major morphologically and biochemically distinct processes whereby death occurs in eukaryotic cells have been described: necrosis (reproductive cell death) and apoptosis (programmed cell death) [3]. Necrosis is associated with cell swelling, rupture of membranes, and lysis of organized structures. In contrast, the morphological changes associated with apoptosis are condensation and fragmentation of the cytoplasm and nucleus while normal organelle structure is maintained. In necrotic cells, biochemical modifications result from the loss of osmoregulation, with random DNA digestion by lysosomal enzymes at a late stage. In contrast, during apoptosis, several events such as protein cleavage, DNA breakdown, and recognition of the dying cell by phagocytes result in distinctive structural modifications [4]. The main actors of these changes are a family of cysteine proteases called caspases. Caspases are expressed in cells in inactive proenzyme forms that, once activated through proteolysis, can activate other procaspases leading initiation of a protease cascade. In this proteolytic cascade, caspases cleave a host of cellular substrates, leading to the morphological hallmarks of apoptosis, including DNA fragmentation. Caspase-8 or -9 acts as an initiator of apoptosis, whereas others (e.g., caspases-3 and -7) serve as effectors [5,6]. Previous studies have suggested that various stimuli, such as cytokines and anticancer drugs, as well as growth factor deprivation and radiation damage, could induce apoptosis in a variety of tumor cells [7,8]. Dox is one of the most important anticancer agents for solid tumors including breast, stomach, non-Hodgkin's lymphoma, and bladder cancer [9]. Free radical formation and DNA damage via inhibition of topoisomerase II may be primarily responsible for the cytotoxic effects of Dox [10]. It has been reported that this drug induces apoptosis via the activation of caspases and disruption of mitochondrial membrane potential [11]. Low dose of Dox activates the G1 checkpoint via a p53-dependent pathway [12,13], induces abnormal mitosis and a senescence-like phenotype [14,15]. However, high doses of Dox cause apoptosis [12,13,15]. In many studies, it has also been shown that low doses of Dox are not sufficient to induce apoptosis and needs synergy with other exogenous factors to further sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against breast cancer, hepatocellular carcinoma and colon carcinoma [16–19].

In this study, we compared apoptotic signaling in MDA-MB 231 cells treated with Dox or Dox-CPPs. Our results demonstrate that Dox coupled to Tat or Pen or MCa_{Abu} is able to induce apoptosis at doses lower than those required to reach the same level of cell death with free Dox. The apoptotic pathways involved are dependent on caspase activation with Bax translocation to the mitochondria and release of cytochrome c when the cells are exposed to 2.5 μ M of Dox or 0.5 μ M of Dox-CPPs. However, the level of protection conferred by Bcl-2 overexpression is much lower in cells treated with Dox-CPPs compared to cells treated with Dox. These results suggest that the Dox conjugates might trigger other apoptotic pathways in addition to the classical intrinsic pathway initiated at the level of mitochondria.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

Dox was purchased from Alexis Biochemicals. Dox-Tat, Dox-Pen, and Dox-MCa_{Abu} were synthesized as described earlier [2]. For Western blotting, the antibodies used were: anti-caspase-3 (H-277, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-caspase-8 (Alexis), anti-caspase-9 (Cell Signaling), anti-Hsc70 (B-6, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-Bcl-2 (Calbiochem), anti-Bcl-xL (BD Transduction Laboratories), anti-Bid (R&D SYSTEMS), anti ROCK I (H85) (Santa Cruz Biotechnology), peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA). For immunodetection, antibodies used were: anti-cytochrome c (Pharmingen, San Diego, CA), monoclonal anti-active Bax (clone 6A7, Sigma-Aldrich) raised against a peptide corresponding to amino acids 1–21 of human Bax, Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) conjugate and Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit antibodies from Molecular Probes (Cergy Pontoise, France). The antioxidant N-acetylcysteine (NAC), z-VAD-fmk and z-DEVD-fmk are from Sigma.

2.2. Cell lines and culture

MDA-MB 231 human carcinoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). CHO cells were also obtained from ATCC. EMT-6H murine cancer cell lines were generously provided by Dr. Ali Bettaieb (U866 INSERM, Dijon F-21000, France). Culture media and supplements were purchased from Invitrogen. All cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ in a HERA cell 150 humidified incubator (Thermo). MDA-MB 231 cells were grown in Leibovitz L-15 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin. CHO cells were grown in F-12 K medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin. EMT-6H cells were grown in EMEM medium supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum biowest, 10,000 units/ml streptomycin and penicillin and 5% glutamine. MDA-MB 231 cells were transfected either with 2 μ g of pUSE-empty vector or the same vector containing a cDNA encoding human Bcl-2 with 5 μ L Lipofectamine 2000 in serum-free Opti-MEM (Promega) at 37 °C for 4 h. The cells were then cultured in regular medium for 24 h before appropriate treatment.

2.3. Cell viability assay

The cytotoxicity of Dox and Dox coupled to Tat, Pen or MCa_{Abu} (Dox-CPPs) was determined by MTT assay. MDA-MB 231 cells were plated overnight in 96 well plates at a density of 5000 cells per well in 0.2 ml of appropriate growth medium with 10% FBS and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin at 37 °C. Three concentrations of Dox or Dox-CPPs (0.1, 0.5 and 2.5 μ M) were incubated with the cells for 2, 24 and 48 h. Cell culture medium alone or with cells, both without drugs were included in each

experiment as controls. After incubation, 100 μ l of 0.5 mg/ml of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was added and incubated for 3 h. Conversion of MTT into purple formazan by metabolically-active cells indicates the extent of cell viability. The crystals of produced formazan were dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma) and the optical density was measured at 570 nm using the FLUOstar OPTIMA microplate reader (BMG Labtech) followed by analyses. All assays were run in triplicates.

2.4. Clonogenic cell survival assay

Cells grown in six-well plates were incubated with different concentrations of Dox or Dox-CPPs for 2 h. After treatment, cells were plated in 60-mm culture dishes at a density of 500 cells per dish in Leibovitz L-15 medium containing 10% FBS and then kept in a humidified incubator at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂ for 11 days. Colonies were fixed and stained with 1% crystal violet (Sigma) in 10% methanol and counted as described [20]. Percentage of colonies arising from surviving treated cells was calculated relative to colonies arising from untreated control cells.

2.5. Morphological assessment by Hoechst 33342 staining

After 24 h of treatment with Dox (0.5 μ M or 2.5 μ M) or Dox-CPPs at 0.5 μ M, cells (2×10^4) were collected by trypsinization and centrifugation. The cell pellets were then washed with PBS and stained with 1 mg/ml Hoechst 33342 for 10 min, washed again with PBS. Cells were mounted and examined under a Zeiss fluorescence microscope. Cells with condensed and fragmented nuclei were considered as apoptotic cells. The percentage of apoptotic cells was calculated from the ratio of apoptotic cells to total cells counted. At least, 300 cells were counted for each condition.

2.6. Cell count and flow cytometry analysis

Cells grown in six-well plates were treated or not by Dox or Dox-CPPs for 24 h. Both adherent and floating cells were collected after treatment, the pellet was washed twice with cold PBS and then 300 μ l of ice-cold 70% ethanol were added while vortexing to fix and permeabilize the cells overnight. After fixation, the cells were washed with PBS and the pellets were collected by centrifugation (3,000 rpm for 4 min), and resuspended in 500 μ l propidium iodide (PI) solution (50 μ g/ml in PBS). After 30 min incubation in the dark, analysis was performed with a flow cytometer (FACSCalibur, BD Biosciences, USA). Fluorescence emitted from the propidium iodide-DNA complex was estimated for a minimum of 10,000 cells per sample and analyzed using Cell Quest Alias software (BD Biosciences, USA). The percentage of cells in different cell cycle phases was evaluated. Cells with DNA content less than that of the G1 phase (sub-G1 peak) were considered as apoptotic cells.

For Bax activation measurement, cells were washed, permeabilized in 0.05% saponin and then incubated with monoclonal anti-active Bax antibody (clone 6A7, Sigma-

Aldrich). The cells were washed and reincubated with Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H + L) conjugate.

For ROS measurements, cells were incubated for 15 min at 37 $^{\circ}$ C in the presence of 6.6 μ M dihydro-ethidium (DHE) (Sigma) and analyzed by flow cytometry.

2.7. DNA extraction and electrophoresis analysis

The 1×10^7 untreated, Dox, or Dox-CPPs treated MDA-MB 231 cells were harvested after 24 h incubation, washed with phosphate-buffered saline (PBS), and then suspended in lysis buffer (Promega) in presence of 25 μ l of proteinase K (0.5 mg/ml) at 56 $^{\circ}$ C overnight. The next day the cells were treated with RNase A (0.5 μ g/ml) for 3 h at 56 $^{\circ}$ C. DNA was extracted with phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1). The DNA samples were mixed with 5 μ l of loading buffer (0.25% bromophenol blue, 40% glycerol) and loaded onto 2% agarose gel containing 5 μ g/ml of ethidium bromide. The agarose gel was run at 50 V for 120 min in Tris-borate/EDTA electrophoresis buffer. Approximately 20 μ g of DNA was loaded in each well, visualized under UV light, and photographed.

2.8. Protein extraction and Western blot analysis

Cells were incubated for 24 h in the presence of the indicated concentrations of drugs, harvested and lysed. To detect cleaved caspases, total cell extracts were prepared by lysis for 30 min in a hot Laemmli buffer (60 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% SDS) and DNA was disrupted by sonication. For Bcl-2, Bcl-xL, ROCK I and Bid detection, cells were lysed for 30 min in ice-cold triton lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM NaPP₆, 10 mM NaF, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM EGTA pH 7.6, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin and 5 μ g/ml pepstatin). Cell debris were removed by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4 $^{\circ}$ C. Proteins were quantified using the bicinchoninic acid (BCA) assay kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's specifications. Forty μ g of protein lysate were incubated in loading buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.18 M β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.005% bromophenol blue), boiled and separated on a polyacrylamide gel by SDS-PAGE under reducing conditions. The proteins were electrotransferred overnight or 2 h in ice to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Hybond-P, Amersham Biosciences). Membranes were blocked for at least 1 h in Tris-buffered saline (TBS), 5% BSA and 0.5% Tween 20 and then probed with the appropriate primary antibodies in 5% BSA, 0.1% Tween 20, and 0.05% sodium azide in TBS for 1 h at room temperature or overnight at 4 $^{\circ}$ C and thereafter incubated with the appropriate secondary peroxidase-labeled antibody for 1 h at room temperature. Enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was used for protein detection.

2.9. Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, cells were harvested by trypsinization, washed twice with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4 $^{\circ}$ C, and permeabilized

with 0.1% saponin. Non-specific binding was blocked by incubating cells in 3% BSA for 1 h. For Bax relocation and cytochrome c release analysis, cells were incubated with the primary antibodies, mouse monoclonal anti-Bax (clone 6A7) or rabbit polyclonal anti-Cytochrome c (Pharmingen, San Diego, CA) for 1 h at room temperature as described [21]. Excess of antibodies was removed by washing the pellets three times with PBS and then, cells were incubated with Alexa-fluor 488 secondary antibodies for another 1 h protected from light at room temperature. Cells were then washed three times with PBS and mounted onto microscope slides using Dako antifade mounting reagent (Molecular Probes). Cells were subsequently viewed and photographed by Zeiss fluorescence microscope. Non-relevant isotype-matched antibodies were used as negative controls.

2.10. Statistical analysis

Experiments were performed three times and statistical analysis was conducted using Student's *t*-test. Data are

expressed as means $\pm$ SD and $P < 0.05$ was considered significantly different.

3. Results

3.1. Effect of Dox-CPPs on the viability of MDA-MB 231 cells

Exposure of MDA-MB 231 human breast cancer cells to Dox or Dox-CPPs decreased both cell viability (Fig. 1A–C) and clonogenic survival (Fig. 1D) in a concentration and time-dependent manner. With the MTT assay, the cytotoxic effect of Dox-CPPs was already observed at low concentrations (0.1 μ M) whereas this was not the case for Dox alone (Fig. 1A). With higher doses, the cytotoxic effect of both Dox formulas increased (Fig. 1B, 0.5 μ M) to reach almost comparable effectiveness at 2.5 μ M (Fig. 1C). The results of an 11-day culture of equal cell numbers (500 cells per well) demonstrated that Dox-CPPs decrease colony formation at 0.1 μ M (49% for Dox-Tat, 51% for Dox-Pen and 60% for Dox-MCaAbu) and that this decrease continued with increased concentrations (Fig. 1D). In contrast, Dox alone failed to significantly decrease colony formation at 0.1 μ M and higher doses had to be used to reach an inhibitory effect similar to that of conjugated Dox (Fig. 1D). All together these results show that MDA-MB 231 cells exhibit higher resistance to Dox alone than to Dox-CPPs conjugates.

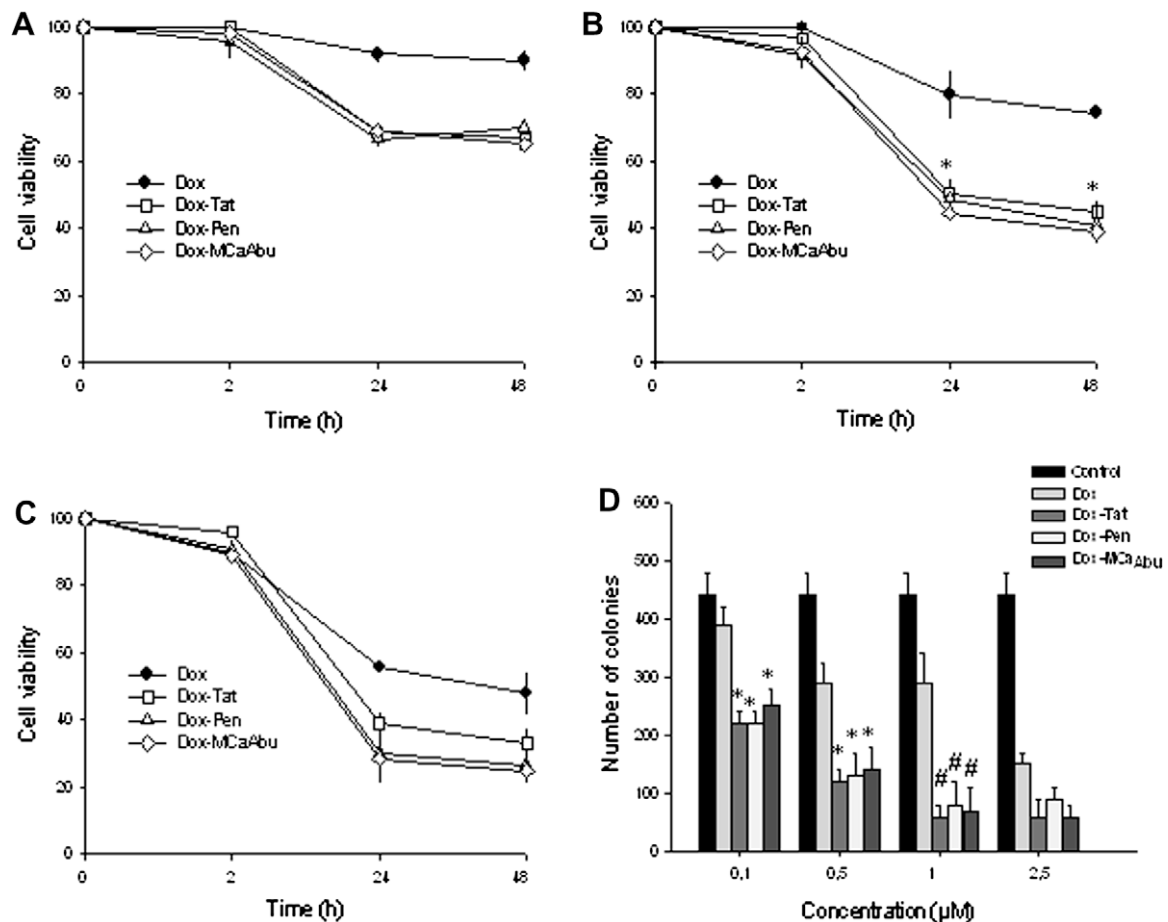


Fig. 1. Cell death induction by doxorubicin (Dox), Dox-Tat, Dox-Pen and Dox-MCaAbu. (A–C) MDA-MB 231 cells were incubated with drug concentrations of (A) 0.1 μ M, (B) 0.5 μ M and (C) 2.5 μ M for the indicated time. Cell death was measured with the MTT cell proliferation assays. Results are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. (D) The cytotoxic activity of Dox or Dox-CPPs was measured in MDA-MB 231 cells by use of a clonogenic assay as described in material and methods. Data are representative of two independent experiments carried out in triplicate. Results are presented as mean $\pm$ SD. Significant differences between stimulated cells (Dox) and stimulated cells (Dox-CPPs) are indicated by a star * ($P < 0.05$) and by # ($P < 0.01$).

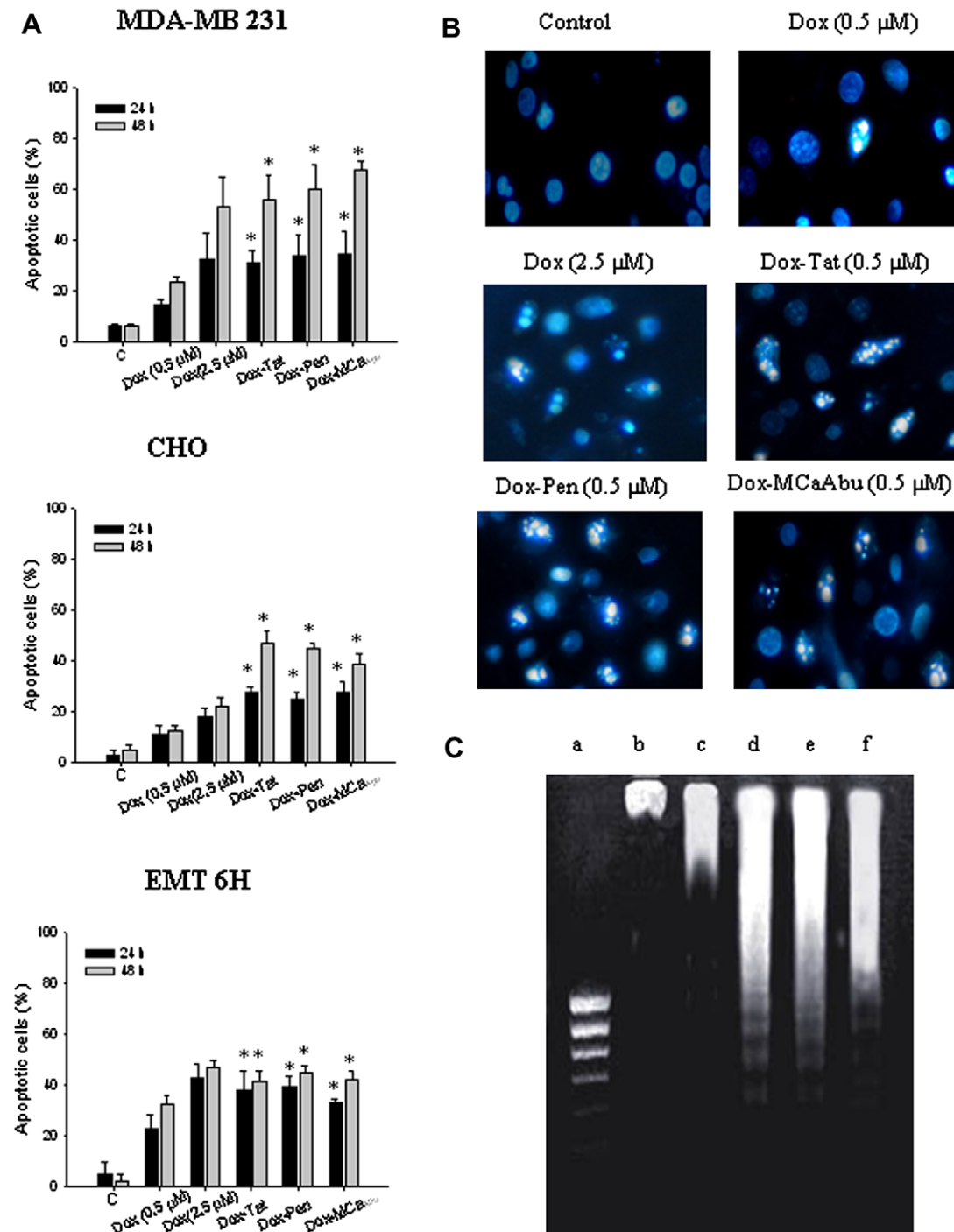


Fig. 2. Measurement of apoptosis in MDA-MB 231 cells and EMT 6H treated with Dox or Dox-Tat or Dox-Pen and Dox-MC_{Abu}. (A) MDA-MB 231 cells and EMT 6H were exposed to 0.5 μ M Dox or Dox-CPPs or 2.5 Dox for the indicated times. Apoptosis was analyzed by flow cytometry analysis of the subG1 peak in cells treated with the indicated drugs. Data represent mean $\pm$ SD (bars) of three independent experiments. C: control untreated cells. Significant differences between stimulated cells (Dox 0.5 μ M) and stimulated cells (Dox-CPPs 0.5 μ M) are indicated by a star * ($P < 0.05$). (B) Microphotographs of cells treated at the indicated drug concentration during 24 h and after Hoechst staining of chromatin. (C) Detection of oligonucleosomal fragmentation analyzed by agarose gel electrophoresis after 24 h of drug treatment (a: molecular weight, b: DNA extract of untreated cells, c: DNA extract of cells treated by Dox, d: DNA extract of cells treated by Dox-Tat, e: DNA extract of cells treated by Dox-Pen, f: DNA extract of cells treated by Dox-MC_{Abu}). Results are representative of three independent experiments.

3.2. Dox–CPPs-induce apoptosis in human MDA-MB 231, hamster CHO and murine EMT-6H cells

We next investigated whether Dox–CPPs toxicity was due to the induction of apoptosis. As shown in Fig. 2A, 0.5 μ M Dox–CPPs induce an increase of the percentage of apoptotic cells in MDA-MB 231 cells to values above 50%, whereas this dose of Dox alone is insufficient. Dox concentration must be increased to 2.5 μ M to obtain the same response than 0.5 μ M Dox–CPP (Fig. 2A, left panel). Such an increased apoptosis-inducing efficiency of conjugated Dox was not limited to human cells as comparable results were obtained with the hamster ovary cancer cell line CHO (Fig. 2A, middle panel) and the murine breast cancer cell line EMT-6H (Fig. 2A, right panel). It can be noted that Dox–CPPs are less efficient in the later cell line which is more sensitive to unconjugated Dox than the two other cell lines. Cells treated with each Dox variant displayed similar typical morphologic features of apoptotic cells with chromatin condensation and nuclei fragmentation as visualized by fluorescence microscopy after DNA staining with Hoechst 33342 (Fig. 2B). Moreover, in the same conditions, Dox–CPPs treatment resulted in inter-nucleosomal DNA fragmentation in MDA-MB 231 cells, as evidenced by the formation of a DNA ladder in agarose gel (Fig. 2B). Taken together, these results demonstrate that lower doses of Dox–CPPs are needed to induce apoptosis with equivalent efficiency than Dox alone. The biochemical events induced by exposed to Dox were further explored in MDA-MB 231 cells.

3.3. Dox–CPPs-induced apoptosis is caspase-dependent

In order to investigate whether Dox or Dox–CPPs-induced apoptosis is mediated by caspases, the proteolytic activation of caspase-8, -9 and -3 was examined. As shown in Fig. 3A, at 0.5 μ M, Dox alone did not induce caspase-cleavage, whereas at the same concentration, Dox–CPPs caused activation of caspase-8 in a time-dependent manner, as indicated by the detection of the cleavage fragments (p43/41). Activation of caspase-9 to the active form (p35) and of caspase-3 (p20 and p17 fragments) was also detected in the same cells. In contrast, a dose of 2.5 μ M of Dox alone was required to reach the same level of caspase activation (Fig. 3A). The activation of caspase-8 in Dox–CPPs treated cells (0.5 μ M) was further confirmed by a reduced level of the p22 native form of one caspase-8 substrate, Bid (the antibody used does not recognize the cleaved form) (Fig. 3B). In contrast, cells treated with Dox alone at the same concentration (0.5 μ M) display the same amount of full length Bid than untreated cells. Likewise, in Dox–CPPs treated cells, the activation of caspase-3 was evidenced by the cleavage of two of its known substrates: ROCK I, with apparition of a 130 kD cleavage fragment and XIAP, with decreased intensity of the 57 kD band corresponding to the native form (Fig. 3B). None of these events was observed in cells treated with Dox alone at the same concentration (Fig. 3B). The dependence on caspases of apoptosis induced by Dox or Dox–CPPs in MDA-MB 231 cells was also confirmed with the use of two caspases inhibitors: a broad-spectrum caspase inhibitor, z-VAD-fmk, and a caspase-3/-7-specific inhibitor, z-DEVD-fmk. As shown in Fig. 3C, pre-treatment of cells with these caspase inhibitors (100 μ M) strongly inhibited apoptosis, suggesting that Dox and Dox–CPPs-induced apoptotic cell death in MDA-MB 231 cells is largely dependent on caspase activation.

3.4. Mitochondrial role in Dox and Dox–CPPs-induced apoptosis

The Bcl-2 family of proteins has an important role in the regulation of apoptosis at the level of mitochondria. The mitochondrial outer membrane permeabilisation (MOMP) that allows cytochrome c release is largely due to the translocation and oligomerisation of the pro-apoptotic Bcl-2 family protein Bax. We therefore investigated whether Dox (2.5 μ M) or Dox–CPPs (0.5 μ M) induced translocation of Bax to mitochondria. As shown in Fig. 4A, all of these treatments led to the detection of a punctuated, and thus most likely mitochondrial, active Bax distribution. Cytofluorometric analysis of cells treated with the same drug concentrations and incubated with the anti-active Bax antibody showed that the great majority of cells were stained (Fig. 4B). However, this was not the case in cells treated with Dox at 0.5 μ M. These results are in accordance with the fact that Dox at this dose poorly induces apoptosis and therefore indicate that Bax activation and oligomerisation is an essential event in apoptotic signaling. These conformational changes of Bax lead to

cytochrome c release from intermembrane space of the mitochondria into the cytosol as shown by the diffuse staining of cells compared with non-treated cells (Fig. 4C). The consequences of Bax oligomerisation at the mitochondria are modulated by the amount of anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family present in the cells. Western blot analysis of Bcl-2 and Bcl-xL in control or treated cells showed that the intensity of the corresponding bands was similar in all cases (Fig. 5A). To explore this issue further, we studied MDA-MB 231 cells overexpressing Bcl-2. As shown in Fig. 5B, over-expression of Bcl-2 prevented apoptotic cell death caused by Dox (2.5 μ M) by $66 \pm 3\%$ but only by $29 \pm 6\%$ for Dox–Tat, $25 \pm 3\%$ for Dox–Pen and $34 \pm 4.5\%$ for Dox–MCA_{Abu}.

Collectively, these results indicate that Dox and Dox–CPPs-induced apoptosis implicate a mitochondrial pathway. However, the less efficient protection by Bcl-2 against apoptotic death mediated by the Dox conjugates strongly suggest that another apoptotic pathway, independent of mitochondria, is simultaneously triggered by these Dox–CPPs.

3.5. Effect of Dox–CPPs on ROS generation

Mitochondria are the major site of ROS production, and accumulation of ROS may lead to the initiation of apoptosis [21–23]. It has been shown that various cytotoxic agents induce apoptosis by production of ROS [22,24,25]. Dox has been shown to exert its anticancer action by topoisomerase II inhibition and free radical generation. In order to determine whether oxidative stress was associated with Dox–CPPs-induced apoptosis, we added increasing amounts of NAC to Dox (2.5 μ M) and Dox–CPPs (0.5 μ M) treated cells. The experiments showed that NAC efficiently inhibited Dox-induced apoptosis in a dose-dependent manner (Fig. 6A). At 10 mM NAC, the percentage of apoptosis induced by Dox was inhibited by $63 \pm 4\%$. This inhibition was less efficient with Dox–CPPs. In the case of Dox–Tat, the percentage of apoptosis was diminished by $35 \pm 3.5\%$ and by $29.5 \pm 1\%$ for Dox–Pen and $37.1 \pm 2\%$ for Dox–MCA_{Abu}. We then examined the intracellular generation of ROS by using dihydro-ethidium fluorescence (DHE). Treatment of MDA-MB 231 cells with Dox or Dox–CPPs for 24 h produced a significant increase in the generation of ROS (Fig. 6B). NAC (10 mM) was very efficient in preventing ROS accumulation in Dox-treated cells (Fig. 6B). However, the same dose of NAC was not as powerful in reducing ROS accumulation in Dox–CPPs treated cells (Fig. 6B). These results confirmed that one or several other pathways are involved in Dox–CPPs-induced apoptosis.

4. Discussion

In the present work, we have shown that an analogue of MCA and two other CPPs, Tat and Pen, act as potent vectors for delivery of Dox into cells and can be used to overcome Dox-resistance in MDA-MB 231 cells. These data confirm and expand our previous work in which we also established that CPPs alone did not present any death-inducing function [2]. We found that the cytotoxicity of Dox–CPPs is detectable after treatment of the MDA-MB 231 cells at lower concentrations than those required during treatment by unconjugated Dox. These results imply that Dox–CPPs may have therapeutic potential in patient cancers if the lower doses can be achieved clinically, thus potentially contributing to reduced cardio-toxicity, a main secondary effect of Dox treatment [29,30]. Apoptosis induced by Dox–CPPs was determined to be dependent on caspase activation as is the case for Dox used at a higher dose. Mitochondrial disruption with release of cytochrome c was found to be involved in the apoptosis induced by both types of drug presentation. However, our results also suggest that Dox–CPPs may induce an additional apoptotic pathway independent of mitochondria.

The three carriers used in this study (MCA, Tat and Pen), displayed a similar efficiency and allowed significant apoptosis-induction at doses five times lower than unconju-

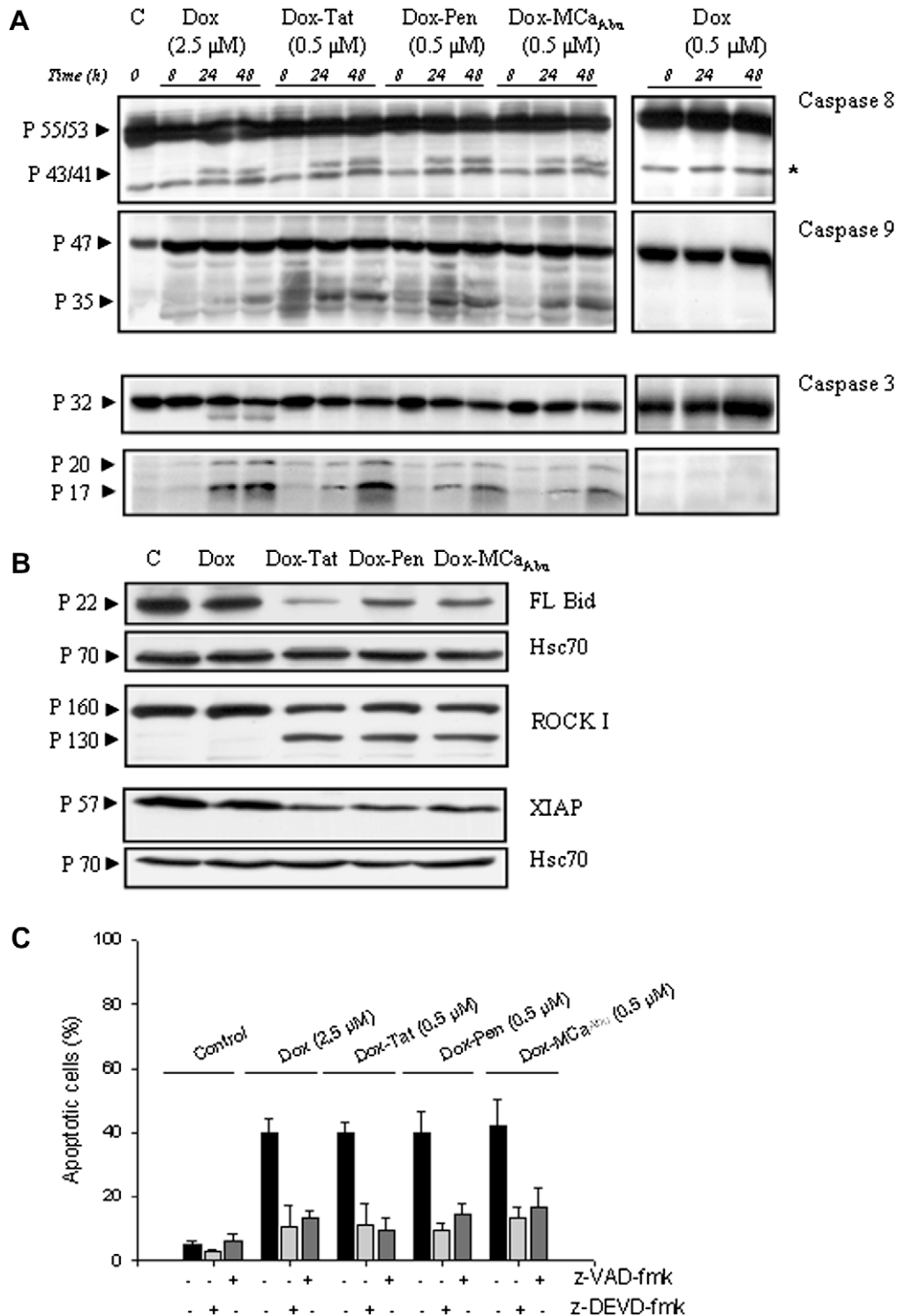


Fig. 3. Activation and involvement of caspases in Dox and Dox-CPPs-induced apoptosis. (A) MDA-MB 231 cells were treated for the indicated times with the various Dox compounds. Caspase cleavage was studied by western blot analysis. Caspase-8: native form, 55/53 kDa; active fragments, 43/41 kDa (the band at about 41 kDa denoted by an * is due to an inactive splice variant of caspase-8). Caspase-9: native form: 47 kDa; active fragment: 35 kDa. Caspase-3: native form: 32 kDa; active fragments: 20 and 17 kDa. (B) Western blot analysis of three caspase substrates after 24 h and the same concentration (0.5 μ M) of treatment with the indicated drugs. Cleavage of Bid, a caspase-8 substrate, denoted by a diminution of the native 22 kD form. Cleavage of two caspase-3 substrates: ROCK I, native form: 160 kDa; cleaved fragment: 130 kD and XIAP, native form: 57 kDa. Hsc70 is used as a loading control. (C) Percentage of apoptotic cells measured by Hoechst staining after 24 h of incubation with the indicated drugs in the presence or not of z-VAD-fmk (100 μ M) or z-DEVD-fmk (100 μ M).

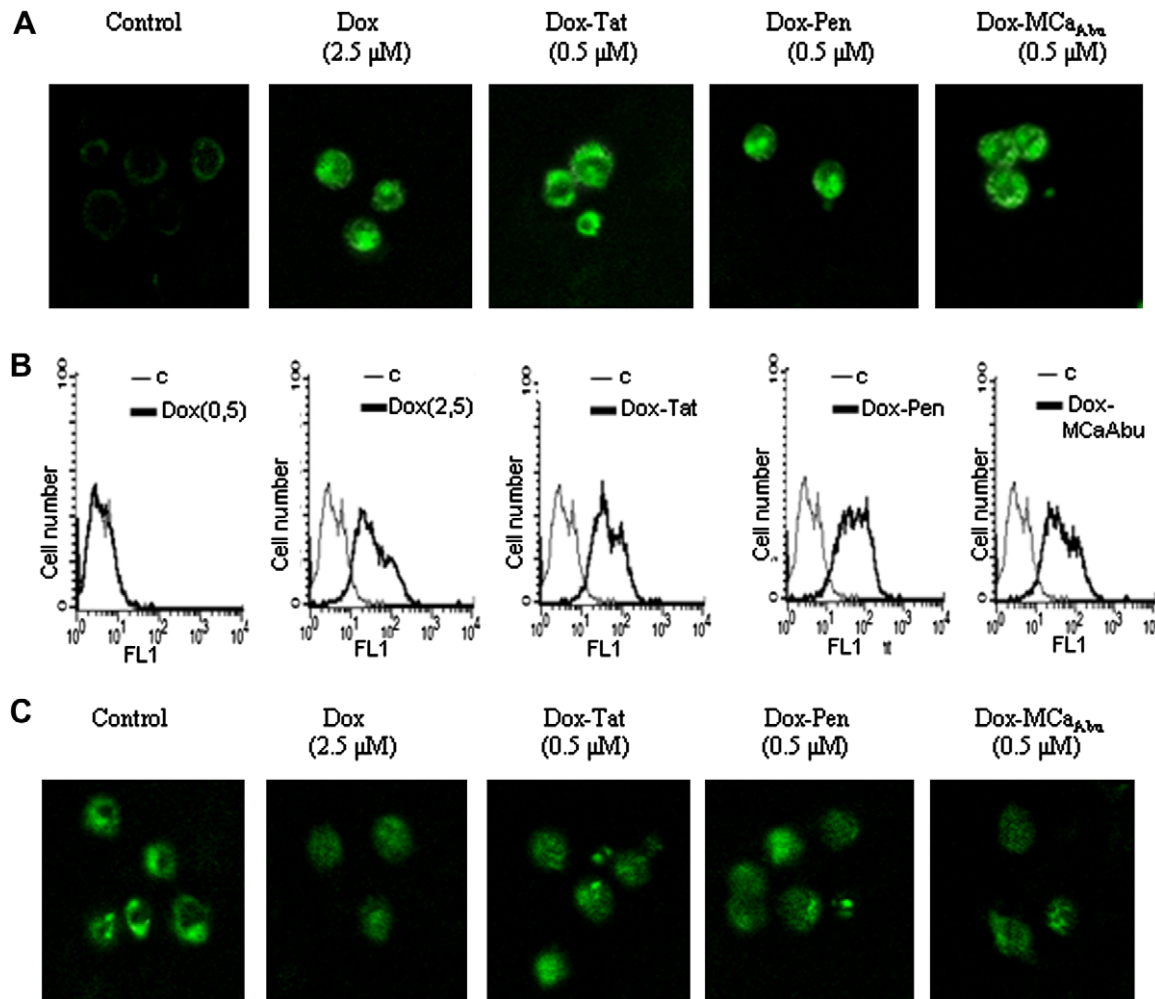


Fig. 4. Mitochondrial role in Dox and Dox-CPPs-induced apoptosis. (A) Detection of active Bax with the monoclonal 6A7 anti-active Bax antibody after 24 h of drug treatment. (B) Flow cytometric analysis of active Bax, labeled with the 6A7 antibody, after 24 h of drug treatment. C: untreated cells. (C) Cytochrome c distribution in cells treated for 24 h with the indicated drug concentrations.

gated Dox in MDA-MB 231 and CHO cells. These results seem to indicate that all three vectors are equally potent in allowing increased access of Dox to the cell interior when compared to unconjugated Dox. Likewise, the kinetics of apoptosis induction by the three Dox conjugates was comparable. Even though Dox-CPPs were also found to be slightly more efficient than Dox in inducing apoptosis in the murine breast cancer cell line EMT-6H, this effect was less pronounced than in MDA-MB or CHO cells. These results are reminiscent of observations that we made in a previous work, i.e. that CPP-conjugates are more efficient in cells which are intrinsically resistant to unconjugated Dox [2]. Dox (0.5 μM) induces a higher level of apoptosis in the murine cell line that we used as compared to the human and hamster cell lines and it is thus possible that Dox toxicity has already reached a near maximum threshold in EMT-6H cells. We are currently screening a panel of murine breast cancer cell lines for their resistance to Dox. Indeed, a Dox-resistant murine cell line would be very

useful to test the efficiency of Dox-conjugates both *in vitro* and *in vivo*.

Bax relocalization to mitochondria, release of cytochrome c and caspase-activation indicated that the mitochondrial outer membrane had been permeabilized. Accordingly, a low dose of unconjugated Dox (0.5 μM) did not induce Bax activation. Mitochondrial membrane permeabilization is controlled by anti-apoptotic members of the Bcl-2 family [26–28,31]. We therefore monitored Bcl-2 and Bcl-xL protein expression in cells treated with apoptosis-inducing doses of Dox or Dox-CPPs and did not detect any variation. In order to further explore whether mitochondria permeabilization was the sole apoptotic pathway activated by all Dox compounds, we studied their effect in MDA-MB 231 cells overexpressing Bcl-2. In contrast to all our previous results, we found major differences between the compounds. Indeed, whereas Bcl-2 was efficient in inhibiting unconjugated Dox (2.5 μM) induced apoptosis, the protection conferred

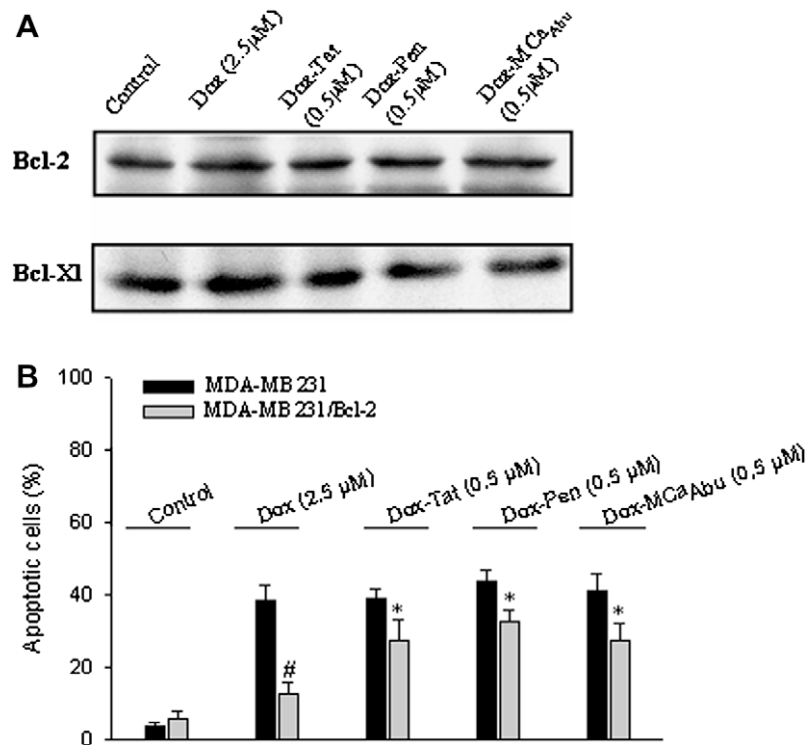


Fig. 5. Role of anti-apoptotic Bcl-2 proteins in Dox-induced apoptosis (A) Cells were treated with the indicated drugs for 24 h and the level of expression of Bcl-2 and Bcl-xL was analyzed by Western blot. (B) Percentage of apoptosis as assessed by Hoechst staining in MDA-MB 231 and MDA-MB 231/Bcl-2 cells incubated with the indicated drug for 24 h. The mean $\pm$ S.D. of each three independent studies is displayed. Significant differences between MDA-MB 231 and MDA-MB 231/Bcl-2 cells stimulated with Dox variants (0.5 μ M) are indicated by a star * ($P < 0.05$).

by this protein to cells treated with the Dox-CPPs compounds (0.5 μ M) was partial. Therefore, it appears that whereas the level of apoptosis induced by Dox (2.5 μ M) and Dox-CPPs (0.5 μ M) is comparable, different apoptotic pathways may be involved. The strong protection by Bcl-2 against apoptosis induced by unconjugated Dox indicates that the corresponding apoptotic signaling pathway is mainly mitochondrial. In contrast, the modest protection conferred by Bcl-2 against apoptosis induced by Dox-CPPs strongly suggests that, despite mitochondrial membrane permeabilization, additional mitochondria-independent apoptotic pathways are the major players in this setting. The frequently observed Bcl-2 overexpression in tumors could therefore interfere with the clinical efficiency of Dox treatment without impairing death induction by Dox-CPPs. At this time, we have not identified the nature of the mitochondria-independent pathways.

Several mechanisms have been proposed to explain Dox-induced apoptosis in tumor cells among which generation of ROS is perceived as playing a major role [32]. We have made the interesting observation that NAC, while very efficiently inhibiting unconjugated Dox-induced apoptosis, is much less efficient in the case of Dox-CPPs. Our study also shows that NAC is largely unable to neutralize ROS generated during Dox-CPPs treatment as opposed to those produced during Dox-treatment. Therefore, it would seem that whereas ROS are produced during apop-

tosis induced by all compounds, they are of a different nature and may not have the same properties.

There is as yet no *in vivo* morphological evidence of the involvement of cardiomyocyte apoptosis in Dox-induced cardiomyopathy which is characterized by extensive fibrosis and scattered cardiomyocytes with vacuolar degeneration [32]. However, it is known that increased oxidative stress is strongly involved in the pathogenesis of this disease. Preserving Dox-induced tumor cell apoptosis while protecting the heart is a major issue in Dox-treatment, complicated by the fact that ROS are involved in both the desirable and the unwanted effect of this drug. Dox-CPPs, by allowing a reduction of drug dosage, could be helpful if their efficiency is confirmed *in vivo*. However and most importantly, there might be another benefit in the use of Dox-CPPs if the mitochondria-independent death signaling that we detect does not affect cardiomyocytes. It will therefore be important to define the nature and the properties of the NAC-resistant ROS generated during Dox-CPPs treatment as they differ from those generated with unconjugated Dox.

Our previous observations showed that, whereas the localization of unconjugated Dox in the cells is nuclear, Dox-CPPs distribute mainly in the cytosol [2]. Whether this could lead to the activation of mitochondria-independent apoptotic pathways is currently under investigation.

In conclusion, Dox-CPPs represent novel compounds which are able to induce caspase-dependent apoptosis in

human cancer cells at low dose and largely irrespective of Bcl-2 levels. Based on these results, we suggest that Dox–

CPPs may be candidates for further evaluation as chemotherapeutic agents for human breast cancer.

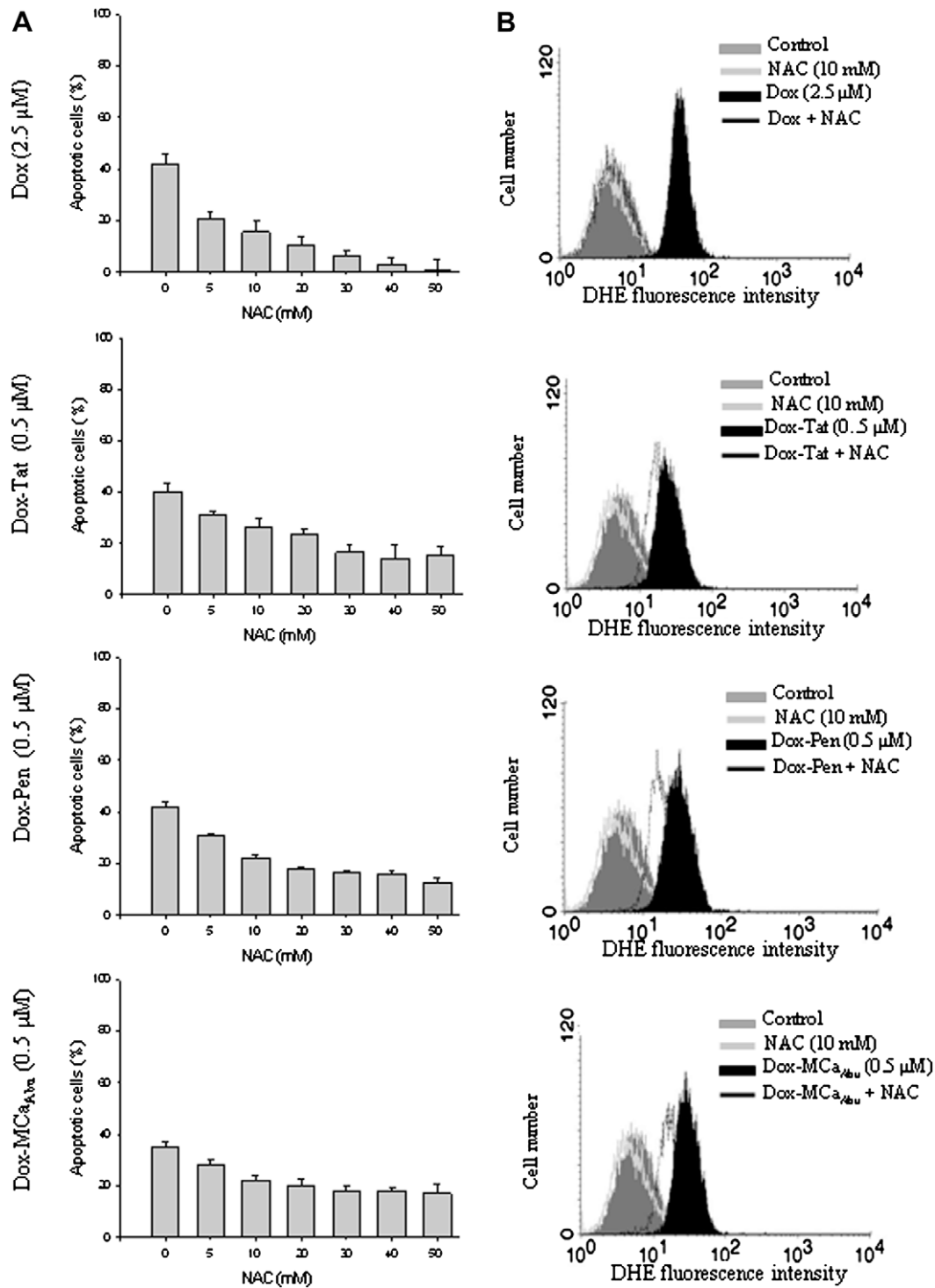


Fig. 6. Role of ROS in Dox-induced apoptotic signaling. (A) Apoptotic cell analysis after Hoechst 33342 staining of MDA-MB 231 cells treated with Dox or Dox-CPPs for 24 h in the presence (+) or absence (–) of increased concentration of NAC. (B) MDA-MB 231 cells were treated with Dox or Dox-CPPs at the indicated concentrations in the presence or absence of 10 mM NAC for 24 h. Cells were then stained with dihydro-ethidium (DHE) and analyzed by flow cytometry to determine ROS accumulation.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

SA acknowledges the support of the Ministère de l'Enseignement Supérieure de la Recherche Scientifique et de la technologie (Tunisia) for financial support and the University of Monastir and University Joseph Fourier for their joint PhD training program. M.D.W. acknowledge support from ANR PNANO and «Technologie pour la Santé» funds from the Commissariat à l' nergie Atomique.

References

- [1] K.M. Stewart, K.L. Horton, S.O. Kelley, Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine, *Org. Biomol. Chem.* 6 (2008) 2242–2255.
- [2] S. Aroui, N. Ram, F. Appaix, M. Ronjat, A. Kenani, F. Pirollet, M. De Waard, Maurocalcine as a non toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231, *Phar. Res.* 10 (2008) 1007. 11095-008-9782-9801.
- [3] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [4] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407 (2000) 770–776.
- [5] G.M. Cohen, Caspases: the executioners of apoptosis, *Biochem. J.* 326 (1997) 1–16.
- [6] G. Salvesen, V.M. Dixit, Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell* 91 (1997) 443–446.
- [7] W.C. Earnshaw, Nuclear changes in apoptosis, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7 (1995) 337–343.
- [8] D.R. Green, J.C. Reed, Mitochondria and apoptosis, *Science* 281 (1998) 1309–1312.
- [9] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229.
- [10] D.A. Gewirtz, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the adriamycin and daunorubicin, *Biochem. Pharmacol.* 57 (1999) 727–741.
- [11] S. Gamen, A. Anel, P. Perez-Galan, P. Laserra, D. Johnson, A. Pineiro, J. Naval, Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltaprim loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells, *Exp. Cell. Res.* 258 (2000) 223–235.
- [12] Y.A. Hannun, Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy, *Blood* 89 (1997) 1845–1853.
- [13] M. Los, I. Herr, C. Friesen, S. Fulda, K. Schulze-Osthoff, S. Ipkowitz, Cross-resistance of CD95 and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases), *Blood* 90 (1997) 3118–3129.
- [14] Y. Wang, G. Blandino, D. Givol, Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin, *Oncogene* 18 (1999) 2643–2649.
- [15] E. Young-Woo, K. Mi Ae, S.P. Seok, J.G. Mi, J.K. Hyuk, S. Seonghyang, H.K. Wook, Y. Gyesoon, S.C. Kyeong, Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype, *Oncogene* 24 (2005) 4765–4777.
- [16] M.M. Keane, S.A. Ettenberg, M.M. Nau, E.K. Russell, S. Lipkowitz, Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines, *Cancer Res.* 59 (1999) 734–741.
- [17] Y. Muzutani, O. Yoshida, T. Miki, B. Bonavida, Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 5 (1999) 2605–2612.
- [18] T. Yamanaka, K. Shiraki, K. Sugimoto, Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines, *Hepatology* 32 (2000) 482–490.
- [19] S. Lacour, A. Hammann, A. Wotawa, L. Corcos, E. Solary, M.T. Dimanche-Boitrel, Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis, *Cancer Res.* 61 (2001) 1645–1651.
- [20] D. Triscuoglio, B. Uranchimeg, J.H. Cardellina, T.L. Meragelman, S. Matsunaga, N. Fusetani, D.D. Bufalo, R.H. Shoemaker, G. Melillo, Induction of apoptosis in human cancer cells by candidaspongidiolide, a novel sponge polyketide, *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (2008) 1233–1246.
- [21] S. Braham, L. Prevotat, S. Yatouji, D. Merino, M. Cortier, C. Rebe, O. Micheau, A. Kenani, A. Bettaieb, Deglycosylated bleomycin induces apoptosis in lymphoma cell via c-jun NH2-terminal kinase but not reactive oxygen species, *Biochem. Phar.* 74 (2007) 1445–1455.
- [22] W. Davis, Z. Ronai, K.D. Tew, Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296 (2001) 1–6.
- [23] C. Fleury, B. Mignotte, J.L. Vayssiere, Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling, *Biochimie* 84 (2002) 31–141.
- [24] D.M. Hockenbery, C.D. Giedt, J.W. O'Neill, M.K. Manion, D.E. Banker, Mitochondria and apoptosis: new therapeutic targets, *Adv. Cancer Res.* 85 (2002) 03–242.
- [25] J. Henry-Mowatt, C. Dive, J.C. Martinou, D. James, Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer, *Oncogene* 23 (2004) 2850–2860.
- [26] J.D. Ly, D.R. Grubb, A. Lawen, The mitochondrial membrane potential (Ψ_m) in apoptosis; an update, *Apoptosis* 8 (2003) 115–128.
- [27] T. Kuwana, D.D. Newmeyer, Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis, *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15 (2003) 691–699.
- [28] L. Scorrano, S.J. Korsmeyer, Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003) 437–444.
- [29] A. Ferreira, L.A. Matsubara, L.S. Matsubara, Anthracycline-induced cardiotoxicity, *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* 6 (2008) 278–281.
- [30] P.H. Viale, D.S. Yamamoto, Cardiovascular toxicity associated with cancer treatment, *Clin. J. Oncol. Nurs.* 12 (2008) 627–638 (Review).
- [31] D. Karunakaran, J. Joseph, T.R. Kumar, Cell growth regulation, *Adv. Exp. Med. Biol.* 595 (2007) 245–268.
- [32] G. Takemura, H. Fujiwara, Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management, *Progr. Cardiovasc. Dis* 49 (2007) 330–352.

ARTICLE V

Conjugation of doxorubicin to cell penetrating peptides sensitizes human breast MDA-MB 231 cancer cells to endogenous TRAIL-induced apoptosis

Sonia Aroui^{1,2,3}, Souhir Brahim¹, Jocelyne Hamelin⁴, Michel De Waard^{2,3}, Jacqueline Bréard^{4*}, Abderraouf Kenani ^{1*}

¹Unité 05/UR/09-09, Mécanismes Moléculaires et Pathologies, Faculté de Médecine de Monastir, 5019 Monastir Tunisie.

²INSERM U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Calcium Channels, Functions and Pathologies, Site santé de la Tronche, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France.

³Université Joseph Fourier, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France.

⁴INSERM U749, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France.

Apoptosis (2009)

Conjugation of doxorubicin to cell penetrating peptides sensitizes human breast MDA-MB 231 cancer cells to endogenous TRAIL-induced apoptosis

Sonia Aroui · Souhir Brahim · Jocelyne Hamelin ·
Michel De Waard · Jacqueline Bréard ·
Abderr  ouf Kenani

   Springer Science+Business Media, LLC 2009

Abstract Previous work from our laboratory has shown that coupling doxorubicin (Dox) to cell penetrating peptides (Dox-CPPs) is a good strategy to overcome Dox resistance in MDA-MB 231 breast cancer cells. We also reported that, in contrast to unconjugated Dox-induced cell death, the increase in apoptotic response does not involve the mitochondrial apoptotic pathway. In this study, we demonstrate that both Dox and Dox-CPPs can increase the density of the TRAIL receptors DR4 and DR5 at the plasma membrane and moderately sensitize MDA-MB 231 cells to exogenously added recombinant TRAIL, as has already been shown for other chemotherapeutic drugs. Moreover, we show that Dox-CPPs, used alone, induce the clustering of TRAIL receptors into ceramide-enriched membrane lipid rafts, a property not shared by

unconjugated Dox and that this process is due to the generation of ceramide during Dox-CPPs treatment. In addition, MDA-MB 231 cells were found to express TRAIL and we show that the increased apoptotic rate induced by Dox-CPPs is due to the sensitization of MDA-MB 231 cells to endogenous TRAIL. The capacity of Dox-CPPs to sensitize cancer cells to physiologic amounts of TRAIL suggests that, in addition to their efficiency in combination chemotherapy, these compounds might increase the response of tumor cells to cytotoxic lymphocyte-mediated killing via TRAIL.

Keywords Doxorubicin · Cell-penetrating peptide · Apoptosis · TRAIL · Death receptors · Rafts · Bcl-2

Abbreviations

ASM	Acid sphingomyelinase
CPP	Cell penetrating peptide
Dox	Doxorubicine
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc-R1, Fc-R2	Recombinant proteins composed of IgG Fc fused to TRAIL-R or TRAIL-R2, respectively
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
MCa	Maurocalcine
MCa _{Abu}	Maurocalcine analogue with cysteine residues replaced with L-��-aminobutyric acid
MCD	Methyl-��-cyclodextrin
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
NAC	N-acetylcysteine
PBS	Phosphate buffered saline
Pen	Penetratin

Jacqueline Bréard and Abderr  ouf Kenani are senior Authors and contributed equally to this work.

S. Aroui · S. Brahim · A. Kenani (  )

Unité 05/UR/09-09, Mécanismes Moléculaires et Pathologies,

Faculté de Médecine de Monastir, Monastir 5019, Tunisie

e-mail: raouf.kenani@fmm.rnu.tn

S. Aroui

e-mail: sonia_aroui2002@yahoo.fr

S. Aroui · M. De Waard

INSERM U836, Grenoble Institute of Neuroscience, Calcium

Channels, Functions and Pathologies, Site santé de la Tronche,

BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9, France

S. Aroui · M. De Waard

Université Joseph Fourier, BP 170, 38042 Grenoble Cedex 9,

France

J. Hamelin · J. Bréard

INSERM U749, Faculté de Pharmacie, 5 rue J.B. Clément,

92290 Châtenay-Malabry, France

Published online: 03 September 2009

 Springer

ROS Reactive oxygen species
TRAIL TNF-related-apoptosis-inducing-ligand

Introduction

Tumor development usually involves disruption of cellular signaling cascades, which control cell proliferation, differentiation, or survival [1]. Chemotherapy-mediated cell death occurs mainly through the induction of apoptosis, while impairment of apoptotic signaling leads to drug-resistance. Numerous actual studies are meant to find strategies that would overcome this resistance. These strategies include the use of a combination of apoptosis-inducing agents or an improvement of the uptake of these agents by using liposomal nanoparticles [2] or their conjugation to cell penetrating peptides (CPPs) [3].

Previously, we have reported that coupling of Doxorubicin (Dox) to various CPPs; Tat, Penetratin (Pen) or a variant of maurocalcine (MCa_{Abu}) improves the cytotoxic efficacy of the drug in MDA-MB 231 cells, often used as a Dox-resistant cell model [4]. Dox is an antitumor drug widely used in the clinic for the treatment of cancers and is known to induce apoptosis. We found that Dox–CPPs could trigger apoptotic cell death at doses five times lower than those needed to obtain a similar death rate by unconjugated Dox [5]. Anticancer drugs, including Dox, induce apoptosis in sensitive cancer cells by activating the intrinsic death pathway, initiated at the mitochondria [6]. This pathway requires release of cytochrome c from the mitochondria followed by procaspase-9 activation. In this pathway, cytochrome c release from the mitochondria can be inhibited by antiapoptotic members of the Bcl-2 family and we reported that Dox-induced apoptosis in MDA-MB 231 cells overexpressing Bcl-2 was efficiently blocked [5]. However, we also observed that the same Bcl-2-expressing MDA-MB 231 cells remained sensitive to apoptosis triggered by all three Dox–CPPs [5]. These data suggested that Dox–CPPs were not only more efficient than unconjugated Dox to induce apoptosis but that these conjugates could initiate an additional apoptotic signaling, not requiring mitochondrial membrane permeabilization. The main apoptotic pathway which is independent of mitochondria is that initiated by activation of death receptors such as Fas or TRAIL-Rs in type I cells. In these cells, a death-signaling complex (DISC) is formed at the level of the activated receptors with recruitment of FADD (Fas-associated death domain) and procaspase-8. A large amount of procaspase-8 is activated in these complexes leading to the direct activation of procaspase-3 without implication of the mitochondrial amplification loop needed in type II cells [7]. We therefore wondered whether death receptors could play a role in Dox–CPPs induced apoptosis.

Several compounds have been shown to sensitize MDA-MB 231 cells to TRAIL-induced apoptosis [8, 9]. Cell sensitization has been linked to drug-induced increased cell surface expression of TRAIL-R2/DR5 [8]. TRAIL, a homotrimeric subunit structure [10] induces apoptosis by activation of the TRAIL death receptors DR4 (TRAIL-R1) and DR5 (TRAIL-R2) which transduce the death signal via their intracellular death domain (DD) [11]. TRAIL also binds to the decoy receptors DcR1 (TRAIL-R3) and DcR2 (TRAIL-R4) that lack a functional DD and are unable to transmit a cell death signal. An increased density of DR4 or DR5 at the cell membrane is sometimes sufficient to sensitize the cells to the corresponding ligand.

Another event needed for efficient transduction of the death signal by DR4 or DR5 is their clustering within ceramide-enriched membrane platforms, allowing for a better recruitment of the DISC components and activation of procaspase-8 [12]. Ceramide is the hydrophobic moiety of sphingomyelin and also forms the backbone of other complex sphingolipids, e.g., cerebroside and gangliosides. Hydrolysis of sphingomyelin releases ceramide which can also be produced by de novo synthesis [13, 14]. It has been reported that apoptotic stimuli, such as members of the TNF family [15], UV-light [16], irradiation [17] or anticancer drugs [18] can induce ceramide generation. TRAIL-induced increase in ceramide content via activation of acid sphingomyelinase leads to amplification of the death signal [19]. Moreover, Dox has been shown to induce local release of ceramide in lymphoid cells and thereby to enhance TRAIL-induced cell death [12].

In this study, we have investigated whether signaling via TRAIL-Rs could be involved in the greater efficiency of Dox–CPPs in MDA-MB 231 cells. We found that both Dox and Dox–CPPs could increase DR4 and DR5 density at the cell surface and thus sensitize MDA-MB 231 cells to exogenous TRAIL-induced apoptosis. However, we observed that only Dox–CPPs were able to induce ceramide generation and DR4 and DR5 clustering in ceramide-enriched lipid membrane platforms. Most interestingly, death-signaling was activated from these aggregated receptors even in the absence of exogenous, recombinant TRAIL. Indeed, we found that the ligand TRAIL is expressed at the surface of MDA-MB 231 cells and that only Dox–CPPs can sensitize these cells to endogenous TRAIL.

Materials and methods

Reagents and antibodies

Doxorubicin (Dox) was purchased from Alexis Biochemicals. Dox-Tat, Dox-Pen, and Dox-MCa_{Abu} were synthesized as described [4]. Flag-tagged recombinant soluble human

TRAIL from Alexis Biochemicals (Coger, Paris, France) was used at 50 ng/ml and the anti-Flag (M2) antibody (Sigma Adrich; St. Quentin Fallavier, France) at 2 µg/ml. For Western blotting, the antibodies used were: anti-caspase-3 (H-277, Santa Cruz Biotechnology, Inc), anti-caspase-8 (Alexis), anti-caspase-9 (Cell Signaling), polyclonal anti-TRAIL (Abcam) and peroxidase-conjugated goat anti-rabbit and anti-mouse antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA). For immunofluorescence, antibodies used were: monoclonal anti-DR4, anti-DR5 (Alexis Biochemicals), and monoclonal anti-TRAIL (eBioscience, France). Monoclonal anti-ceramide antibodies (clone 15B4) were from Alexis Biochemicals. Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) conjugate and 546-Alexa (red) goat anti-mouse IgG were from Molecular Probes. FITC-coupled cholera toxin subunit B, methyl-β-cyclodextrin and nystatin were from Sigma.

Cell lines and culture

MDA-MB 231 human breast carcinoma cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Culture media and supplements were purchased from Invitrogen. All cells were maintained at 37°C, 5% CO₂ in a HERA cell 150 humidified incubator (Thermo). MDA-MB 231 cells were grown in Leibovitz L-15 medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated foetal bovine serum and 10,000 units/ml streptomycin and penicillin. The human colon carcinoma cell lines SW620 and SW480 are routinely kept in the laboratory and were used as a control in a few experiments.

Morphological assessment by MGG staining

After 24 h of incubation with 0.5 µM Dox or Dox-CPPs, 2 × 10⁴ cells were washed with PBS, centrifuged and then stained with May-Grunwald solution (Merck, France) for 3 min, and with Giemsa solution (Merck, France) for 10 min at room temperature as described [20]. The cells were analyzed using a light microscope (Zeiss) to differentiate necrosis from apoptosis. Apoptotic cells were identified by the criteria of characteristic cell shrinkage and nuclear condensation.

Clonogenic cell survival assay

Cells grown in six-well plates were incubated with Dox or Dox-CPPs for 2 h in the presence or absence of 10 µg/ml Fc-R1 or Fc-R2 soluble chimeras. After treatment, cells were plated in 60 mm culture dishes at a density of 500 cells per dish in Leibovitz L-15 medium containing 10% FBS and then incubated for 14 days. Colonies were fixed

and stained with 1% crystal violet (Sigma) in 10% methanol and counted.

Identification of apoptotic cells

Apoptosis was analyzed by staining nuclear chromatin with Hoechst 33342 dye. Briefly, untreated and Dox-treated cells were collected, washed with PBS, stained with 5 µg/ml Hoechst 33342 dye for 10 min at 37°C, mounted on glass slides, and observed by fluorescence microscopy. The percentage of apoptotic cells (chromatin condensation and nuclear fragmentation) was determined by counting at least 300 cells in each sample.

Flow cytometry analysis of death receptors

Cell surface expression of DR4 and DR5 was detected by incubation of trypsinized cells with primary antibodies before washing and incubating with 488-Alexa (green) goat anti-mouse IgG (H+L) secondary antibody. Fluorescence intensity was monitored using a FACS Calibur (Becton-Dickinson).

Reverse transcription-PCR analysis

To detect the TRAIL transcripts in MDA-MB 231 cells, mRNA was isolated using the Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). A cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using AMV reverse transcriptase. The cDNA for TRAIL and GAPDH were amplified by PCR with specific primers. The sequences of the sense and antisense primers for TRAIL were 5'-CTTCACAGTGCTCCTGCAGT-3' and 5'-TTAGC CAACTAAAAAGGCCCC-3' and GAPDH 5'-ACCACA GTCCATGCCATCAC-3' and 5'-TCCACCACCCTGTTGC TGTA-3'. PCR products were analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide, and photographed using UV illumination. PCR products were normalized to GAPDH expression.

Protein extraction and Western blot analysis

For the study of TRAIL protein expression by Western blot, cells were lysed for 30 min in ice-cold Triton lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 0.1% Triton X-100, 100 mM NaCl, 10 mM NaPP, 10 mM NaF, 1 mM EDTA pH 8, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 1 mM EGTA pH 7.6, 5 µg/ml aprotinin, 5 µg/ml leupeptin and 5 µg/ml pepstatin). To monitor caspase-cleavage, cells were lysed in a hot Laemmli buffer (60 mM Tris pH 6.8, 10% glycerol and 2% SDS) and DNA was disrupted by sonication. Cell debris was removed by centrifugation at 15,000 rpm for 15 min at 4°C. Proteins were quantified using the Bicinchoninic Acid

(BCA) assay kit (Sigma–Aldrich) according to the manufacturer’s specifications. Forty microgram of protein lysate were added to loading buffer (60 mM Tris–HCl, pH 6.8, 0.18 M β -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.005% bromophenol blue), boiled and separated on a polyacrylamide gel by SDS–PAGE under reducing conditions. The proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Hybond-P, Amersham Biosciences). Membranes were blocked for at least 1 h in Tris-buffered saline (TBS), 5% BSA and 0.5% Tween 20 and then probed with the appropriate primary antibodies in 5% BSA, 0.1% Tween 20, and 0.05% sodium azide in TBS for 1 h at room temperature or overnight at 4°C and thereafter incubated with the appropriate secondary peroxidase-labeled antibody for 1 h at room temperature. Enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) was used for protein detection.

Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, cells were harvested by trypsinization, washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C. Non-specific binding was blocked by incubating cells in 3% BSA for 1 h. For TRAIL, DR4, DR5 and ceramide cell surface detection, cells were incubated with the indicated primary antibodies for 1 h and then with the respective fluorescent secondary antibodies for 45 min. FITC-coupled cholera toxin subunit B (Ctx) for raft staining (6 μ g/ml) was added at the same time than the secondary antibody to stain membrane rafts. Cells were then washed and mounted onto microscope slides using Dako antifade mounting reagent (Molecular Probes). Cells were subsequently viewed and photographed on a Zeiss fluorescence microscope. Non-relevant isotype-matched antibodies were used as negative controls in all staining.

Cholesterol depletion and sequestration

For cholesterol depletion, 10^5 cells/ml were pre-treated with the following cholesterol-depleting agents: 2.5 mg/ml methyl- β -cyclodextrin (MCD) or 5 μ g/ml nystatin in serum-free medium for 1 h at 37°C and then incubated with Dox (2.5 μ M) or Dox–CPPs (0.5 μ M) for 24 h (cells in serum-containing medium). Thereafter, death receptors clustering and effect on apoptotic cell percentage were analyzed as described above.

Ceramide measurement

Total ceramide content was determined by FACS analysis. MDA-MB 231 cells untreated or treated with Dox–CPPs (0.5 μ M) or Dox (2.5 μ M) or Dox (0.5 μ M) + C2-

ceramide for 24 h, were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C, and permeabilized with 0.1% saponin. Non-specific binding was blocked by incubating cells in 3% BSA for 1 h. The ceramide staining was performed using anti-ceramide antibodies clone 15B4 for 1 h, followed by a 30 min staining with FITC-goat anti-mouse IgM antibody and FACS analysis.

Results

Dox and Dox–CPPs induce apoptotic cell death

MDA-MB 231 cells were treated 24 h with the indicated concentrations of Dox and Dox–CPPs and as shown in Fig. 1a, typical morphological features of apoptotic cells (nuclear and cytoplasmic condensation) were specifically detected in these cells compared to untreated cells. Then, we quantified apoptotic cells by Hoechst 33342 staining. As shown in Fig. 1b, in all cases, Dox–CPPs induced a time-dependent increase in the percentage of apoptotic cells in MDA-MB 231 cells. Moreover, these conjugated Dox compounds were very efficient at inducing apoptosis even at the lowest tested dose of 0.5 μ M. In contrast, unconjugated Dox had to be used at 2.5 μ M to reach a comparable effect. These data are in accordance with the known resistance to Dox of MDA-MB 231 cells [21] and with our previous results showing that this resistance can be circumvented with the use of Dox–CPPs [4, 5].

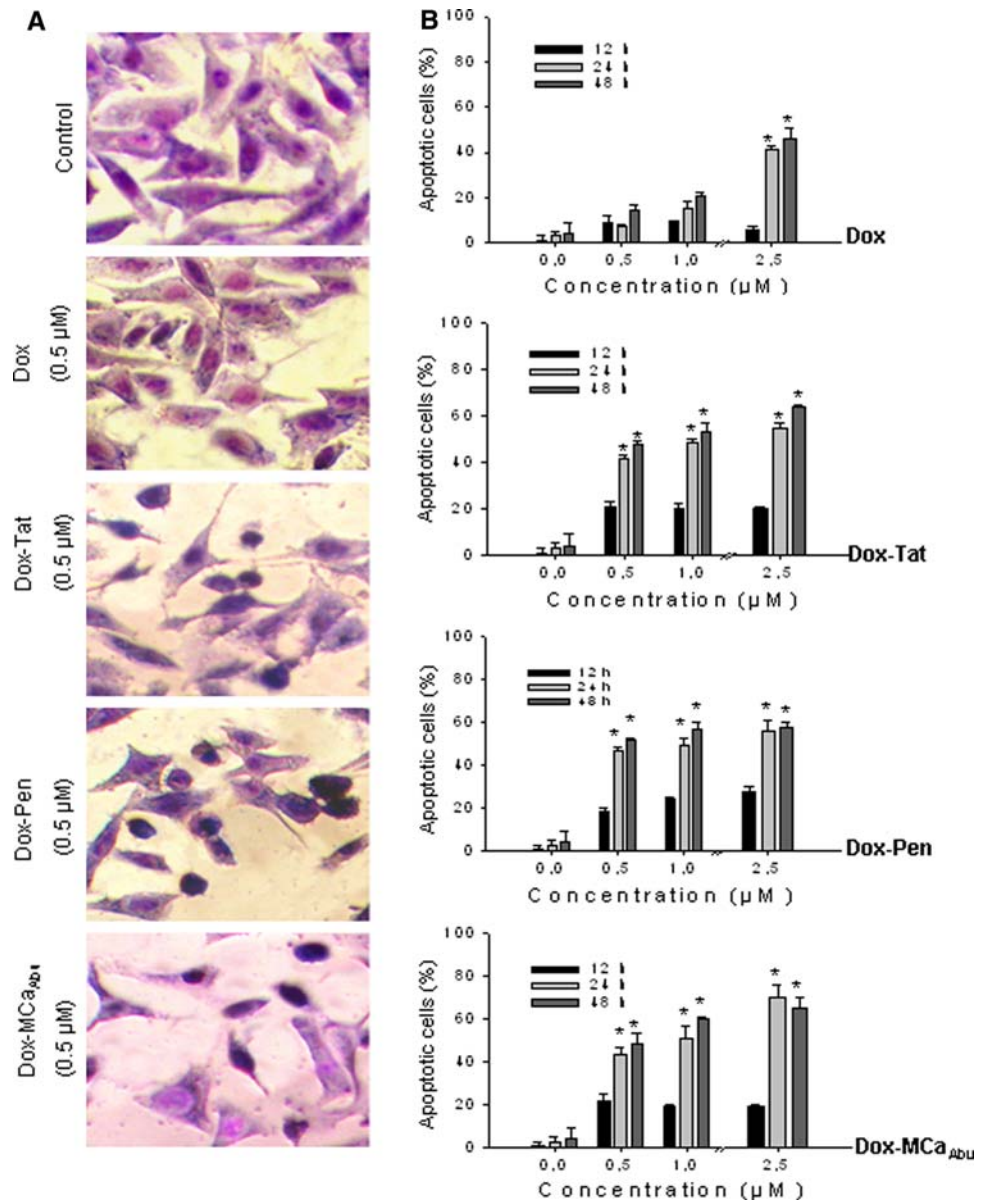
Expression of DR4 and DR5 at the plasma membrane of MDA-MB 231 cells and their contribution to apoptotic signaling by Dox–CPPs

Our previous data had shown that the more efficient cell killing properties of Dox–CPPs were largely insensitive to Bcl-2 expression. These properties differed from the apoptotic signaling induced by unconjugated Dox which is initiated at the mitochondria and inhibited by Bcl-2 [5]. The major mitochondria-independent apoptotic pathway is triggered by activation of death receptors, such as Fas or TRAIL-Rs in type I cells [22]. Moreover, it has been reported that Dox can sensitize several cell types to TRAIL-induced apoptosis, including solid tumour cells [23].

Cell surface expression of TRAIL receptors (DR4 and DR5) was evaluated by flow cytometry and both receptors were found to be expressed in MDA-MB 231 cells (Fig. 2a). Most interestingly, examination of the cells in fluorescence microscopy showed that all three Dox conjugates triggered increased expression of both receptors at the cell membrane as well as their redistribution into membrane patches (Fig. 2b). In contrast, whereas cells

Apoptosis

Fig. 1 Cell death induction by Dox, Dox-Tat, Dox-Pen and Dox-MC_aAbu. **a** Morphological aspect of MDA-MB 231 cells ongoing apoptosis was analyzed by May-Grunwald Giemsa staining. **b** Percentage of apoptotic cells was measured by Hoechst 33342 staining during exposure to drugs. Results are presented as mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$ in comparison with the control cells



treated with Dox also exhibited increased DR4 and DR5 cell surface expression, the distribution of these receptors remained uniform around the cells, comparable to that in control cells (Fig. 2b).

In order to determine whether TRAIL could be involved in Dox-induced apoptotic signaling, MDA-MB 231 cells were treated with Dox in the presence of the soluble recombinant chimeras Fc-R1 or Fc-R2, that interact with TRAIL and thus prevent its binding to the plasma membrane DR4 and DR5 receptors, respectively. Both Fc-R1 and Fc-R2 chimeras were found to efficiently reduce apoptosis induced by Dox-CPPs, whereas they had no effects on unconjugated Dox-induced apoptosis (Fig. 3a). This decrease in the rate of apoptosis denoted a true, long term cell survival as judged by the recovery of high levels

of clonogenic cells in cells treated with Dox-CPPs and soluble Fc-Rs compared with cells treated with Dox-CPPs alone (Fig. 3b). These results suggested that TRAIL was involved in Dox-CPPs-induced cell death and that, in contrast, this ligand played no role in unconjugated Dox-triggered cell death. Moreover, inasmuch as the experiments were performed without addition of exogenous TRAIL, they also implied that TRAIL might be endogenously expressed by MDA-MB 231 cells.

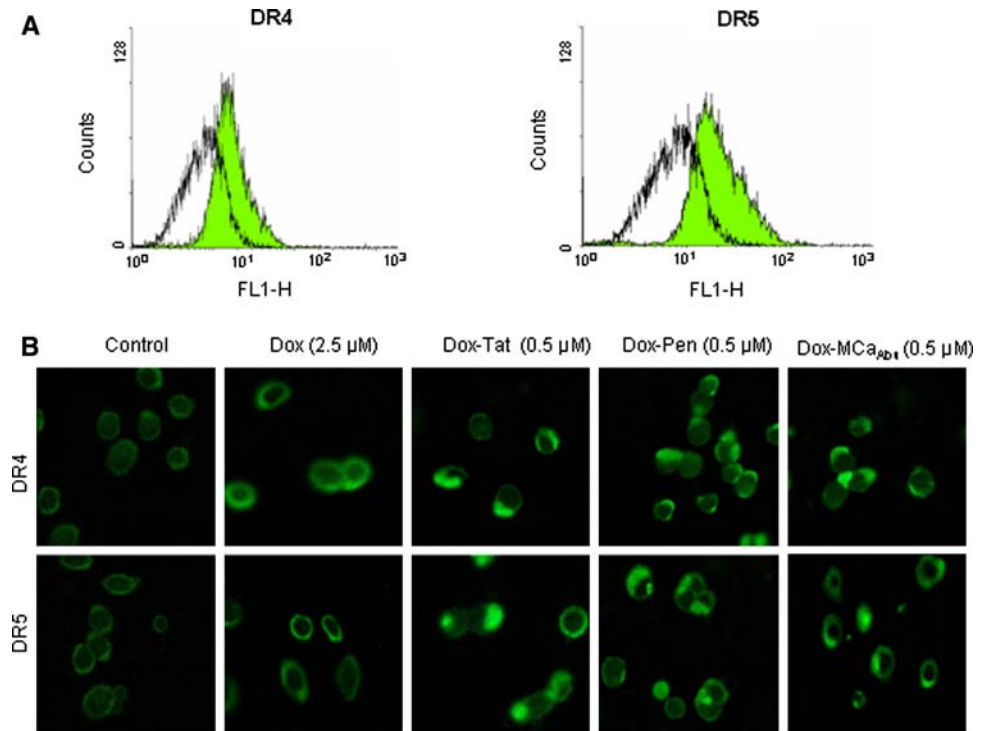
Constitutive expression of TRAIL at the plasma membrane of MDA-MB 231 cells

In order to test whether MDA-MB 231 cells could express TRAIL, we evaluated the expression of the corresponding

Fig. 2 Contribution of TRAIL receptors to apoptotic signaling.

a Cell surface expression of TRAIL receptors DR4 and DR5 in MDA-MB 231 cells was analyzed by flow cytometry. Cells were incubated with anti-DR4, or anti-DR5 (dark line) or with mouse IgG1 (light line) followed by Alexa-488 goat anti-mouse IgG.

b Immunostaining analyzed by fluorescence microscopy of DR4 and DR5 in MDA-MB 231 cells exposed to vehicle (control), Dox (2.5 μ M) or Dox-CPPs (0.5 μ M) for 24 h

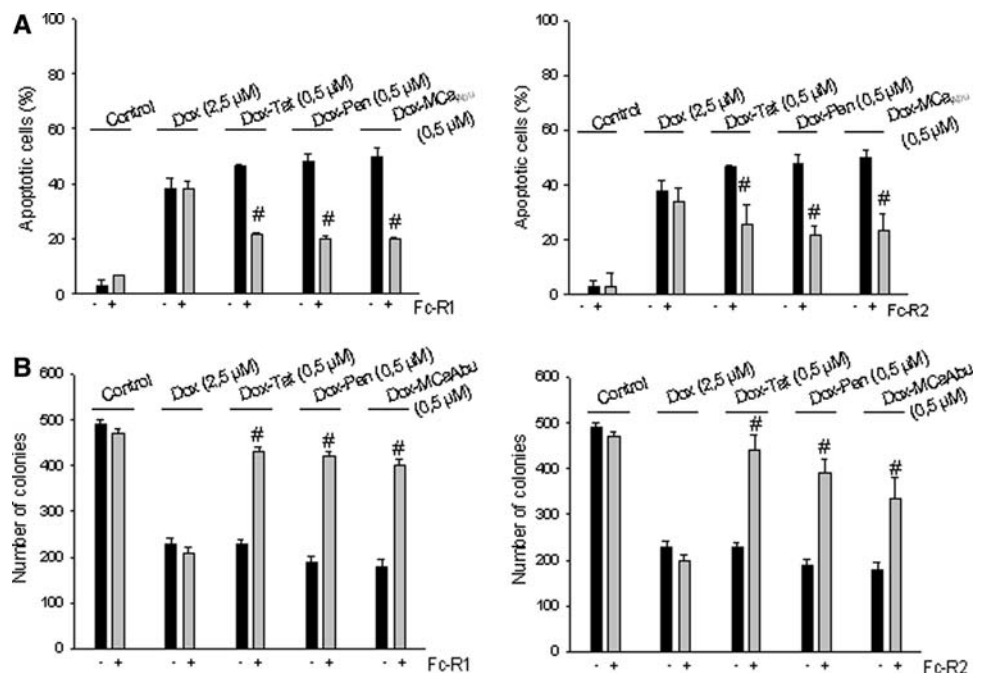


mRNA by RT-PCR and found that it was constitutively present (Fig. 4a). The TRAIL protein was likewise found to be expressed in these cells (Fig. 4b) but was not detected in two colon cancer cell lines (SW620 and SW480) used as negative controls. Finally, we could show by fluorescence microscopy that TRAIL was correctly localized at the membrane of the MDA-MB 231 cells. We reasoned that constitutive TRAIL expression at the cell membrane

should necessitate a resistance of MDA-MB 231 cells to TRAIL-induced apoptosis, as the cells would otherwise kill themselves. Indeed, addition of recombinant TRAIL to MDA-MB 231 cells did not trigger apoptotic cell death (Fig. 4d) and caspases were not activated, including the apical caspase-8 (Fig. 4e). In contrast, apoptosis of Dox and Dox-CPPs treated cells was increased in the presence of TRAIL (Fig. 4f). Altogether, these results seem to

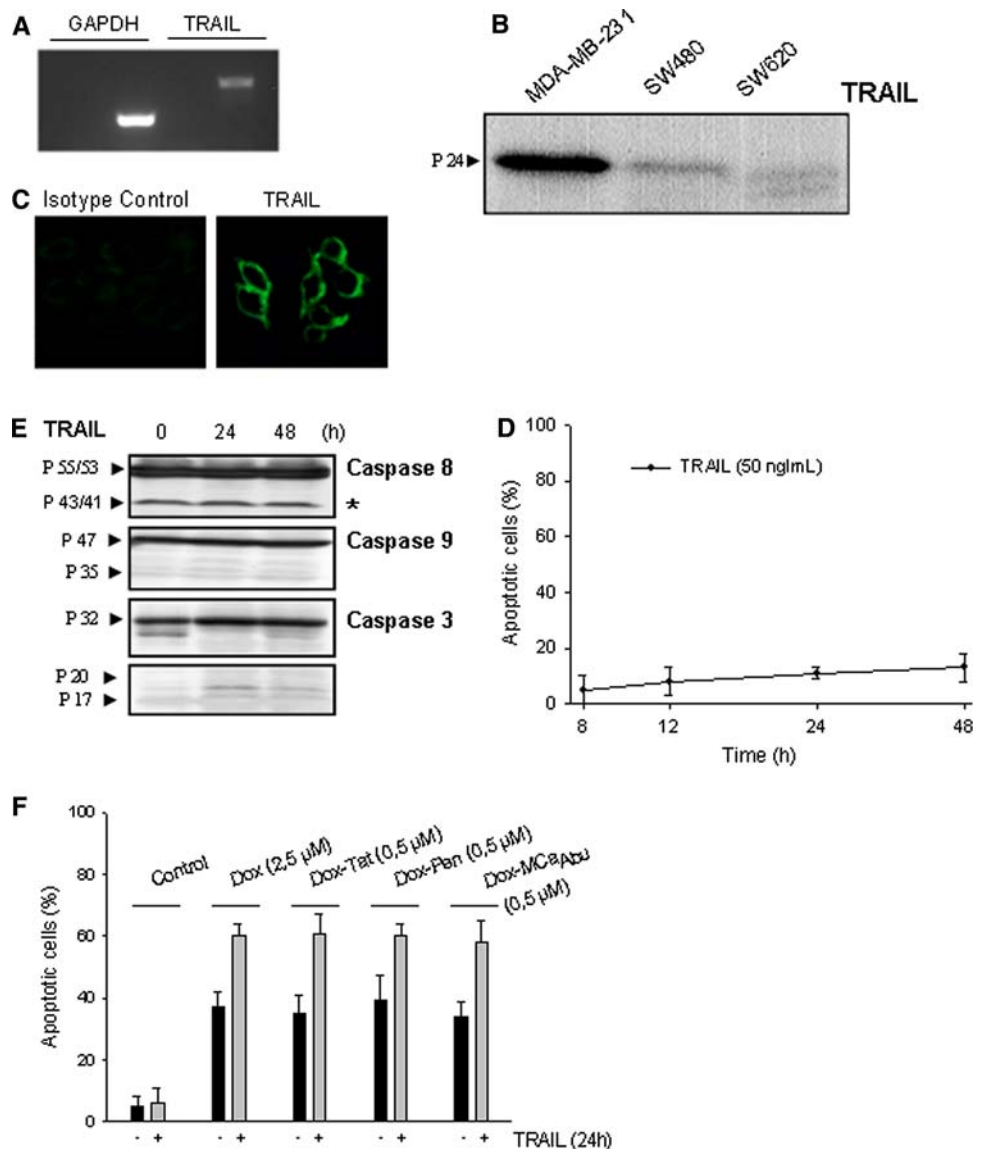
Fig. 3 Inhibitory effect of Fc-R1 or Fc-R2 soluble chimeras.

a MDA-MB 231 cells were incubated with Dox (2.5 μ M) or Dox-CPPs (0.5 μ M) for 24 h in the presence of 10 μ g/ml Fc-R1 or Fc-R2 soluble chimeras. Apoptotic cell percentage was determined after Hoechst 33342 nuclear staining. **b** Clonogenic assay was performed with control and Dox-treated cells. The data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Significant difference ($P < 0.0001$, t -test) between Dox-CPPs-treated cells and Dox-CPPs treated cells in the presence of soluble TRAIL-R is indicated by #



Apoptosis

Fig. 4 Constitutive expression of TRAIL in MDA-MB 231 cells. **a** Expression of TRAIL mRNA assessed by RT-PCR. **b** Expression of TRAIL protein in MDA-MB 231 cells determined by Western blotting. SW620 and SW480 cells were used as negative control. **c** Immunostaining of TRAIL analyzed by fluorescence microscopy in MDA-MB 231 cells. **d** MDA-MB 231 cells are resistant to TRAIL-induced apoptosis as shown by percentage of apoptotic cells during exposure of cells to 50 ng/ml of recombinant TRAIL. **e** Caspase cleavage during TRAIL treatment assessed by Western blot analysis using appropriate antibodies. Pro-caspase-8: p55/53, * non-specific band, pro-caspase-9: p47 and pro-caspase-3: p32. No cleavage fragment was detected for any of these caspases. **f** Dox and Dox-CPPs sensitize MDA-MB 231 cells to exogenous TRAIL-mediated cell death. Apoptotic cells were determined by Hoechst 33342 staining after co-treatment with Dox (2.5 μ M) or with Dox-CPPs (0.5 μ M) and 50 ng/ml of recombinant soluble TRAIL for 24 h



indicate that Dox-treatment sensitizes MDA-MB 231 cells to TRAIL. This sensitization to TRAIL by unconjugated Dox could be linked to increased receptor density shown in Fig. 2b. In the case of Dox-CPPs, the fact that exogenous TRAIL increases cell killing might indicate that endogenous membrane-bound TRAIL is not sufficient to saturate the receptors.

Dox-CPPs induce the redistribution of TRAIL receptors in lipid rafts

Clustering of death receptors into lipid rafts has been shown to account for the sensitization to TRAIL by various compounds [24, 25]. These studies led us to investigate whether the Dox-CPPs induced TRAIL receptor redistribution that we observed occurred in lipid rafts. To this end,

we determined whether the clusters of DR4 and DR5 colocalized with membrane rafts. Untreated cells and cells treated with Dox or Dox-CPPs for 24 h were studied by immunofluorescence using antibodies against DR4, DR5 and FITC-coupled-Cholera toxin B (FITC-Ctx) which complexes with the raft GM1-ganglioside components. In Dox-CPPs treated cells, both DR4 and DR5 colocalized with FITC-Ctx but this was not the case for unconjugated Dox (Fig. 5a, b). Furthermore the use of methyl- β -cyclodextrine (MCD) or nystatin, which interfere with lipid rafts formation by cholesterol depletion and sequestration [26, 27], inhibited Dox-CPPs induced formation of DR4 and DR5 clusters (data not shown) as well as apoptosis induced by Dox-CPPs (Fig. 5c, d). In contrast, apoptosis induced by Dox was not affected by these compounds. These findings indicate that Dox-CPPs trigger the clustering of TRAIL

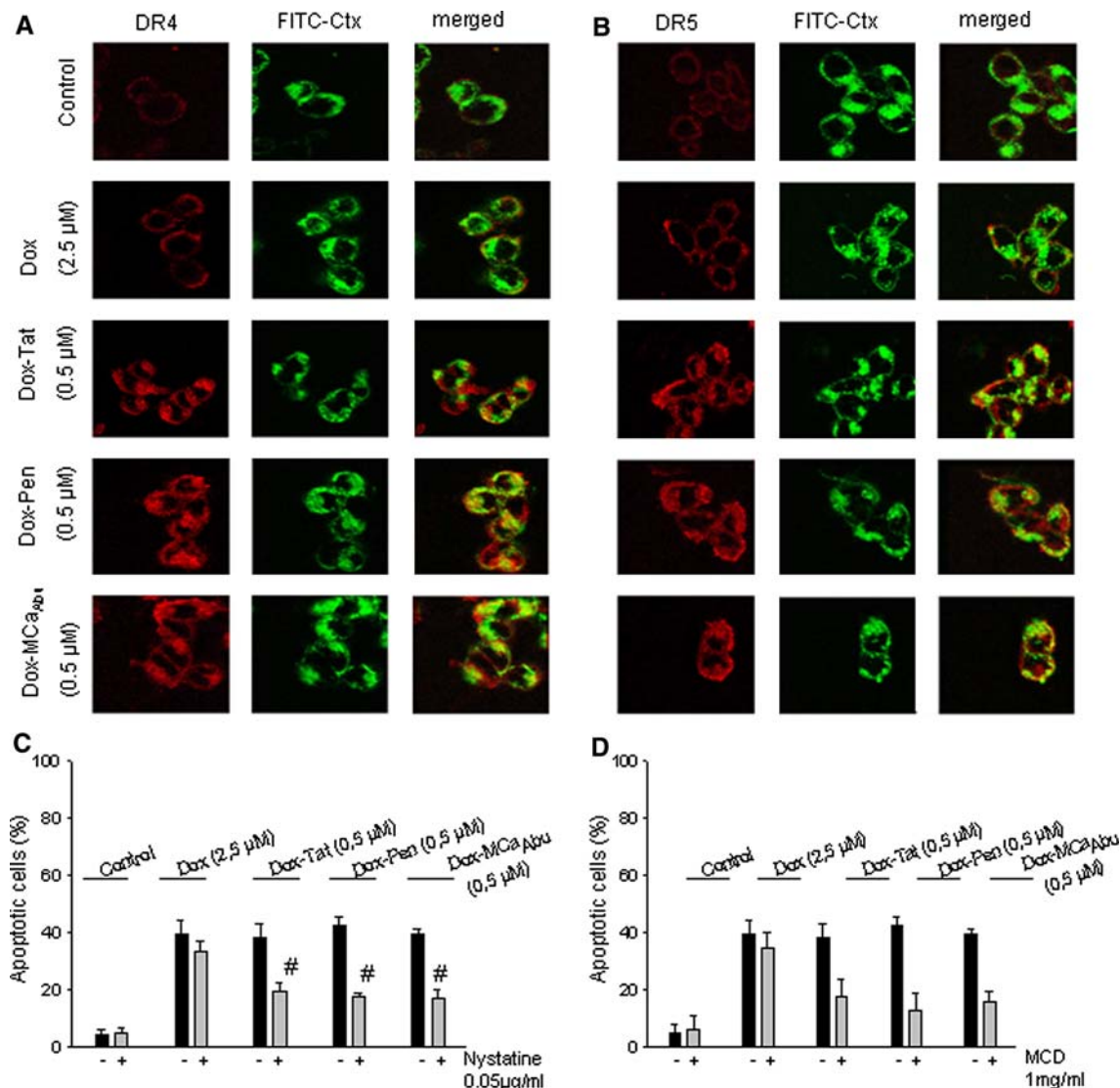


Fig. 5 Dox-CPPs induce DR4 and DR5-clustering in membrane lipid rafts. MDA-MB 231 cells were treated with 0.5 μ M Dox-CPPs or 2.5 μ M Dox. **a, b** Fluorescence microscopy analysis was performed using FITC-coupled cholera toxin subunit B (Ctx) and 546-Alexa (red)-labeled anti-DR5 and anti-DR4 antibodies. The results are representative of three independent experiments. **c, d** Cells

were treated with Dox-CPPs or Dox in the presence or absence of 0.05 μ g/ml nystatine or 1 mg/ml MCD. Dox or Dox-CPPs were added to the cells for 24 h and MCD or nystatine were added only for the last 12 h, to avoid extended cytotoxicity induced by these molecules. Apoptotic cells were determined by Hoechst 33342 staining. # ($P < 0.01$)

receptors into specific plasma membrane lipid microdomains and that this localization is central to the cell sensitization to endogenous TRAIL-induced apoptosis.

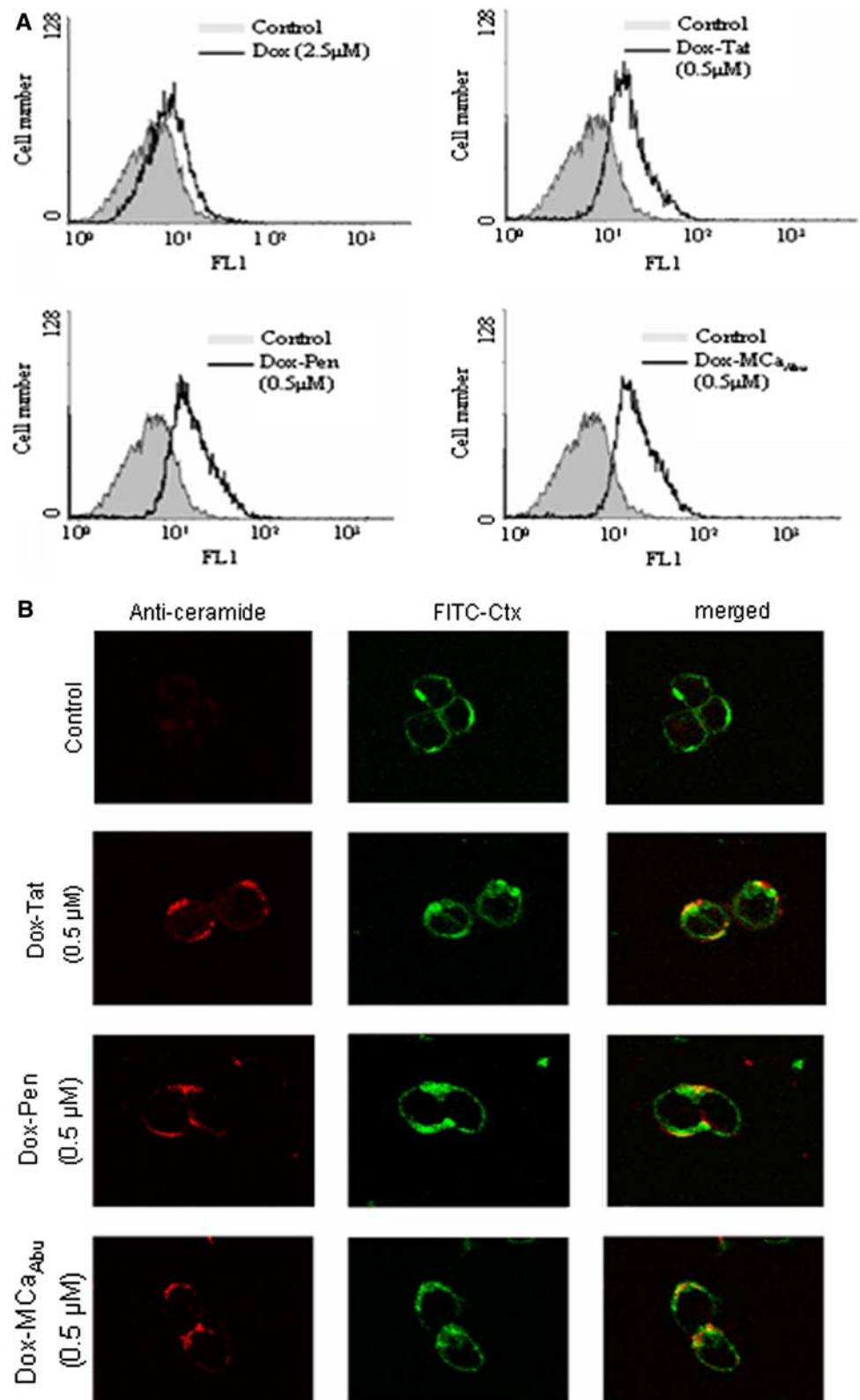
Role of ceramide in Dox-CPPs induced apoptosis

Recently, it has been shown that generation of ceramide within lipid rafts permits their stabilization and is required for efficient clustering and full activation of death receptors [14]. In order to ascertain whether ceramide could be a mediator for the apoptotic effect induced by Dox-CPPs, we measured total ceramide content in cells treated with the various Dox compounds. As shown in Fig. 6a, all three

Dox conjugates led to ceramide generation, whereas unconjugated Dox did not. Examination of cells by fluorescence microscopy showed that ceramide, as revealed with an anti-ceramide antibody, was present at the membrane of Dox-CPPs treated cells and co-localized with lipid rafts detected with FITC-Ctx (Fig. 6b).

We therefore investigated whether addition of cell-permeant exogenous ceramide to MDA-MB 231 cells exposed to low doses of unconjugated Dox (0.5 μ M) could increase the level of apoptotic cells. We first tested the toxicity of C2-ceramide alone on these cells and selected the highest concentration that did not induce cell killing by itself, i.e., 20 nM (data not shown). Results presented in Fig. 7a show

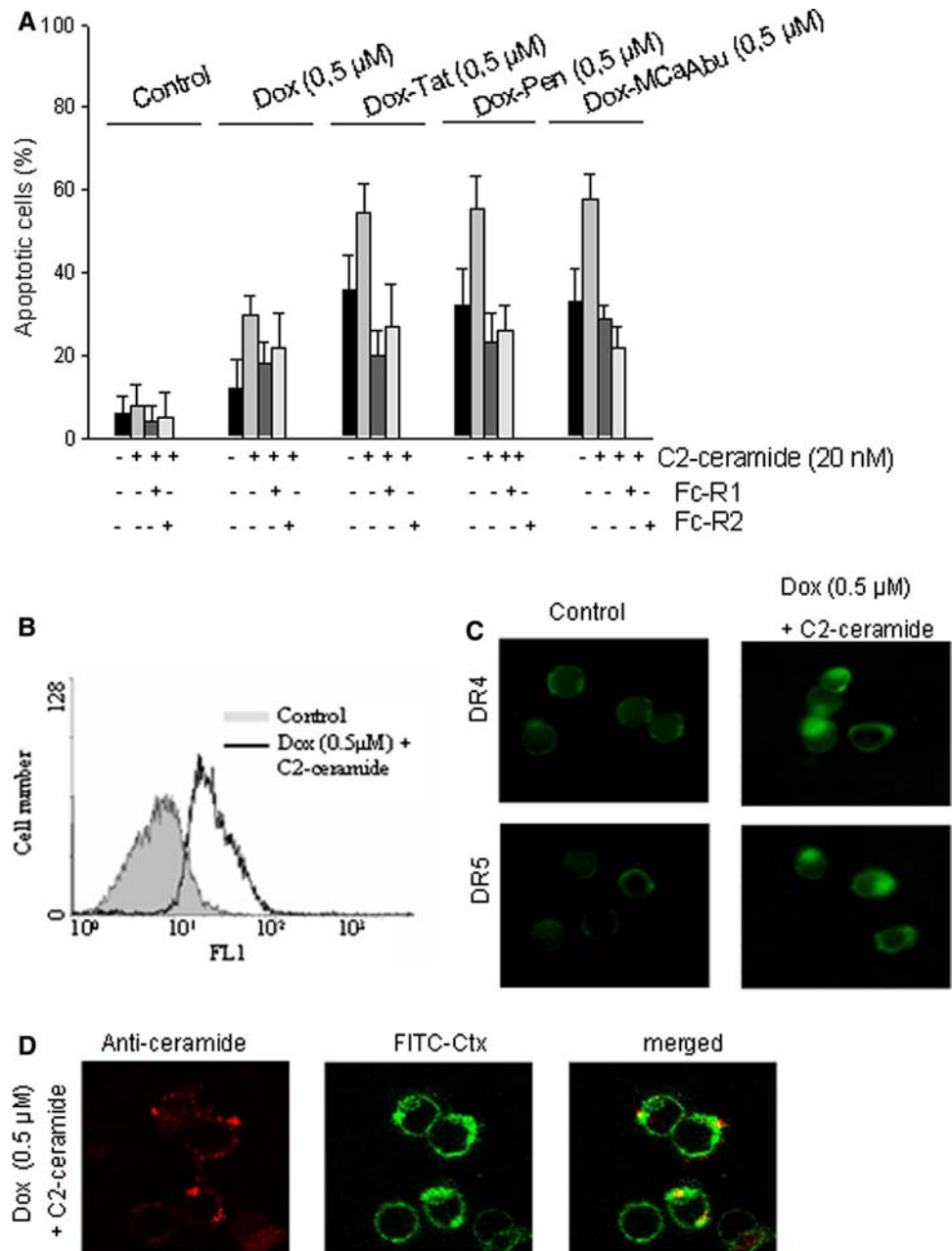
Fig. 6 Dox–CPPs treatment induces increase of ceramide level and ceramide co-localisation into rafts-enriched membrane platforms. **a** FACS analysis of ceramide content with anti-ceramide antibody. **b** Stimulation of MDA-MB 231 cells with 0.5 μ M Dox–CPPs for 24 h results in the formation of ceramide clusters in lipid rafts as visualized by fluorescence microscopy



that exogenous ceramide sensitized MDA-MB 231 cells to unconjugated Dox and that this enhanced cell killing was reverted in the presence of soluble Fc–Rs, indicating that TRAIL signaling was involved in the increased cell death.

Exogenous ceramide also further sensitized MDA-MB 231 cells to Dox–CPPs in a Fc–Rs sensitive manner denoting that the endogenous ceramide generated by Dox–CPPs might not saturate the system.

Fig. 7 **a** Apoptotic cells were determined by Hoechst 33342 staining after co-treatment of cells with 20 nM C2-ceramide and Dox or Dox–CPPs in the presence or absence of Fc-R1 or Fc-R2. The data are the mean $\pm$ SD of three independent experiments. **b** FACS studies of ceramide content in C2-ceramide treated cells. **c** Formation of TRAIL-R clusters after co-treatment of MDA-MB 231 cells with C2-ceramide and Dox (0.5 μ M). **d** Analysis of ceramide distribution in cells treated with C2-ceramide and Dox



Analysis of ceramide content in MDA-MB 231 cells incubated in the presence of C2-ceramide confirmed that the compound had been incorporated into the cells (Fig. 7b). Moreover, addition of exogenous ceramide resulted in clustering of DR4 and DR5 receptors in unconjugated Dox-treated cells (0.5 μ M) (Fig. 7c) in a manner similar to that observed with Dox–CPPs used at the same dose but without exogenous ceramide (Fig. 2c). Finally, immunofluorescence studies showed that, in Dox (0.5 μ M) and C2-ceramide treated cells, ceramide co-localized at the cell membrane with lipid rafts (Fig. 7d),

analogous to the images obtained with Dox–CPPs in the absence of exogenous ceramide (Fig. 6a).

Altogether, these data suggest that induction of TRAIL-signaling by Dox–CPPs is a consequence of receptor clustering into ceramide-enriched lipid rafts. Unconjugated Dox is unable to induce ceramide generation in MDA-MB 231 cells, but addition of exogenous ceramide permits the clustering of TRAIL receptors in cells treated with Dox, leading to increased apoptosis due to the triggering of an endogenous TRAIL-mediated, cell death pathway.

Discussion

In this study we show that, in breast cancer MDA-MB 231 cells, the increased level of apoptosis induced by Dox-CPPs compared to unconjugated Dox is mainly due to the induction of an additional, TRAIL-dependent cell death pathway by the conjugates.

We report that MDA-MB 231 cells are intrinsically resistant to TRAIL despite membrane expression of DR4 and DR5 TRAIL-Rs. Sensitization to TRAIL-induced apoptosis by combination treatment with various chemotherapeutic drugs, including doxorubicin, has been repeatedly reported and in most cases attributed to increased expression of DR4 and/or DR5 receptors following drug treatment [23, 28–30]. Indeed, we observed that treatment of MDA-MB 231 cells with Dox-CPPs (0.5 μ M) or Dox (2.5 μ M) led to upregulation of DR4 and DR5 expression at the membrane. Concomitant exposure of the cells to Dox or Dox-CPPs and recombinant TRAIL was found to increase the apoptotic rate above that mediated by Dox or Dox-CPPs alone. Therefore, all four Dox variants are able to sensitize MDA-MB cells to exogenous TRAIL.

However, these data did not provide any explanation to our observation that Dox-CPPs could induce MDA-MB 231 cell death at doses five times lower than that needed for unconjugated Dox. During microscopic examination of DR4 and DR5 receptors in Dox-treated cells, major differences were noted. Whereas these receptors distribute evenly within the cell when Dox is used, they concentrate into well-defined patches at the cell membrane when the cells are exposed to Dox-CPPs, a proximity that could lead to the TRAIL-Rs aggregation. The oligomerisation of death receptors is induced by the corresponding ligand (Fas-L, TNF, TRAIL) and is an obligate first step for triggering death signaling [31]. However, in rare cases, it has been reported that induction of Fas aggregation by certain anti-tumor drugs was sufficient to initiate apoptotic signaling in the absence of the ligand [18, 32, 33]. To our knowledge, apoptosis-induction by aggregated TRAIL receptors in the absence of the corresponding ligand has never been reported. It is possible to distinguish between the two possibilities in vitro with the use of soluble receptor chimeras that interact with and neutralize the ligand. Such experiments demonstrated that roughly half of the apoptotic response of MDA-MB 231 cells was abrogated with the use of such soluble DR4 or DR5 receptors in cells treated with Dox-CPPs whereas Dox-induced apoptosis was not affected.

In subsequent experiments, we showed that MDA-MB 231 cells constitutively express TRAIL at their membrane, thus providing an explanation for the inhibitory effect of the soluble receptors in the absence of exogenously added TRAIL. To our knowledge, expression of TRAIL in tumor

cells has very rarely been reported. The MDA-MB 231 cell line originates from a pleural effusion of a basal breast adenocarcinoma [34]. In an interesting study, elevated FasL was detected in all tested malignant cells of pleural effusions and it was suggested that, in this microenvironment where large numbers of lymphocytes are present, expression of FasL could help tumor cells in escaping immune attack by killing activated lymphocytes [35]. It could be interesting to study a similar collection of malignant pleural effusions to determine whether TRAIL is also frequently expressed in these cancer cells.

In any case, TRAIL-expression in MDA-MB 231 cells can explain why these otherwise TRAIL-resistant cells could in some circumstances kill themselves through TRAIL-Rs activation and clearly, one of these circumstances is treatment with Dox-CPPs but not with unconjugated Dox. Such a sensitization to endogenous TRAIL-induced cell death is linked to the induction of DR4 and DR5 caps at the cell membrane. Evidence has been accumulating that, in order to induce efficient apoptotic signaling, death receptors aggregation must occur in lipid rafts [36, 37]. Simultaneous labelling of the raft component GM1-ganglioside and of the DR4 or DR5 receptors allowed us to determine that indeed, the observed TRAIL receptor clusters induced by Dox-CPPs were localized in membrane lipid rafts. Moreover, the cholesterol-sequestering drugs β -cyclodextrin and nystatin, which negatively interfere with raft formation, decreased Dox-CPPs-induced apoptosis whereas, as expected, these compounds did not interfere with Dox-induced cell death. These microscopy studies also showed that, as detected with FITC-Ctx, lipid rafts had the same appearance in control or Dox-treated cells. So, we tried to determine why TRAIL receptors accumulated in rafts only when the cells were treated with Dox-CPPs.

Several studies have shown that clustering and activation of Fas or TRAIL-Rs necessitates generation of ceramide and its incorporation into rafts to form ceramide-enriched platforms [14]. This process involves the translocation of ASM (acid sphingomyelinase) to the extracellular leaflet of the membrane where it can hydrolyse sphingomyelin, a major component of the rafts. This is classically triggered by ligation of the receptor with the corresponding ligand. In control MDA-MB 231 cells, we could not detect the presence of ceramide in membrane rafts, probably indicating that endogenous TRAIL is not able to activate ASM. Measurement of total ceramide content in the cells by FACS analysis with an anti-ceramide antibody showed that they contained only a very small amount of ceramide. In contrast, the same analysis performed with Dox-CPPs treated cells revealed a large increase in ceramide content, which was not observed with Dox. Microscopy analysis showed that, in such Dox-CPPs treated cells, ceramide was found within the membrane rafts. Thus, the sensitization of MDA-MB 231 to

TRAIL seems to be due to ceramide generation by Dox–CPPs followed by TRAIL-Rs aggregation. This hypothesis was further confirmed by the observation that addition of permeant C2-ceramide to cells treated with a low dose of unconjugated Dox led to ceramide incorporation into membrane rafts, clustering of DR4 and DR5 receptors and increased level of apoptosis in a soluble Fc-Rs sensitive pathway. Exogenous ceramide therefore could sensitize cells treated with unconjugated Dox to apoptosis triggered by endogenous TRAIL.

It is interesting to note that, at the dose used, C2-ceramide alone was unable to sensitize the cells to endogenous TRAIL-induced cell death and needs the presence of unconjugated Dox indicating that the increased TRAIL-R density triggered by Dox is necessary. We also noticed that C2-ceramide could further augment apoptosis induced by Dox–CPPs and believe that this is due to additional clustering of the receptors, above that mediated by endogenously generated ceramide alone. It remains to be determined why Dox–CPPs increase ceramide content in MDA-MB 231 cells while unconjugated Dox does not. In that respect, there might be differences between cancer epithelial cells and lymphoid cells as Dox has been reported to increase ceramide production in leukemic B-cells [12]. It must first be stated that the activation of ASM by FasL or TRAIL is not firmly understood and appears to differ in each case, the former being attributed to minimal, initial caspase-8 activation [38] and the later to a redox mechanism [19]. In this later publication, the nature of the ROS leading to ASM activation during TRAIL-treatment was not clearly defined but they were found to be largely resistant to the antioxidant N-acetylcysteine (NAC). Interestingly, in our own previous work [5], we reported that both Dox and Dox–CPPs induced the generation of ROS in MDA-MB 231 cells but that they were of a different nature. In particular, whereas NAC efficiently neutralized ROS generated during Dox treatment and inhibited the apoptotic response, this compound was not able to prevent ROS accumulation during Dox–CPPs treatment and only marginally interfered with the apoptotic rate. Therefore, it could be interesting to investigate whether the specific ROS generated by Dox–CPPs are able, like those induced by TRAIL-treatment, to activate ASM.

Another possibly related to our previous observation could also explain why Dox–CPPs are more efficient to activate ASM. Indeed, we reported that unconjugated Dox distributes in the nucleus whereas Dox–CPPs are mainly present in the cytosol [4]. ASM is located largely in the endosomal/lysosomal compartments and it would seem that a cytosolic rather than nuclear distribution of Dox should facilitate its activation of ASM.

A role for ASM and Fas death receptors in the response of cancer cells to chemotherapy has been suggested with various anticancer drugs and these data have been elegantly

reviewed and commented [39]. Fewer studies have been performed for the TRAIL pathway but it seems that the potentialization of TRAIL-induced signaling by various compounds also involves the generation of ceramide-enriched membrane domains [40, 41].

MDA-MB 231 cells express Fas and Fas-L but are resistant to Fas-induced cell death. We did not thoroughly examine whether Fas/Fas-L could also be involved in the observed properties of Dox–CPPs but made several observations (not shown) which do not support this notion: first, Fas does not form clusters at the membrane of Dox–CPPs treated MDA-MB 231 cells and, in contrast to the effect of inhibitory Fc-Rs, the Fas blocking antibody ZB4 does not reduce Dox–CPPs-induced apoptosis; second, Dox–CPPs are unable to induce apoptosis in SW480 cells, which express Fas and Fas-L, but not TRAIL and are sensitive to Fas-triggering. Together, these results cannot formally exclude that Fas does not play any role but are clearly in favor a prominent involvement of the TRAIL-R pathway in Dox–CPPs-induced apoptosis.

Early-phase clinical trials using recombinant TRAIL or agonistic anti-TRAIL receptor antibodies have shown some anti-tumor responses, but further clinical developments will most likely combine TRAIL with anticancer agents known to sensitize to TRAIL [42]. From our data, it appears that Dox–CPPs represent promising agents to use in such combined therapy. Moreover, the study of MDA-MB 231 cells has shown that Dox–CPPs could sensitize these cells to endogenous and thus physiological levels of TRAIL, whereas all other studies in vitro only used exogenously added recombinant TRAIL or anti-TRAIL agonist antibodies. Therefore, as shown previously with bortezomib [43], it would be interesting to test whether Dox–CCPs could sensitize tumor cells to cytotoxic lymphocyte-mediated killing via TRAIL.

Acknowledgments We thank Dr. Eric Gulbins (Department of Molecular Biology, University of Duisburg-Essen, Germany) for kindly providing anti-ceramide antibody and Dr. Olivier Micheau (INSERM, U866, France) for kindly providing soluble TRAIL-R1-Fc and TRAIL-R2-Fc. SA acknowledges the support of the Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche scientifique et de la technologie (Tunisia) for financial support and the University of Monastir.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138–141
2. David BF, Pieter RC (2008) Liposomal nanomedicines. *Expert Opin Drug Deliv* 5:25–44. doi:10.1517/17425247.5.1.25
3. Gupta B, Levchenko TS, Torchilin VP (2005) Intracellular delivery of large molecules and small particles by cell-

- penetrating proteins and peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 28:637–651. doi:[10.1016/j.addr.2004.10.007](https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.10.007)
4. Aroui S, Ram N, Appaix F, Ronjat M, Kenani A, Pirolet F, De Waard M (2009) Maurocalcine as a non toxic drug carrier overcomes doxorubicin resistance in the cancer cell line MDA-MB 231. *Pharm Res* 28:836–845. doi:[10.1007/s11095-008-9782-110](https://doi.org/10.1007/s11095-008-9782-110)
5. Aroui S, Brahim S, De Waard M, Bréard J, Kenani A (2009) Efficient induction of apoptosis by doxorubicin coupled to cell-penetrating peptides compared to unconjugated doxorubicin in the human breast cancer cell line MDA-MB 231. *Cancer Lett Article in Press*, Corrected Proof. doi: [10.1016/j.canlet.2009.04.044](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.04.044)
6. Wesselborg S, Engels IH, Rossmann E, Los M, Schulze-Osthoff K (1999) Anticancer drugs induce caspase-8/FLICE activation and apoptosis in the absence of CD95 receptor/ligand interaction. *Blood* 93:3053–3063
7. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 17:1675–1687. doi: [10.1093/emboj/17.6.1675](https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1675)
8. Butler LM, Liapis V, Bouralexis S, Welldon K, Hay S, Thai le M, Labrinidis A, Tilley WD, Findlay DM, Evdokiou A (2006) The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL. *Int J Cancer* 119:944–954. doi:[10.1002/ijc.21939](https://doi.org/10.1002/ijc.21939)
9. Lagadec C, Adriaenssens E, Toillon RA, Chopin V, Romon R, Van Coppenolle F, Hondermarck H, Le Bourhis X (2008) Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 28:1472–1477. doi:[10.1038/sj.onc.1210749](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210749)
10. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 271:12687–12690
11. Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17:3261–3270
12. Dumitru CA, Carpinteiro TT, Hengge RU, Gulbins E (2007) Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* 12:1533–1541. doi: [10.1007/s10495-007-0081-9](https://doi.org/10.1007/s10495-007-0081-9)
13. Obeid LM, Linardic CM, Karolak LA, Hannun YA (1993) Programmed cell death induced by ceramide. *Science* 259:1769–1771. doi:[10.1126/science.8456305](https://doi.org/10.1126/science.8456305)
14. Bollinger CR, Teichgraber V, Gulbins E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* 1746:284–294. doi:[10.1016/j.bbamcr.2005.09.001](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.09.001)
15. Schutze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krone M (1992) TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced “acidic” sphingomyelin breakdown. *Cell* 71:765–776. doi:[10.1016/0092-8674\(92\)90553-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90553-O)
16. Zhang Y, Mattjus P, Schmid PC, Dong Z, Zhong S, Ma WY, Brown RE, Bode AM, Schmid HH, Dong Z (2001) Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276:11775–11782. doi:[10.1074/jbc.M006000200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006000200)
17. Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN (1994) Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 180:525–535. doi:[0022-1007/94/08/0525/11\\$2.00](https://doi.org/0022-1007/94/08/0525/11$2.00)
18. Lacour S, Hamann A, Grazide S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergeant O, Laurent G, Gamber P, Solary E, Dimanche-Boitrel MT (2004) Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 64:3593–3598
19. Dumitru CA, Gulbins E (2006) TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* 25:5612–5625. doi:[10.1038/sj.onc.1209568](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209568)
20. Zhao QL, Kondo T, Noda A, Fujiwara Y (1999) Mitochondrial and intracellular free calcium regulation of radiation-induced apoptosis in human leukemic cells. *Int J Radiat Biol* 75:493–504
21. Kim DS, Park SS, Nam BH, Kim IH, Kim SY (2006) Reversal of drug resistance in breast cancer cells by transglutaminase 2 inhibition and nuclear factor-kappaB inactivation. *Cancer Res* 66:10936–10943. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-06-1521](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1521)
22. Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003) The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 5(3):185–193. doi:[10.1016/S1044-5323\(03\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S1044-5323(03)00031-9)
23. Wu XX, Jin XH, Zeng Y, El Hamed AM, Kakehi Y (2007) Low concentrations of doxorubicin sensitizes human solid cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-receptor (R) 2-mediated apoptosis by inducing TRAIL-R2 expression. *Cancer Sci Dec* 98:1969–1976. doi:[10.1111/j.1349-7006.2007.00632.x](https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00632.x)
24. Delmas D, Rebe C, Mischeau O, Athias A, Gamber P, Grazide S, Laurent G, Latruffe N, Solary E (2004) Redistribution of CD95, DR4, and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 23:8979–8986. doi:[10.1038/sj.onc.1208086](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208086)
25. Psahoulia FH, Drosopoulos KG, Doubravska L, Andera L, Pintzas A (2007) Quercetin enhances TRAIL-mediated apoptosis in colon cancer cells by inducing the accumulation of death receptors in lipid rafts. *Mol Cancer Ther* 6:2591. doi:[10.1158/1535-7163.MCT-07-0001](https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0001)
26. Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39. doi:[10.1038/35036052](https://doi.org/10.1038/35036052)
27. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38:2264–2272
28. Shankar S, Chen X, Srivastava RK (2005) Effects of sequential treatments with chemotherapeutic drugs followed by TRAIL on prostate cancer in vitro and in vivo. *Prostate* 62:165–186. doi: [10.1002/pros.20126](https://doi.org/10.1002/pros.20126)
29. Kang J, Bu J, Hao Y, Chen F (2005) Subtoxic concentration of doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cell line LNCaP. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 8:274–279. doi:[10.1038/sj.pcan.4500798](https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4500798)
30. Jin X, Wu XX, Abdel-Muneem Nouh MA, Kakehi Y (2007) Enhancement of death receptor 4 mediated apoptosis and cytotoxicity in renal cell carcinoma cells by subtoxic concentrations of doxorubicin. *J Urol* 177:1894–1899. doi:[10.1016/j.juro.2007.01.018](https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.01.018)
31. Peter ME, Krammer PH (1998) Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10:545–551. doi: [10.1016/S0952-7915\(98\)80222-7](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80222-7)
32. Gajate C, Del Canto-Ja ez E, Ac  a AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, Veldman RJ, Mollinedo F (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200:353–365. doi:[10.1084/jem.20040213](https://doi.org/10.1084/jem.20040213)
33. Delmas D, R b  C, Lacour S, Filomeno R, Athias A, Gamber P, Cherkaoui-Malki M, Jannin B, Dubrez-Daloz L, Latruffe N, Solary E (2003) Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 278:41482–41490. doi:[10.1074/jbc.M304896200](https://doi.org/10.1074/jbc.M304896200)
34. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct

- cancer subtypes. *Cancer Cell* 10:515–527. doi:[10.1016/j.ccr.2006.10.008](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.008)
35. Sikora J, Dworacki G, Zeromski J (1998) Expression of Fas and Fas ligand and apoptosis in tumor-associated lymphocytes and in tumor cells from malignant pleural effusions. *Nat Immun* 16:244–255. doi:[10.1159/000069450](https://doi.org/10.1159/000069450)
36. Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM (2004) Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* 21:461–465. doi:[10.1016/j.immuni.2004.10.001](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.10.001)
37. Song JH, Tse MCL, Bellail A, Phuphanich S, Khuri F, Kneteman NM, Hao C (2007) Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptotic and nonapoptotic signals in non-small cell Lung Carcinoma Cells. *Cancer Res* 67:6946. doi:[10.1158/0008-5472.CAN-06-3896](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3896)
38. Grassm   H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E (2003) Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22:5457–5470. doi:[10.1038/sj.onc.1206540](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206540)
39. Dimanche-Boitrel MT, Meurette O, Rebillard A, Lacour S (2005) Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced. *Cell death Drug Resist Updat* 8:5–14. doi:[10.1016/j.drug.2005.02.003](https://doi.org/10.1016/j.drug.2005.02.003)
40. Martin S, Phillips DC, Szekely-Szucs K, Elghazi L, Desmots F, Houghton JA (2005) Cyclooxygenase-2 inhibition sensitizes human colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis through clustering of DR5 and concentrating death-inducing signaling complex components into ceramide-enriched caveolae. *Cancer Res* 65:11447–11458
41. Moulin M, Carpentier S, Levade T, Arrigo AP (2007) Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis* 12:1703–1720
42. Johnstone RW, Frew AJ, Smyth MJ (2008) The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8:782–798. doi:[10.1038/nrc2465](https://doi.org/10.1038/nrc2465)
43. Hallett WHD, Ames E, Motarjemi M, Barao I, Shanker A, Tamang DL, Sayers TJ, Hudig D, Murphy WJ (2008) Sensitization of tumor cells to NK cell-mediated killing by proteasome inhibition. *J Immunol* 180:163–170

Nos résultats sur les cellules MDA-MB 231 nous ont permis de conclure que le type de mort induite par la Dox est essentiellement l'apoptose et que le couplage de la drogue ne prévient pas cette apoptose, bien au contraire, l'effet apoptotique de nos composés Dox-CPPs apparaît à des concentrations plus faibles.

Nous avons déterminé en premier lieu les conditions optimales pour induire l'apoptose des cellules MDA-MB 231. Il en ressort qu'une concentration de 2,5 μ M de Dox provoque l'apoptose chez 50% des cellules alors que ce phénomène est reproduit par les Dox-CPPs à une concentration 5 fois plus faible (0,5 μ M après 24 h de traitement).

Nous avons aussi essayé de voir si cet effet se limite aux cellules humaines. Ainsi, sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO), l'effet apoptotique plus puissant des Dox-CPPs est reproduit comme dans les cellules MDA-MB 231 tandis que sur des cellules murines (EMT-6H), l'effet apoptotique des Dox-CPPs est légèrement supérieur à celui de la Dox. Ces résultats sont en accord avec les observations que nous avons faites dans le chapitre II, à savoir la drogue conjuguée est plus efficace sur les cellules qui présenteraient une résistance 'intrinsèque' à la doxorubicine.

L'analyse biochimique des voies d'induction de l'apoptose dans les cellules MDA-MB 231 a permis de montrer que cette mort est dépendante des caspases puisqu'un inhibiteur à large spectre de ces protéases (Z-VAD-fmk) et un inhibiteur spécifique des caspases -3 et -7 (z-DEVD-fmk) réduisent considérablement l'effet apoptotique induit par la Dox (2,5 μ M) et par les Dox-CPPs (0,5 μ M). D'autant plus que plusieurs caspases (-3, -8 et -9) sont activées par les différentes formes de drogue lors de ce processus de mort, ainsi que leurs substrats spécifiques (Bid pour la caspase 8, ROCK I pour la caspase 3 et XIAP pour l'ensemble des caspases).

Nous avons également montré que l'apoptose induite par la Dox et les Dox-CPPs implique la voie mitochondriale du fait qu'une oligomérisation au niveau de la mitochondrie de la protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bax et un relargage du cytochrome C ont été observés dans les différentes conditions de traitement. Toutefois, la voie mitochondriale est partiellement impliquée dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs alors qu'elle semble être l'unique voie de l'apoptose induite par la Dox. En effet, la surexpression de Bcl-2 protège de l'apoptose induite par les Dox-CPPs et seulement en partie par la Dox.

En outre, nous avons démontré que l'apoptose induite par nos composés est médiée par les ROS et que l'utilisation d'un inhibiteur des ROS (NAC), réduit de plus de 50% le pourcentage des cellules apoptotiques lors du traitement avec la Dox alors que cette inhibition est partielle dans le cas des Dox-CPP.

Afin de mieux comprendre cette différence d'activité, une hypothèse a été envisagée; à savoir, que les complexes Dox-CPPs déclencheraient d'autres voies apoptotiques en plus de la voie intrinsèque mitochondriale et qui pourrait expliquer la plus forte cytotoxicité dans le cas des Dox-CPPs.

Il est bien établi que la voie apoptotique principale indépendante de la mitochondrie est la voie des récepteurs de mort (Fas ou TRAIL-Rs) dans les cellules de type I (Barnhart *et al.*, 2003). Il a été rapporté aussi que la Dox sensibilise plusieurs types cellulaires à l'apoptose induite par TRAIL (Wu *et al.*, 2007).

Nos résultats montrent que le traitement des cellules MDA-MB 231 par les Dox-CPPs induit la surexpression et la clustérisation des récepteurs DR4 et DR5 à la membrane alors que la Dox induit uniquement une surexpression de ces récepteurs. En plus, le cotraitement des cellules MDA-MB 231 avec Dox ou Dox-CPPs et TRAIL augmente le pourcentage d'apoptose dans tout les cas. Il est donc probable qu'une telle sensibilisation de l'apoptose par TRAIL est du principalement à la surexpression de DR4 et DR5 plutôt qu'à leurs clustérisation membranaire. Nous avons aussi pu montrer que ces cellules sont résistantes à TRAIL.

Cependant, ces données ne nous fournissent pas encore d'explications quant à la cytotoxicité plus importante des Dox-CPPs par rapport à celle de la Dox dans les cellules MDA-MB 231. Par ailleurs, l'utilisation de deux récepteurs chimériques solubles qui interagissent pour neutraliser l'action du ligand inhibe à moitié l'apoptose induite par Dox-CPPs mais pas par Dox, sans pour autant ajouter TRAIL dans le milieu. Ceci nous amène à suggérer que (i) TRAIL serait exprimé de manière endogène par les cellules MDA-MB 231, (ii) l'agrégation des récepteurs DR4 et DR5 suite à l'induction de l'apoptose par Dox-CPPs se ferait en présence du ligand endogène.

Des expériences supplémentaires nous ont permis de montrer que les cellules MDA-MB 231 expriment constitutivement TRAIL à leur membrane ce qui nous permet d'expliquer (i) l'inhibition de l'apoptose en présence des récepteurs solubles mais en l'absence du ligand dans le cas du traitement par les Dox-CPPs, (ii) la résistance de ces cellules à TRAIL, car autrement elles se tuent d'elles même et (iii) la formation des clusters seulement lors du traitement des Dox-CPPs qui est une conséquence de la sensibilisation à TRAIL endogène par ces conjuguées.

Nous avons également montré, en accord avec de nombreux travaux, que l'agrégation des récepteurs s'effectue dans les rafts et que la désorganisation de ces rafts par la méthyl- β -cyclodextrin et la nystatine, diminue l'apoptose induite par les Dox-CPPs mais pas par la Dox. Ceci n'explique pas pourquoi les récepteurs de TRAIL se sont accumulés dans les rafts seulement quand les cellules ont été traitées par Dox-CPPs et si ce phénomène est en relation avec leur plus forte cytotoxicité.

Puisqu'il a été démontré que le « clustering » et l'activation des TRAIL-Rs requiert la génération de céramide (produit de l'hydrolyse de la sphingomyéline, un composant phospholipidique de la membrane plasmique) ainsi que son incorporation dans les rafts, il nous a semblé judicieux d'étudier l'implication de ce médiateur lipidique dans la mort induite par les Dox-CPPs. Ainsi, l'utilisation d'un anticorps anti-céramide nous a permis de révéler l'augmentation du contenu en céramide après traitement par les Dox-CPPs et pas dans le cas des cellules traitées par la Dox. Ceci est d'autant plus vrai que nous avons montré que le céramide est localisé dans les rafts. Il est donc bien clair à présent que la sensibilisation à TRAIL passerait par la génération de céramide. L'ensemble de ces résultats a été reproduit suite à l'addition du C2-céramide aux cellules traitées par une faible dose de Dox, ce qui confirme bien l'implication de ce médiateur dans l'apoptose induite par les faibles doses de Dox dans les cellules MDA-MB 231. Par ailleurs, le céramide exogène pourrait sensibiliser les cellules traitées avec une faible dose de Dox à l'apoptose médiée par TRAIL. Cette sensibilisation a été rendue possible grâce à la surexpression de DR4 et DR5 déjà observée.

Il est bien clair maintenant que nos conjuguées arrivent à sensibiliser les cellules MDA-MB 231 au TRAIL endogène via l'augmentation du contenu en céramide dans les cellules tandis que la Dox seule ne le fait pas et qu'il faut additionner du céramide exogène à la

Dox pour atteindre le même effet. Des explications peuvent être envisagées afin de comprendre cette différence d'action. En effet, il a été démontré dans la littérature que l'ASM (acide sphingomyelinase) est localisée principalement dans l'endosome et/ou le cytosol de la cellule. Il semblerait donc dans notre cas que la distribution cytosolique des Dox-CPPs facilite l'activation de cette enzyme. D'autre part, il a aussi été envisagé que la nature des ROS menant à l'activation de l'ASM n'est pas bien définie, mais il s'est avéré que la majorité échappe à la protection de la NAC (Grassme et *al.*, 2003). Dans ce sens, nous avons pu montré précédemment (article IV) que la NAC ne protège pas totalement les ROS générés suite au traitement avec les Dox-CPP contrairement au traitement par la Dox. Il est donc probable que les types de ROS impliqués dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs sont différents et qui pourraient être donc impliqués dans l'activation de l'ASM.

L'ensemble de ces résultats nous a permis donc de comprendre la plus forte cytotoxicité des Dox-CPPs due à la génération de céramide, médiateur lipidique qui sensibilise les cellules MDA-MB 231 au TRAIL endogène exprimé par les cellules. Ce processus est une deuxième voie impliquée dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs en plus de la voie mitochondriale qui est l'unique voie de l'apoptose induite par la Dox non conjuguée.

CONCLUSION GENERALE

Le problème du transport de substances, dotées de propriétés pharmacologiques, au travers de la membrane plasmique et de leur accès aux divers compartiments intracellulaires, en particulier le compartiment cytoplasmique et nucléaire, est un obstacle pour la recherche biotechnologique et biomédicale, ainsi que pour l'industrie pharmaceutique. Parmi les moyens récemment connus pour introduire des substances dans les cellules, les peptides de translocation également dénommés CPPs qui représentent des vecteurs particulièrement intéressants.

Au cours de cette thèse on a porté intérêt à un nouveau peptide récemment décrit dans l'équipe, la MCa, qui peut rentrer dans tout type cellulaire et qui partage cette propriété avec les CPPs décrits dans la littérature.

Dans un premier volet de notre travail, nous nous sommes donnée pour but d'étudier le mécanisme d'entrée de ce peptide et d'obtenir un vecteur peptidique dérivé de la MCa qui, ne soit pas cytotoxique et sert de vecteur pour une variété de molécules. Par ailleurs nous rapportons un ensemble de résultats montrant les éléments suivants:

- La MCa se trouve dans le cytoplasme très rapidement (quelques secondes) et que le peptide empreinte une voie de macropinocytose lorsqu'il est attaché à un cargo (ici la streptavidine) et directement lorsqu'il est libre.
- Un nouvel analogue de la MCa, dépourvue des ponts disulfures, (MCa_{Abu}), a été synthétisé. Cet analogue est pharmacologiquement inerte sur les récepteurs RyR1 mais conserve la capacité d'internaliser différents cargos (Streptavidine, peptide, nanoparticules et doxorubicine).
- Nous avons par suite caractérisé le complexe Dox-MCa_{Abu} (biodistribution, internalisation et cytotoxicité) dans deux modèles cellulaires du cancer de sein, MCF7 et MDA-MB 231. En effet le complexe modifie la sensibilité des cellules à la Dox et contourne la résistance des cellules MDA-MB 231 à la drogue. L'effet de ce complexe a été comparé à deux autres complexes Dox-Tat et Dox-Pen et nos résultats ont montré une activité similaire de ces trois Dox-CPPs.

Dans un deuxième volet, nous avons étudié les voies de signalisation apoptotiques induites par la Dox et les complexes Dox-CPPs afin de comprendre en partie la plus forte cytotoxicité induite par ces dernières par rapport à la Dox dans le modèle cellulaire MDA-MB 231 et nous avons tirés les conclusions suivantes :

- La Dox et les conjugués Dox-CPPs induisent une mort par apoptose des cellules MDA-MB 231. La concentration utilisée pour induire l'apoptose par la Dox est cinq fois plus supérieure à celle utilisée pour les Dox-CPPs pour atteindre le même effet. Ce type de mort induit par les différents composés est dépendant des caspases.
- Une oligomérisation de Bax (protéine proapoptotique de la famille Bcl-2) et un relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol ont été observés dans tous les cas ce qui montre bien que la mitochondrie est impliquée dans l'apoptose induite par la Dox sous ses différentes formes.
- L'apoptose induite par ces composés est médiée par les ROS et l'utilisation de la NAC (inhibiteur de ces radicaux) protège totalement l'apoptose induite par la Dox et partiellement celle induite par les Dox-CPPs.
- La surexpression du Bcl-2 protège, par contre, l'apoptose induite par la Dox et partiellement celle induite par les Dox-CPPs. Ceci nous laisse penser que d'autres voies de signalisation apoptotique, autres que la voie mitochondriale, sont impliquées dans l'apoptose induite par les Dox-CPPs et qui peuvent nous expliquer la plus forte cytotoxicité observée par ces conjugués.
- L'étude de l'implication des voies des récepteurs de mort montre une clustérisation de DR4 et DR5 seulement dans le cas des Dox-CPPs et que l'utilisation des récepteurs chimériques solubles (antagonistes de DR4 et DR5) protège l'apoptose induite par les Dox-CPPs et pas celle induite par la Dox sans pour autant ajouter du TRAIL exogène. Cet effet n'étant pas aléatoire mais parce que les cellules MDA-MB 231 expriment TRAIL d'une manière constitutive. Ceci explique aussi la clustérisation de DR4 et DR5 par les Dox-CPPs qui est à l'issue d'une sensibilisation à TRAIL endogène. Aussi, on a bien démontré que les clusters colocalisent avec les rafts lipidiques et que ce phénomène parvient seulement dans le cas des Dox-CPPs. Ceci a été expliqué par la génération du céramide suite à l'activation de l'ASM et son incorporation dans les rafts. Un tel médiateur chimique favorise la clustérisation des récepteurs DR4 et DR5 et l'induction de l'apoptose (**Figure 26**).

- Il est donc intéressant à noter que les Dox-CPPs sont capables de générer le céramide et sensibiliser à TRAIL endogène alors que la Dox seule est incapable de le faire et qu'il faut additionner du céramide exogène pour atteindre le même effet.

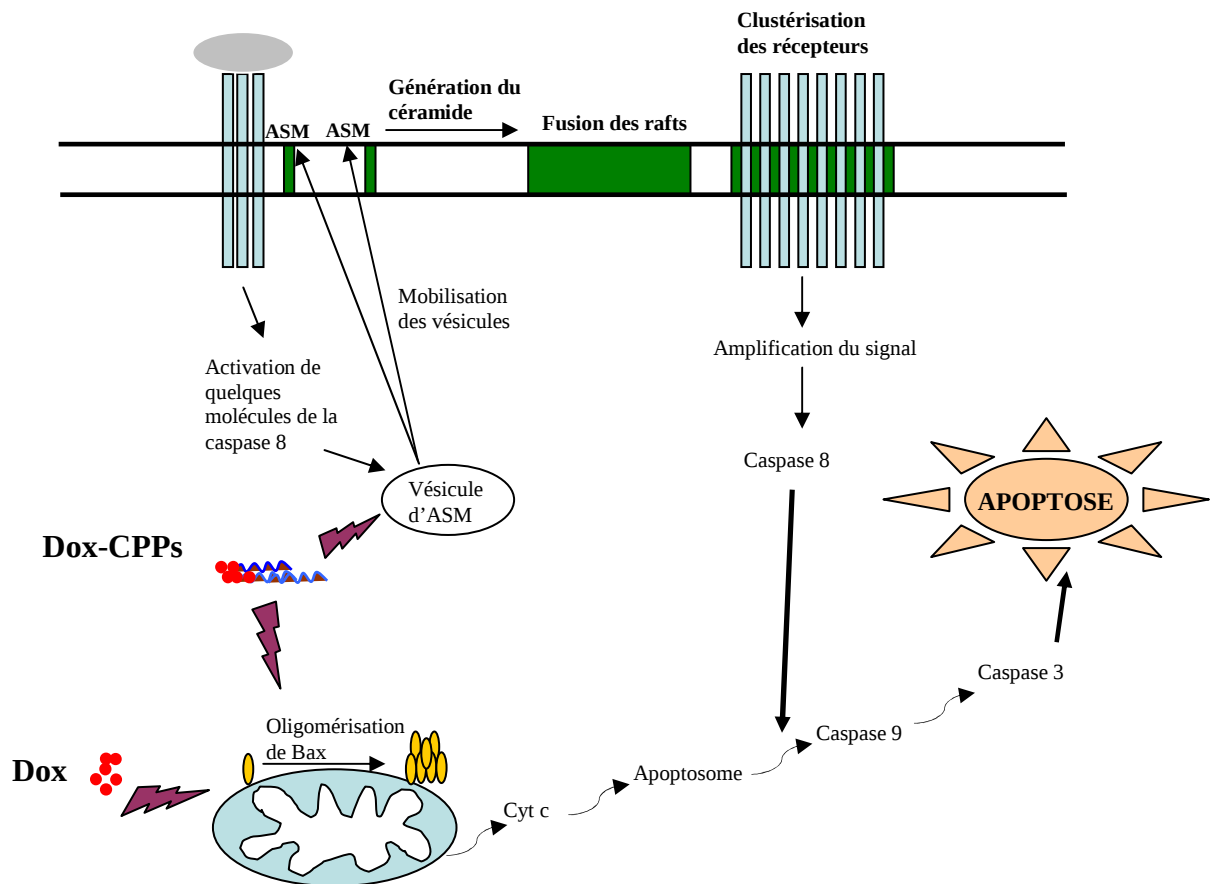


Figure 26 : Schéma récapitulatif des voies d'induction d'apoptose par la Dox et les Dox-CPPs

Ces résultats devraient nous permettre de mieux élucider l'utilité du couplage de la Dox aux trois peptides de pénétration cellulaire non seulement pour faire augmenter la pénétration de la drogue à l'intérieur de la cellule, mais aussi pour produire des agents

anticancéreux qui sensibilisent à un niveau physiologique de TRAIL sans avoir recourt à TRAIL exogène.

Il n'en reste pas moins que les avancées déterminantes décrites ici devraient apporter des éléments de réponse essentiels non seulement pour la caractérisation et la conception d'un nouveau vecteur peptidique (MCA_{Abu}), mais aussi quand à son utilisation en thérapeutique.

Nous nous attacherons dans nos travaux futurs à mieux caractériser d'autres analogues de la MCA avec une capacité d'internalisation cellulaire améliorée. Notre stratégie de couplage sera valorisée en réalisant des tests *in vivo* et en appliquant des faibles concentrations de la drogue couplée au peptide. Nous pensons aussi au ciblage des compartiments tumoraux en utilisant des séquences ciblées à des récepteurs développés lors des tumeurs tel que APN ou CD13. D'autres applications seront envisonnées telque l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de l'efficacité de drogues greffées à un analogue de la MCA possédants différents cibles cellulaires.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott BL (2003) ABCG2 (BCRP) expression in normal and malignant hematopoietic cells. *Hematol Oncol* **21**:115-30
- Abes R, Arzumanov AA, Moulton HM, Abes S, Ivanova GD, Iversen PL, Gait MJ, Lebleu B (2007) Cell-penetrating-peptide-based delivery of oligonucleotides. *Biochem Soc Trans* **4**:775-9
- Acehan D, Jiang X, Morgan, DG, Heuser, JE, Wang X, Akey CW (2002) Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**: 423-432
- Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* **17**:593-623
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* **18**:6104-11
- Agostinho M, Rino J, Braga J, Ferreira F, Steffensen S, Ferreira J (2004) Human topoisomerase II alpha: targeting to subchromosomal sites of activity during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* **15**:2388-400
- Allen JD, Schinkel AH (2002) Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Mol Cancer Ther* **1**:427-34
- Altieri, DC (2006) The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*, **18**: 609-615
- Amarante-Mendes and Green DR (1999) The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **9**: 1053-61
- Ambudkar SV, Kim IW, Sauna ZE (2006) The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *Eur J Pharm Sci* **5**: 392-400
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE et Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**:7468-85.
- Andrieu-Abadie N, Gouazé V, Salvayre R, Levade T (2001) Ceramide in apoptosis signaling: relationship with oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **6**:717-28
- Ashkenazi A (2002) Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* **2**:420-30.
- Ashkenazi, A, Pai, RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* **104**: 155-162

- Awasthi S, Sharma R, Awasthi YC, Belli JA, Frenkel EP (1992) The relationship of doxorubicin binding to membrane lipids with drug resistance. *Cancer Lett* **63**:109-16
- Bachur NR, Gee MV, Friedman RD (1982) Nuclear catalyzed antibiotic free radical formation. *Cancer Res* **42**:1078-81
- Bachur NR, Gordon SL, Gee MV (1978) A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals. *Cancer Res* **38**:1745-50
- Bachur NR, Lun L, Sun PM, Trubey CM, Elliott EE, Egorin MJ, Malkas L et Hickey R (1998) Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. *Biochem Pharmacol* **55**:1025-34
- Bachur NR, Yu F, Johnson R, Hickey R, Wu Y, Malkas L (1992) Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Mol Pharmacol* **41**:993-8
- Bakhshi, A, Jensen, JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, and Korsmeyer SJ (1985) Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**: 899-906
- Bannerman DD, Sathyamoorthy M and Goldblum SE (1998) Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *J Biol Chem*, **273**: 35371-35380
- Bárány-Wallje E, Keller S, Serowy S, Geibel S, Pohl P, Bienert M, Dathe M (2005) A critical reassessment of penetratin translocation across lipid membranes. *Biophys J*. Oct;89(4):2513-21
- Barnhart BC, Alappat EC, Peter ME (2003) The CD95 Type I/Type II model. *Seminars in Immunology* **15**:185–193
- Barthelmes HU, Habermeyer M, Christensen MO, Mielke C, Interthal H, Pouliot JJ, Boege F, Marko D (2004) TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II. *J Biol Chem* **279**:55618-25
- Benedict WF, Baker MS, Haroun L, Choi E, Ames BN (1977) Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/microsome test. *Cancer Res* **37**:2209-13
- Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC (1996) Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature* **379**:225-32
- Binaschi M, Bigioni M, Cipollone A, Rossi C, Goso C, Maggi CA, Capranico G et Animatei F (2001) Anthracyclines: selected new developments. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **1**:113-30
- Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J* **14**:2669-79
- Boatright KM, Salvesen GS (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**:725-31

- Bodmer JL, Holler N, Reynard S, Vinciguerra P, Schneider P, Juo P, Blenis J, Tschopp J (2000) TRAIL receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8. *Nat Cell Biol* **2**: 241-243
- Boisseau S, Mabrouk K, Ram N, Garmy N, Collin V, Tadmouri A, Mikati M, Sabatier JM, Ronjat M, Fantini J, De Waard M (2006) Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor. *BBA* **1758**: 308–319
- Boland MP, Foster SJ, O'Neill LA. (1997) Daunorubicin activates NFkappaB and induces kappaB-dependent gene expression in HL-60 promyelocytic and Jurkat T lymphoma cells. *J Biol Chem* **20**:12952-60
- Borst P, Evers R, Kool M et Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* **92**:1295-302
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R (1995) Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell* **3**:405-14
- Briehl MM, Baker AF, Siemankowski LM, Morreale J (1997) Modulation of antioxidant defenses during apoptosis. *Oncol Res* **9**:281-5
- Broxterman HJ, Lankelma J, Hoekman K (2003) Resistance to cytotoxic and anti angiogenic anticancer agents: similarities and differences. *Drug Resist Updat* **6**:111-27
- Brooks H, Lebleu B, Vivès E (2005) Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev* **4**:559-77
- Brown GA, McPherson JP, Gu L, Hedley DW, Toso R, Deuchars KL, Freedman MH et Goldenberg GJ (1995) Relationship of DNA topoisomerase II alpha and beta expression to cytotoxicity of antineoplastic agents in human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Cancer Res* **55**:78-82.
- Bump NJ, Hackett M, Hugunin M, Seshagiri S, Brady K, Chen P, Ferenz C, Franklin S, Ghayur T, Li P (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* **269**: 1885-1888
- Burns, J. L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P. H. Krammer, M. E. Peter and J. by death receptors. *Nature* **386**: 517-21
- Burns TF, El-Deiry WS (2001) Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach. *J Biol Chem* **276**: 37879-37886
- Capranico G, Binaschi M (1998) DNA sequence selectivity of topoisomerases and topoisomerase poisons. *Biochim Biophys Acta* **1400**:185-94

- Capranico G, Binaschi M, Borgnetto ME, Zunino F, Palumbo M (1997) A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons. *Trends Pharmacol Sci* **18**:323-9
- Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P (2004) The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell*. 5:807-18.
- Charruyer A, Grazide S, Bezombes C, Muller S, Laurent G, Jaffrezou JP (2005) UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem* **280**:19196–204.
- Champion JA, Mitragotri S (2006) Role of target geometry in phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **13**:4930-4.
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70**:369-413
- Chandra J, Samali A, Orrenius S (2000) Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (3-4):323-33
- Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L (1997) Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* **7**: 821-830
- Chen T, Wang Q, Cui J, Yang W, Shi Q, Hua Z, Ji J, Shen P (2005) Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. *Mol Cell Proteomics* **7**:958-74
- Christiaens B, Grooten J, Reusens M, Joliot A, Goethals M, Vandekerckhove J, Prochiantz A, Rosseneu M (2004) Membrane interaction and cellular internalization of penetratin peptides. *Eur. J. Biochem* **271**:1187-1197
- Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F et Mielke C (2002) Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol* **157**:31-44
- Clodi K, Wimmer D, Li Y, Goodwin R, Jaeger U, Mann G, Gadner H, Younes A (2000) Expression of tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary B-cell acute lymphoblastic leukaemia cells. *Br J Haematol* **111**: 580-586
- Collins L, Zhu T, Guo J, Xiao Z.J, Chen C.Y (2006) Phellinus linteus sensitises apoptosis induced by doxorubicin in prostate cancer. *British Journal of Cancer* **95**: 282 – 288
- Conner SD, Schmid SL (2003) Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **5**:773-9

- Cory S, Adams JM (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2** : 647-656
- Cory S, Huang DC, Adams JM. (2003) The Bcl-2 family: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**: 8590-607
- Cretney E, Shanker A, Yagita H, Smyth MJ, Sayers TJ (2006) TNF-related apoptosis-inducing ligand as a therapeutic agent in autoimmunity and cancer. *Immunol Cell Biol* **84**: 87-98
- Cullinane C, Cutts SM, Panousis C et Phillips DR (2000) Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells. *Nucleic Acids Res* **28**:1019-25
- Cullinane C, Cutts SM, van Rosmalen A et Phillips DR (1994) Formation of adriamycin--DNA adducts in vitro. *Nucleic Acids Res* **22**:2296-303
- Cutts SM, Parsons PG, Sturm RA et Phillips DR (1996) Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *J Biol Chem* **271**:5422-9
- Cutts SM, Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A et Phillips DR (2003) Sequence specificity of adriamycin-DNA adducts in human tumor cells. *Mol Cancer Ther* **2**:661-70
- Dano K (1973) Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* **323**:466-83
- Davies SL, Jenkins JR et Hickson ID (1993) Human cells express two differentially spliced forms of topoisomerase II beta mRNA. *Nucleic Acids Res* **21**:3719-23.
- Davis W, Jr Ronai Z, Tew KD (2001) Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:1-6
- Degli-Esposti, MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, Goodwin R G, Smith CA (1997) Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* **186**: 1165-1170
- Debatin K (2000) Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. *Toxicol Lett* **112-113**:41-48
- Deng Y, Lin Y, Wu X (2002) TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* **16**: 33-45
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem.* **30**:18188-18193
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, Prochiantz A (1994) the third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol.Chem* **269**: 10444–10450

- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**: 239-252
- Deveraux, QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC (1997) X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**: 300-304
- Dietz GP, Bähr M (2004) Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci* **2**:85-131
- Di Marco A, Gaetani M et Scarpinato B (1969) Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* **53**:33-37
- Dimarco A, Gaetani M, Dorigotti L, Soldati M et Bellini O (1963) [Experimental Studies of the Antineoplastic Activity of a New Antibiotic, Daunomycin. *Tumori* **49**:203-17
- Dingemans AM, Pinedo HM et Giaccone G (1998) Clinical resistance to topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* **1400**:275-88
- Dingemans AM, Witlox MA, Stallaert RA, van der Valk P, Postmus PE et Giaccone G (1999) Expression of DNA topoisomerase IIalpha and topoisomerase IIbeta genes predicts survival and response to chemotherapy in patients with small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **5**:2048-58
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *BBA* **1133**: 275-285
- Dixon MJ, Bourré L, MacRobert AJ, Eggleston IM (2007) Novel prodrug approach to photodynamic therapy: Fmoc solid-phase synthesis of a cell permeable peptide incorporating 5-aminolaevulinic acid. *Bioorg Med Chem Lett*. Aug 15;17(16):4518-22
- Doroshow JH (1983) Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* **43**:4543-4551
- Doroshow JH, Synold TW, Somlo G, Akman SA, Gajewski E (2001) Oxidative DNA base modifications in peripheral blood mononuclear cells of patients treated with high-dose infusional doxorubicin. *Blood* **97**:2839-2845
- Doyle LA, Ross DD (2003) Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **22**:7340-58
- Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK et Ross DD (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15665-70

- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**:47-95.
- Du G, Lin H, Wang M, Zhang S, Wu X, Lu L, Ji L, Yu L (2009) Quercetin greatly improved therapeutic index of doxorubicin against 4T1 breast cancer by its opposing effects on HIF-1alpha in tumor and normal cells. *Cancer Chemother Pharmacol* [Epub ahead of print]
- Dubost M, Ganter P, Maral R, Ninet L, Pinnert S, Preud'Homme J et Werner GH (1963) [a New Antibiotic with Cytostatic Properties: Rubidomycin]. *C R Hebd Seances Acad Sci* **257**:1813-1815
- Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R, Brock R (2007) A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* **8** 848–866
- Dumitru CA, Carpinteiro TT, Hengge RU, Gulbins E (2007) Doxorubicin enhances TRAIL-induced cell death via ceramide-enriched membrane platforms. *Apoptosis* **12** 1533-1541
- Dumitru CA, Gulbins E (2006) TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* **25**:5612–25.
- Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL (2006) Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* **7**: 988-994
- El Andaloussi S, Guterstam P, Langel U (2007) Assessing the delivery efficacy and internalization route of cell-penetrating peptides. *Nat Protoc* **8**:2043-7
- El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* **28**:21508-13
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata SA (1998) caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**: 43-50
- Eom YW, Kim MA, Park SS, Goo MJ, Kwon HJ, Sohn S, Kim WH, Yoon G, Choi KS (2005) Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* **24** 4765–4777
- Errington F, Willmore E, Leontiou C, Tilby MJ, Austin CA (2004) Differences in the longevity of topo IIalpha and topo IIbeta drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity. *Cancer Chemother Pharmacol* **53**:155-162
- Escriba PV, Sastre M, Garcia-Sevilla JA (1995) Disruption of cellular signaling pathways by daunomycin through destabilization of nonlamellar membrane structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7595-7599.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**: 929-935.

- Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassme H, (2001) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* **6**:431–439.
- Estève E, Mabrouk K, Dupuis A, Smida-Rezgui S, Altafaj X, Grunwald D, Platel JC, Andreotti N, Marty I, Sabatier JM, Ronjat M, De Waard M (2005) Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem* **13**:12833-12839.
- Esteve E, Smida-Rezgui S, Sarkozi S, Szegedi C, Regaya I, Chen L, Altafaj X, Rochat H, Allen P, Pessah IN, Marty I, Sabatier JM, Jona I, De Waard M, Ronjat M (2003) *J. Biol. Chem.* **278** 37822–37831.
- Evans CD, Mirski SE, Danks MK, Cole SP (1994) Reduced levels of topoisomerase II alpha and II beta in a multidrug-resistant lung-cancer cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* **34**:242-248
- Fajloun Z, Kharrat R, Chen L, Lecomte C, Di Luccio E, Bichet D, El Ayeb M, Rochat H, Allen PD, Pessah IN, De Waard M, Sabatier JM (2000) Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca(2+) release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* **2-3**:179-85.
- Fedier A, Fink D (2004) Mutations in DNA mismatch repair genes: implications for DNA damage signaling and drug sensitivity (review). *Int J Oncol* **24**:1039-1047.
- Feldhoff PW, Mirski SE, Cole SP, Sullivan DM (1994) Altered subcellular distribution of topoisomerase II alpha in a drug-resistant human small cell lung cancer cell line. *Cancer Res* **54**:756-762.
- Ferte J (2000) Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* **267**:277-94
- Fittipaldi A., A. Ferrari, M. Zoppe, C. Arcangeli, V. Pellegrini, F. Beltram and. Giacca M, J. (2003) Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *Biol. Chem* **278**: 34141–34149.
- Fisher J, Abdella BR, McLane KE (1985) Anthracycline antibiotic reduction by spinach ferredoxin-NADP+ reductase and ferredoxin. *Biochemistry* **24**:3562-71.
- Foglesong PD, Reckord C, Swink S (1992) Doxorubicin inhibits human DNA topoisomerase I. *Cancer Chemother Pharmacol* **30**:123-5.
- Ford KG, Souberbielle BE, Darling D, Farzaneh F (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Therapy* **8**:1-4.

Frankel AD, Pabo CO. (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. Dec **6**:1189-93.

Fritzer M, Szekeres T, Szüts V, Jarayam HN, Goldenberg H (1996) Cytotoxic effects of a doxorubicin-transferrin conjugate in multidrug-resistant KB cells. *Biochem Pharmacol*. Feb **4**:489-93.

Fuentes-Prior P, SALVESEN Guy S (2004) The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem. J* **384**: 201–232.

Fulda S, Wick W, Weller M, Debatin KM (2002) Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* **8**: 808-815.

Futaki S (2002) Arginine-rich peptides: potential for intracellular delivery of macromolecules and the mystery of the translocation mechanisms. *Int J Pharm* **1-2**:1-7.

Gamen S, Anel A, Perez-Galan P, Lasierra P, Johnson D, Pineiro A, Naval J (2000) Doxorubicin treatment activates a Z-VAD-sensitive caspase, which causes deltapسيم loss, caspase-9 activity, and apoptosis in Jurkat cells. *Exp. Cell. Res.* **258**: 223–235.

García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa JC (1997) Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* **17**:11369-11377

Gehring WJ, Affolter M, Bürglin T (1994) Homeodomain proteins. *Annu Rev Biochem* **63**:487-526.

Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* **57**:727-41

Ghayur T, Li P (1995) Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* **269** : 1885-1888.

Gianni L, Zweier JL, Levy A , Myers CE (1985) Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. *J Biol Chem* **260**:6820-6.

Gieseler F, Glasmacher A, Kampfe D, Wandt H, Nuessler V, Valsamas S, Kunze J et Wilms K (1996) Topoisomerase II activities in AML and their correlation with cellular sensitivity to anthracyclines and epipodophyllotoxines. *Leukemia* **10**:1177-80.

Gillisen A, Nowak D (1998) Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respir Med* **4**: 609-23.

- Goldkorn T, Balaban N, Shannon M, Chea V, Matsukuma K, Gilchrist D, Wang H, Chan C (1998) H₂O₂ acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* **21**:3209-20
- Goldstein LJ (1996) MDR1 gene expression in solid tumours. *Eur J Cancer* **32A**:1039-50.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* **2**:48-58.
- Goun EA, Pillow TH, Jones LR, Rothbard JB, Wender PA (2006) Molecular transporters: synthesis of oligoguanidinium transporters and their application to drug delivery and real-time imaging. *Chembiochem*. **10**:1497-515.
- Grassme H, Schwarz H, Gulbins E (2001) Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:1016–1030.
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, Schwarz H, (2003) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* equires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* **9**:322–30.
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E (2002a) Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* **168**:298–307.
- Grassme H, Bock J, Kun J, Gulbins E (2002b) Clustering of CD40 ligand is required to form a functional contact with CD40. *J Biol Chem* **277**:30289–30299.
- Green M, Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell Dec* **6**:1179-88.
- Hao G, Shi YH, Tang YL, Le GW (2009) The Membrane action mechanism of analogues of the antimicrobial peptide Buforin 2. *Peptides* May 22.
- Hampton MB, Orrenius S (1997) Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide : implications for apoptosis. *FEBS Lett* **3**:552-6.
- Hannun YA (1997) Apoptosis and the dilemma of cancerchemotherapy. *Blood* **89**: 1845–1853
- Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* **2**:73-80
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-76
- Henning K, Natisha M, Richard JI, Kathryn MS (2007) Differential regulation of DNA repair protein Rad51 in human tumour cell lines exposed to doxorubicin. *Anti.Can.Drugs* **4**:419-425.

Herbig M.E., Weller K., Krauss U., Beck-Sickinger A.G., P. Merkle H and. Zerbe (2005) Membrane surface-associated helices promote lipid interactions and cellular uptake of human calcitonin-derived cell penetrating peptides *Biophys O. J* **89**:4056–4066.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997) Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**: 190-195.

Islam KN, Kayanoki Y, Kaneto H, Suzuki K, Asahi M, Fujii J, Taniguchi N (1997) TGF-beta1 triggers oxidative modifications and enhances apoptosis in HIT cells through accumulation of reactive oxygen species by suppression of catalase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med* **6**:1007-17.

Jehangir S, Wadia Steven F, Dowdy (2005) Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer, *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**:579– 596.

Jesenberger V, Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**: 112-121.

Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ (1999) P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* **93**:1075-85.

Joliot AH, Triller A, Volovitch M, Pernelle C, Prochiantz A (1991) alpha-2,8-Polysialic acid is the neuronal surface receptor of antennapedia homeobox peptide. *New Biol. Nov* **11**:1121-34

Jones AT (2008) Gateways and tools for drug delivery: endocytic pathways and the cellular dynamics of cell penetrating peptides. *Int J Pharm* **1-2**:34-8.

Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-62.

Jung K, Reszka R (2001) Mitochondria as subcellular targets for clinically useful anthracyclines. *Adv Drug Deliv Rev* **49**:87-105.

Kaina B (2003) DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol* **66**:1547-1554.

Kang, J., Kisenge, R. R., Toyoda, H., Tanaka, S., Bu, J., Azuma, E., and Komada, Y. (2003) Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines. *Br J Haematol* **123**: 921-932

Kantharidis P, El-Osta S, Silva M, Lee G, Hu XF et Zalcborg J (2000) Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts. *Drug Resist Updat* **3**:99-108.

Kaufmann SH (1998) Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: more questions than answers. *Biochim Biophys Acta* **1400**:195-211.

- Keane MM, Ettenberg SA, Nau MM, Russell EK, Lipkowitz S (1999) Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines. *Cancer Res* **59**: 734–741.
- Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* **181-182**: 471-4.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-57.
- Khosravi-Far R, Esposti MD (2004) Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* **3**:1051-1057.
- Kigawa J, Minagawa Y, Cheng X et Terakawa N (1998) Gamma-glutamyl cysteine synthetase up-regulates glutathione and multidrug resistance-associated protein in patients with chemoresistant epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **4**:1737-41.
- Kim C, Spano J, Park EK, Wi S (2009) Evidence of pores and thinned lipid bilayers induced in oriented lipid membranes interacting with the antimicrobial peptides, magainin-2 and aurein-3.3. *Biochim Biophys Acta* **7**:1482-1496.
- Kim DS, Park SS, Nam BH, Kim IH, Kim SY (2006) Reversal of drug resistance in breast cancer cells by transglutaminase 2 inhibition and nuclear factor-kappaB inactivation. *Cancer Res* **66**:10936–10943.
- Kim EJ, Lim KM, Kim KY, Bae ON, Noh JY, Chung SM, Shin S, Yun YP, Chung JH (2009) Doxorubicin-induced platelet cytotoxicity: a new contributing factor to doxorubicin-mediated thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K (2006) Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* **208**:319-26.
- Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, el-Deiry WS (2000) Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* **6**: 335-346.
- Kimberley FC, Screaton GR (2004) Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* **14**: 359-372.
- Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ, Ashkenazi A (2000) Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* **12**: 611-620.
- Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M (1998) Proteasome is a carrier to translocate doxorubicin from cytoplasm into nucleus. *Life Sci* **62**:1853-60.

- Kiyomiya K, Matsuo S, Kurebe M (2001) Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. *Cancer Res* **61**:2467-71.
- Kiyomiya KI, Matsuo S et Kurebe M (2000) In situ photoaffinity labeling of proteasome with photoactive adriamycin analogue. *Biochem Biophys Res Commun* **273**:928-32.
- Ko YG, Lee JS, Kang YS, Ahn JH, Seo JS. (1999) TNF-alpha-mediated apoptosis is initiated in caveolae-like domains. *J Immunol* **12**:7217-23.
- Kolesnick RN, Krönke M (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol* **60**:643-65.
- Kotamraju S, Konorev EA, Joseph J, Kalyanaraman B (2000) Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. Role of reactive oxygen and nitrogen species. *J Biol Chem* **43**:33585-33592.
- Kruh GD, Belinsky MG (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* **22**:7537-7552.
- Kuo MT, Bao J, Furuichi M, Yamane Y, Gomi A, Savaraj N, Masuzawa T, Ishikawa T (1998) Frequent coexpression of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase mRNA in drug-resistant cells, untreated tumor cells, and normal mouse tissues. *Biochem Pharmacol* **55**:605-615.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, Newmeyer DD (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell. Feb* **4**:525-535.
- Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT (2001) Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res* **61**: 1645–1651
- Lage H, Dietel M (1999) Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *J Cancer Res Clin Oncol* **125**:156-65.
- Langel U (2002) Cell Penetrating peptides: Processes and application. *CRC press, Pharmacology & Toxicology series*.
- Langel U, Pooga M, Kairane C, Zilmer M, Bartfai T (1996) A galanin-mastoparan chimeric peptide activates the Na⁺,K⁺-ATPase and reverses its inhibition by ouabain. *Regul Pept* **1**:47-52.

- Larsen AK, Skladanowski A (1998) Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* **1400**:257-74.
- Laurent G, Jaffrezou JP (2001) Signaling pathways activated by daunorubicin. *Blood* **98**:913-24.
- Lavelle F (1987) [Structure and activity of anthracyclines]. *Pathol Biol (Paris)* **35**:11-9.
- LeBlanc HN, Ashkenazi A (2003) Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* **10**: 66-75.
- Lee SH, Shin MS, Kim HS, Lee HK, Park WS, Kim SY, Lee JH, Han SY, Park JY, Oh RR, Jang JJ, Han JY, Lee JY, Yoo NJ (1999) Alterations of the DR5/TRAIL receptor 2 gene in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* **59**: 5683-5686,
- Legler DF, Micheau O, Doucey MA, Tschopp J, Bron C (2003) Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation. *Immunity*, **18**: 655-664.
- Lesay A, Hickman JA, Gibson RM (2001) Disruption of focal adhesions mediates detachment during neuronal apoptosis. *Neuroreport* **12**: 2111-2115.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **4**:463-77.
- Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW (1998) Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *J Exp Med* **187**: 579-586.
- Liang JF, Yang VC (2005) Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg Med Chem Lett* **15**:5071-5075.
- Li TK, Liu LF (2001) Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**:53-77.
- Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG (2004) A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. *Science*, **305**: 1471-1474.
- Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, Korneluk RG (2001) Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**: 128-133.
- Liu FT, Newland AC, Jia L (2003) Bax conformational change is a crucial step for PUMA-mediated apoptosis in human leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* **310**: 956-962.
- Liu P, Anderson RG (1995) Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J Biol Chem* **270**:27179-85.

- Liu S, Bishop WR, Liu M (2003) Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat* **6**:183-95.
- Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, Kappler JW (2003) The structure of a BclxL/Bim fragment complex : implications for Bim function. *Immunity* **19**: 341-52.
- Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM, Hannun YA (1998) Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-alpha-induced cell death. *J Biol Chem* **18**:11313-11320.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.
- Longley DB, Johnston PG (2005) Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol* **2**:275-292.
- Los M, Herr I, Friesen C, Fulda S, Schulze-Osthoff K, Lipkowitz S (1997) Cross-resistance of CD95 and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* **90**: 3118– 3129.
- Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* **22**: 31-34
- Lou Z, Chen J (2006) Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* **312**:2641-46.
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**: 481-90.
- Mabrouk K, Ram N, Boisseau S, Strappazzon F, Rehaïm A, Sadoul R, Darbon H, Ronjat M, De Waard M (2007) Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration. *Biochim Biophys Acta* **10**:2528-40.
- Maestre N, Tritton TR, Laurent G, Jaffrezou JP (2001) Cell surface-directed interaction of anthracyclines leads to cytotoxicity and nuclear factor kappaB activation but not apoptosis signaling. *Cancer Res* **61**:2558-61.
- Mai JC, Shen H, Watkins SC, Cheng T, Robbins PD (2002) Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* **33**:30208-18
- Maiolo JR, Ferrer M, Ottinger EA (2005) Effects of cargo molecules on the cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *BBA* **2**:161-72.
- Mao Y, Desai SD, Ting CY, Hwang J, Liu LF (2001) 26 S proteasome-mediated degradation of topoisomerase II cleavable complexes. *J Biol Chem* **276**:40652-40658.

- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Huang A, Skubatch M, Baldwin D, Yuan J, Gurney A, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* **7**:1003-1006.
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B (2000) Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* **2**:41-43.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Sussin A, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie Z-H, Reed J. C, Kroemer G. (1998) The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* **187**: 1261-71.
- Mathias S, Peña LA, Kolesnick RN. (1998) Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* **3**:465-80.
- Mazel M, Clair P, Rousselle C, Vidal P, Scherrmann JM, Mathieu D, Temsamani J (2001) Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. *Anticancer Drugs* **2**:107-116.
- McLellan LI, Wolf CR (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. *Drug Resist Updat* **2**:153-164.
- McPherson JP, Deffie AM, Jones NR, Brown GA, Deuchars KL et Goldenberg GJ (1997) Selective sensitization of adriamycin-resistant P388 murine leukemia cells to antineoplastic agents following transfection with human DNA topoisomerase II alpha. *Anticancer Res* **17**:4243-52.
- Merrill AH Jr, Wang E (1992) Enzymes of ceramide biosynthesis. *Methods Enzymol* **209**:427-437.
- Michel C, van Echten-Deckert G (1997) Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **2**:153-5.
- Miller LK (1999) An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* **9**: 323-328.
- Minotti G, Cairo G, Monti E (1999) Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *Faseb J* **13**:199-212.
- Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004) Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* **56**:185-229.
- Mirski SE, Cole SP (1995) Cytoplasmic localization of a mutant M(r) 160,000 topoisomerase II alpha is associated with the loss of putative bipartite nuclear localization signals in a drug-resistant human lung cancer cell line. *Cancer Res* **55**:2129-34.

Mongkolsapaya, J, Cowper AE, Xu XN, Morris G, McMichael AJ, Bell JI, Screaton GR (1998) Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol* **160**: 3-6.

Morris MC, Chaloin L, Méry J, Heitz F, Divita G (1999) A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as a carrier. *Nucleic Acids Res* **17**:3510-7.

Morris MC, Depollier J, Mery, Heitz F, G Divita (2001) A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nature Biotechnology* **19**:1173 - 1176.

Morrow CS, Smitherman PK, Diah SK, Schneider E et Townsend AJ (1998) Coordinated action of glutathione S-transferases (GSTs) and multidrug resistance protein 1 (MRP1) in antineoplastic drug detoxification. Mechanism of GST A1-1- and MRP1-associated resistance to chlorambucil in MCF7 breast carcinoma cells. *J Biol Chem* **273**:20114-20.

Mosbah A, Kharrat R, Fajloun Z, Renisio JG, Blanc E, Sabatier JM, El Ayeb M, Darbon H A (2000) new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* **3**:436-42.

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**:55-63.

Muller I, Jenner A, Bruchelt G, Niethammer D et Halliwell B (1997) Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun* **230**:254-257.

Munshi A, Pappas G, Honda T, McDonnell TJ, Younes A, Li Y, Meyn RE (2001) TRAIL (APO-2L) induces apoptosis in human prostate cancer cells that is inhibitable by Bcl-2. *Oncogene* **20**: 3757-3765.

Muzutani Y, Yoshida O, Miki T, Bonavida B (1999) Synergistic cytotoxicity and apoptosis by Apo-2 ligand and adriamycin against bladder cancer cells. *Clin Cancer Res* **5**: 2605–2612

Nakase I, Tadokoro A, Kawabata N, Takeuchi T, Katoh H, Hiramoto K, Negishi M, Nomizu M, Sugiura Y, Futaki S (2007) Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* **2**:492-501.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**:271-279.

Nielsen D, Maare C, Skovsgaard T (1996) Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol* **27**:251-5.

Niesner U, Halin C, Lozzi L, Günthert M, Neri P, Wunderli-Allenspach H, Zardi L, Neri D (2002) Quantitation of the tumor-targeting properties of antibody fragments conjugated to cell-permeating HIV-1 TAT peptides. *Bioconjug Chem* **4**:729-36.

Nitiss JL, Beck WT (1996) Antitopoisomerase drug action and resistance. *Eur J Cancer* **32A**:958-66.

Nomura K, Imai H, Koumura T, Arai M, Nakagawa Y (1999) Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase suppresses apoptosis mediated by a mitochondrial death pathway. *J Biol Chem* **41**:29294-302

Null AP, Hudson J, Gorbsky GJ (2002) Both alpha and beta isoforms of mammalian DNA topoisomerase II associate with chromosomes in mitosis. *Cell Growth Differ* **13**:325-33.

Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M (1993) Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J*, **12**: 3679-3684.

O'Brien M, Kruh GD, Tew KD (2000) The influence of coordinate overexpression of glutathione phase II detoxification gene products on drug resistance. *J Pharmacol Exp Ther* **294**:480-487.

Ogier-Denis E, Codogno P (2003) Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* **1603**:113-28.

Ogretmen B, Bahadori HR, McCauley MD, Boylan A, Green MR, Safa AR (1998) Co-ordinated over-expression of the MRP and gamma-glutamylcysteine synthetase genes, but not MDR1, correlates with doxorubicin resistance in human malignant mesothelioma cell lines. *Int J Cancer* **75**:757-61.

Oloumi A, MacPhail SH, Johnston PJ, Banath JP, Olive PL (2000) Changes in subcellular distribution of topoisomerase IIalpha correlate with etoposide resistance in multicell spheroids and xenograft tumors. *Cancer Res* **60**:5747-53.

Opferman JT, Korsmeyer SJ (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* **5**:410-5.

Osborn MT, Chambers TC (1996) Role of the stress-activated/c-Jun NH2-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J Biol Chem* **271**:30950-30955.

Osheroff N (1998) DNA topoisomerases. *Biochim Biophys Acta* **1400**:1-2.

Palumbo M, Gatto B, Moro S, Sissi C et Zagotto G (2002) Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase-DNA cleavage complex. *Biochim Biophys Acta* **1587**:145-54.

Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit (1997) VM The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* **276**: 111-113.

Papoff G, Hausler P, Eramo A, Pagano MG, Di Leve G, Signore A, Ruberti G (1999) Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* **274**: 38241-38250.

Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T (1997) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem*. **6**:3324-3329.

Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **7**:4489-4494

Pelicano H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* **7**:97-110.

Perry DK, Hannun YA (1998) The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta*.**1-2**:233-43

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* **271**: 12687-12690.

Pooga M, Lindgren M, Hällbrink M, Bråkenhielm E, Langel U (1998) Galanin-based peptides, galparan and transportan, with receptor-dependent and independent activities. *Ann N Y Acad Sci* **863**:450-453.

Poon GM, Gariépy J (2007) Cell-surface proteoglycans as molecular portals for cationic peptide and polymer entry into cells. *Biochem Soc Trans*. 788-793.

Pouvreau S, Csernoch L, Allard B, Sabatier JM, De Waard M, Ronjat M, Jacquemond V. 2006 Transient loss of voltage control of Ca²⁺ release in the presence of maurocalcine in skeletal muscle. *Biophys J* **6**:2206-15.

Prochiantz A (1996) Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr Opin Neurobiol* **5**:629-34.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **283**(1):1-16.

Quigley GJ, Wang AH, Ughetto G, van der Marel G, van Boom JH et Rich A (1980) Molecular structure of an anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpG). *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7204-7208

Quillet-Mary A, Jaffrézou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G (1997) Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **34**:21388-21395.

Rathmell JC, Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109**:97-107.

Rath G, Schneider C, Langlois B, Sartelet H, Morjani H, Btaouri HEL, Dedieu S, Laurent M (2008) De novo ceramide synthesis is responsible for the anti-tumor properties of camptothecin and doxorubicin in follicular thyroid carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G (2002) Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* **2**:131-137.

Regev R, Eytan GD (1997) Flip-flop of doxorubicin across erythrocyte and lipid membranes. *Biochem Pharmacol* **54**:1151-8.

Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV (2005) Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* **15**:15300-15306.

Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B (2003) Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. **1**:585-590.

Riedl SJ, Renatus M, Snipas SJ, Salvesen GS (2001) Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry* **40**:13274-13280.

Robert J, Larsen AK (1998) Drug resistance to topoisomerase II inhibitors. *Biochimie* **80**:247-254.

Robertson AM, Bird CC, Waddell AW, Currie AR (1978) Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *J Pathol*, **126**: 181-187.

Rodrigues AS, Lopes AR, Leão A, Couceiro A, Ribeiro AB, Ramos F, Noronha da Silveira MI, Resende de Oliveira C (2009) Development of an analytical methodology for simultaneous determination of vincristine and doxorubicin in pharmaceutical preparations for oncology by HPLC-UV. *J Chromatogr Sci* **5**:387-391.

Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001) If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**:303-313.

Rothbard JB, Garlington S, Lin Q, Kirschberg T, Kreider E, McGrane PL, Wender PA, Khavari PA (2000) Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* **11**:1253-1257.

- Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS (1999) Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem* **29**:20296-20300.
- Sahara S, Aoto M, Eguchi Y, Imamoto N, Yoneda Y, Tsujimoto Y (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* **401**: 168-173.
- Sharma R, Arnold L, gulliya KS (1995) Correlation between DNA topoisomerase II activity and cytotoxicity in pMC540 and merodantoin sensitive and resistant human breast cancer cells. *Anticancer Res* **2**:295-304.
- Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y, Lu P (1999) Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta* **1461**:327-45.
- Salvesen GS, Dixit VM (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:10964-10967.
- Sandri MI, Hochhauser D, Ayton P, Campjohn RC, Whitehouse R, Turley H, Gatter K, Hickson ID et Harris AL (1996) Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. *Br J Cancer* **73**:1518-24.
- Sandstrom PA, Tebbey PW, Van Cleave S, Buttke TM (1994) Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. *J Biol Chem* **2**:798-801.
- Sanderson JM (2005) Peptide-lipid interactions: insights and perspectives. *Org. Biomol.chem* **3**:201-212
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signalling pathways. *EMBO J* **17**: 1675-87.
- Scheel-Toellner D, Wang K, Singh R, Majeed S, Raza K, Curnow SJ, Salmon M, Lord J M (2002) The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 876-879.
- Schinkel AH (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* **8**:161-70.
- Screaton GR, Mongkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JI (1997) TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol*, **7**: 693-696.

- Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J and Breard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* **3**: 346-352.
- Sharom FJ, Liu R, Romsicki Y, Lu P (1999) Insights into the structure and substrate interactions of the P-glycoprotein multidrug transporter from spectroscopic studies. *Biochim Biophys Acta* **1461**:327-45.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A (1997) Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* **277**:818-821.
- Sawicka M, Kalinowska M, Skierski J, Lewandowski WJ (2004) A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *Pharm. Pharmacol* **9**:1067-81
- Seelig A, Gatlik-Landwojtowicz E (2005) Inhibitors of multidrug efflux transporters: their membrane and protein interactions. *Mini Rev Med Chem* **2**:135 -151
- Shin MS, Kim HS, Lee SH, Park WS, Kim SY, Park JY, Lee JH, Lee SK, Lee SN, Jung SS, Han JY, Kim H, Lee JY, Yoo NJ (2001) Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res* **61**: 4942-4946.
- Siegel RM (2006) Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **4**:308-317.
- Simeoni F, Morris MC, Heitz F, Divita G (2003) Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **11**:2717-2724
- Slupphaug G, Kavli B, Krokan HE (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* **531**:231-251.
- Smith CA, Farrah T, Goodwin RG (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* **76**: 959-962.
- Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MR, Yagita H (2003) Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity* **18**:1-6.
- Son YS, Suh JM, Ahn SH, Kim JC, Yi JY, Hur KC, Hong WS, Muller MT et Chung IK (1998) Reduced activity of topoisomerase II in an Adriamycin-resistant human stomach-adenocarcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* **41**:353-360.
- Spangler M, Coetzee ML, Katyal SL, Morris HP, Ove P (1975) Some biochemical characteristics of rat liver and Morris hepatoma nuclei and nuclear membranes. *Cancer Res* **11**:3131-3135.

- Sperandio SI de Belle, Bredesen DE (2000) . An alternative, nonapoptotic of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **26**:14376-14381.
- Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, Krammer PH, Walczak H (2000) FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity* **12**: 599-609.
- Srinivasula SM, Gupta S, Datta P, Zhang Z, Hegde R, Cheong N, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2003) Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**: 31469-31472.
- Stewart KM, Horton KL, Kelley SO (2008) Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org. Biomol. Chem* **6** 2242–2255.
- Strasser A (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol.* **3**:189-200.
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK (2001) Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **20**: 2122-2133.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosisinducing factor. *Nature* **397**: 441-446.
- Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y (2002) Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem* **4**:2437-2443.
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, and Okumura K (2001) Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* **7**: 94-100.
- Taik W, Choo MY, Hu CC, Yang JJ, Chang CY (2000) Induction of apoptosis in KB cells by pingyanmycin. *Oral Oncology* **36**:242-247.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**:L1005-1028.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schröter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **6624**:517-521.
- Thorén PE, Persson D, Isakson P, Goksör M, Onfelt A, Nordén B (2003) Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **1**:100-107.
- Tipnis SR, Blake DG, Shepherd AG, McLellan LI (1999) Overexpression of the regulatory subunit of gamma-glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases gamma-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance. *Biochem J* **3**:559-566.

Tokes ZA, Rogers KE et Rembaum A (1982) Synthesis of adriamycin-coupled polyglutaraldehyde microspheres and evaluation of their cytostatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**:2026-2030.

Triton TR, Yee G (1982) The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science* **217**:248-250.

Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*, **229**:1390-1393.

Tsugane K, Tamiya-Koizumi K, Nagino M, Nimura Y, Yoshida S (1999) A possible role of nuclear ceramide and sphingosine in hepatocyte apoptosis in rat liver. *J Hepatol* **1**:8-17.

Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. (1985) Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11;14) chromosome translocation. *Nature* **315**: 340-343.

Turley H, Comley M, Houlbrook S, Nozaki N, Kikuchi A, Hickson ID, Gatter K et Harris AL (1997) The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerase II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* **75**:1340-1346.

Ueda K, Yoshida A, Amachi T (1999) Recent progress in P-glycoprotein research. *Anticancer Drug Des* **14**:115-21.

Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH (2000) Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* **10**: 1319-1328.

Valkov NI, Sullivan DM (2003) Tumor p53 status and response to topoisomerase II inhibitors. *Drug Resist Updat* **6**:27-39.

van den Dobbela DJ, Nobel CS, Schlegel J, Cotgreave IA, Orrenius S, Slater AF (1996) Rapid and specific efflux of reduced glutathione during apoptosis induced by anti-Fas/APO-1 antibody. *J Biol Chem* **26**:15420-15427.

van Rosmalen A, Cullinane C, Cutts SM et Phillips DR (1995) Stability of adriamycin-induced DNA adducts and interstrand crosslinks. *Nucleic Acids Res* **23**:42-50.

Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, **335**: 440-442.

Vendeville A, Rayne F, Bonhoure A, Bettache N, Montcourrier P, Beaumelle B (2004) HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell* **5**:2347-2360.

- Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN (1996) Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* **6569**:75-79
- Violini S, Sharma V, Prior JL, Dyszlewski M, Piwnica-Worms D (2002) Evidence for a plasma membrane-mediated permeability barrier to Tat basic domain in well-differentiated epithelial cells: lack of correlation with heparan sulfate. *Biochemistry* **42**:12652-12661.
- Vivès E, Brodin P, Lebleu B (1997) A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* **25**:16010-16017.
- Wadia JS, Dowdy SF (2002) Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 52-56
- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF (2004) Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* **3**:310-315.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**: 45-65.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Timour MS, Gerhart MJ, Schooley KA, Smith CA, Goodwin RG, Rauch, CT (1997) TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *Embo J* **16**: 5386-5397.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH (1999) Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med* **5**: 157-163.
- Wang AH, Ughetto G, Quigley GJ et Rich A (1987) Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry* **26**:1152-1163.
- Wang GW et Kang YJ (1999) Inhibition of doxorubicin toxicity in cultured neonatal mouse cardiomyocytes with elevated metallothionein levels. *J Pharmacol Exp Ther* **288**:938-44
- Wang Y, Blandino G, Givol D (1999) Induced p21waf expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin, *Oncogene*. **18** 2643–2649.
- Wang H, Mao Y, Zhou N, Hu T, Hsieh TS et Liu LF (2001) Atp-bound topoisomerase ii as a target for antitumor drugs. *J Biol Chem* **276**:15990-15995.
- Wang JC (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* **65**:635-92.

- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:430-440.
- Wassenaar TA, Quax WJ, Mark AE (2008) The conformation of the extracellular binding domain of Death Receptor 5 in the presence and absence of the activating ligand TRAIL: a molecular dynamics study. *Proteins* **70**: 333-343.
- Wehrli P, Viard I, Bullani R, Tschopp J, French L (2000) Death Receptors in Cutaneous Biology and Disease. *Journal of Investigative Dermatology* **115**:141–148.
- Weiss RB (1992) The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* **19**:670-686.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, Rothbard JB (2000) The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **24**:13003-13008
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* **3**: 673-682.
- Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA (1994) Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **6487**:270-275.
- Wu XX, Jin XH, Zeng Y, El Hamed AM, Kakehi Y (2007) Low concentrations of doxorubicin sensitizes human solid cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-receptor (R) 2-mediated apoptosis by inducing TRAIL-R2 expression. *Cancer Sci* **12**:1969-1976
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, **68**: 251-306,
- Xiao H, Mao Y, Desai SD, Zhou N, Ting CY, Hwang J, Liu LF (2003) The topoisomerase IIbeta circular clamp arrests transcription and signals a 26S proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3239-3244.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* **5240**:1326-1331.
- Xu X, Bittman R, Duportail G, Heissler D, Vilcheze C, London E (2001) Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide. *J Biol Chem* **276**:33540–6.
- Yamanaka T, Shiraki K, Sugimoto K (2000) Chemotherapeutic agents augment TRAIL-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatology* **32**: 482–490

Yandek LE, Pokorny A, Florén A, Knoelke K, Langel U, Almeida PF (2007) Mechanism of the cell-penetrating peptide transportan 10 permeation of lipid bilayers. *Biophys J* **7**:2434-2444.

Yang XL, Wang AH (1999) Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther* **83**:181-215.

Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol rev* **55**: 27-55.

Young-Woo E, Mi Ae K, Seok S.P, Mi J.G, Hyuk J.K, Seonghyang S, Wook H.K, Gyesoon Y, Kyeong S.C (2005) Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype, *Oncogene* **24**: 4765–4777.

Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 67-71.

Zeman SM, Phillips DR et Crothers DM (1998) Characterization of covalent adriamycin-DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11561-5.

Zhang H, Xu Q, Krajewski S, Krajewska M, Xie Z, Fuess S, Kitada S, Pawlowski K, Godzik A, Reed J C (2000) BAR: an apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 2597-602.

Zhang N, Hartig H, Dzhalalov I, Draper D and He YW The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes *Cell Research* (2005) **15**: 749–769.

Zhang, XD, Franco A, Myers K, Gray C, Nguyen T, Hersey P (1999) Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer Res* **59**: 2747-2753

Zhou Q, Snipas S, Orth K, Muzio M, Dixit VM, Salvesen GS (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* **272**:7797-800.

Zorko M, Pooga M, Saar K, Rezaei K, Langel U (1998) Differential regulation of GTPase activity by mastoparan and galparan. *Arch Biochem Biophys* **2**:321-328.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 1999 **274**: 11549-11556.

Zundel W, Swiersz LM, Giaccia A. (2000) Caveolin 1-mediated regulation of receptor tyrosine kinase-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* **5**:1507-1514.

Zweier JL (1984) Reduction of O₂ by iron-adriamycin. *J Biol Chem* **259**:6056-8.