

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

présentée et soutenue publiquement par

Mademoiselle

Stamatiki ROUSSI

Le 23 novembre 2006

Titre :

ETUDE DE LA SIGNALISATION CELLULAIRE DE L' APOPTOSE
INDUITE PAR LE 7 β -HYDROXYSITOSTEROL ET
LE 7 β -HYDROXYCHOLESTEROL DANS LES CELLULES
CANCEREUSES COLIQUES HUMAINES

Directeur de Thèse : Dr. F. RAUL

Membres du jury :

Pr. Dominique STEPHAN

Dr. Jean MENANTEAU

Pr. Germain TRUGNAN

Dr. Pierre BISCHOFF

Dr. Francis RAUL

Examineur

Rapporteur Externe

Rapporteur Externe

Rapporteur Interne

Directeur de Thèse

RESUME

Aujourd'hui, il est reconnu que la consommation des légumes peut contribuer à la diminution de risque du développement du cancer colorectal. Les hydroxyphytostérols sont issus de végétaux. Ils ont des similitudes structurales avec les oxydes du cholestérol. De nombreuses études ont porté sur les propriétés cytotoxiques des oxydes du cholestérol. Des formes oxydées du cholestérol et des phytostérols sont présentes dans l'alimentation et pourraient avoir des conséquences physiopathologiques encore mal connues. Le 7 β -hydroxystérol (7 β -OHSito) et le 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHchol) sont les oxydes les plus répandus. Ce travail de thèse a consisté à comparer l'activité de ces deux molécules sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses coliques humaines, Caco-2.

Les résultats montrent que les cellules Caco-2 ne présentent pas la même sensibilité pour les deux hydroxystérols. En effet nous observons 50% d'inhibition de croissance aux doses de 60 μ M pour le 7 β -OHSito et de 30 μ M pour le 7 β -OHchol, les deux molécules induisant l'apoptose. Ils provoquent une dépolarisation des membranes mitochondriales et lysosomiales. Le 7 β -OHSito déclenche une apoptose caspase-dépendante alors que le 7 β -OHchol active une apoptose indépendante des caspases en favorisant la production du stress oxydatif. Les deux processus sont indépendants de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax. Nous avons également étudié l'impact de ces molécules sur le métabolisme des polyamines qui est fortement activé au cours de la cancérogenèse colique. Nos résultats montrent que les enzymes de la biosynthèse des polyamines sont inhibées, alors que la formation des produits du catabolisme des polyamines est favorisée par les deux hydroxystérols. Nos résultats semblent indiquer que seule la perturbation du métabolisme des polyamines provoquée par le 7 β -OHchol pourrait être liée à l'apoptose. En revanche, la perturbation du métabolisme des polyamines par le 7 β -OHSito pourrait être associée à l'initiation de l'apoptose sans l'influencer directement.

En conclusion, les deux hydroxystérols inhibent la croissance des cellules Caco-2 *via* l'activation de voies apoptotiques différentes malgré leur similitude structurale. Les différences dans les mécanismes d'action des deux hydroxystérols pourraient être liées à leur degré d'hydrophobicité.

STUDY OF SIGNAL TRANSDUCTION OF 7 β -HYDROXYSITOSTEROL- AND 7 β -HYDROXYCHOLESTEROL- INDUCED APOPTOSIS ON HUMAN COLON CANCER CELLS

SUMMARY

Today, it is well recognized that consumption of fruits and vegetables may contribute to the reduction of colon carcinogenesis. The phytosterols oxides are present in plants and they present structural similarities with cholesterol oxides. Many studies have focused on the cytotoxic properties of cholesterol oxides. Cholesterol and phytosterols oxides have unknown physiopathologic properties. The 7 β -hydroxysitosterol (7 β -OHsito) and the 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHchol) are the most widespread oxides. Our study was aimed to compare the biological activity of both compounds on the mechanisms involved in the regulation of human colon cancer cell death.

Our results have shown that the colon cancer Caco-2 cells did not exhibit the same sensibility towards hydroxysterols. In fact, we observed a 50% growth inhibition in the presence of 7 β -OHsito at 60 μ M and 7 β -OHchol at 30 μ M. Loss of mitochondrial membrane potential and lysosomal membrane integrity were observed in the presence of both compounds. The 7 β -OHsito induced a caspase-dependent apoptosis whereas, the 7 β -OHchol induced a caspase-independent apoptosis associated with oxidative stress production. All processes were independent of Bcl-2 and Bax protein expression. We also studied the impact of both compounds on polyamine metabolism which is highly activated during colon carcinogenesis. Our data showed that two key enzymes involved in polyamine biosynthesis are inhibited, whereas the formation of polyamine catabolism products was favored by both hydroxysterols. These data indicate that polyamine metabolic perturbations triggered only by 7 β -OHchol are related to apoptotic cell death. In return, polyamine metabolism perturbations induced by 7 β -OHsito seem to be associated to apoptosis initiation of apoptosis without affecting it directly.

In conclusion, both hydroxysterols inhibit the growth of human colon cancer cells (Caco-2) *via* different apoptotic pathways in spite of their structural similarities. The two hydroxysterols exhibit different lipophilic properties which may explain their different biological effects.

MOTS-CLES:

- 7beta-hydroxysitostérol
- 7beta-hydroxycholestérol
- Cancer colorectal
- Cellules Caco-2
- Apoptose
- Mitochondrie
- Lysosomes
- Polyamines

KEY WORDS:

- 7beta-hydroxysitosterol
- 7beta-hydroxycholesterol
- Colon cancer
- Caco-2 cells
- Apoptosis
- Mitochondria
- Lysosomes
- Polyamines

LABORATOIRE D'ACCUEIL :

Laboratoire de Prévention Nutritionnelle du Cancer

Dir. Dr. Francis RAUL

INSERM-UMRS 682

IRCAD-Hôpitaux Universitaires

1, pl. de l'Hôpital

67091 Strasbourg

FRANCE

REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr. Jacques Marescaux de m'avoir accueillie au sein de l'Institut de Recherche contre les Cancers de l'Appareil Digestif (IRCAD). Je lui suis très reconnaissante d'avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de mon travail de Thèse en Sciences de la Vie.

Je souhaiterais remercier les membres du Jury, le Professeur Dominique Stephan, le Docteur Jean Menanteau, le Professeur Germain Trugnan et le Docteur Pierre Bischoff d'avoir accepté de juger le présent travail. Je leur suis très reconnaissante pour leur contribution dans l'obtention de mon diplôme.

Je tiens à remercier mon Directeur de Thèse, Dr. Francis Raul *alias* Chef. Je trouve qu'un merci n'est pas suffisant. Je lui dédie toute ma reconnaissance et gratitude pour tout ce qu'il a fait pour moi. Je le remercie pour ses qualités scientifiques, son humanité, sa compréhension, sa patience. Je le remercie de m'avoir guider correctement au cours de ces années de mon doctorat. Il a su canaliser mon enthousiasme, ma spontanéité et mes découragements. Certes, nous avons vécu des moments de forte contradiction notamment au cours de la correction de divers manuscrits, mais il a su supporter mes éclats de colère avec le sourire. Je tiens à m'excuser pour toute erreur et tout stress que j'ai pu enclencher durant ces 3 ans.

Je tiens à remercier le pilier du laboratoire, Madame Francine Gossé. Je la remercie pour son inestimable aide, son soutien, sa gentillesse et sa compréhension. Elle était toujours disponible pour m'aider et me conseiller. Elle ne s'est jamais opposée à mes demandes notamment, en ce qui concerne les lourdes expériences réalisées sur la partie des polyamines. Elle a dépensé énormément du temps et d'énergie pour mon travail et la correction de ma thèse. Je lui suis très reconnaissante.

J'adresse mes sincères remerciements aux Pr. Eric Marchioni et Dr. Michel Miesch ainsi qu'à leurs équipes pour leur contribution dans la purification et production des oxydes des stérols. Sans leur travail, je n'aurais pas pu réaliser ma thèse. Un grand merci notamment à Diane David et Xin Zhang pour leur aide.

Une pensée particulière au Pr. Nikolaus Seiler qui nous a quittés au mois de juillet 2006. Il m'a toujours soutenue dans mes démarches. Je le remercie chaleureusement pour ses conseils ainsi que pour son aide dans la correction des manuscrits en anglais.

Je remercie le Pr. Jean Louis Gendreau pour sa précieuse aide au microscope électronique. Je l'ai rencontré il y a 8 ans en tant que professeur de biologie cellulaire à l'Université Louis Pasteur. Je l'admire pour sa passion et son pouvoir de transmettre à ses étudiants le goût pour la science.

Mes remerciements vont également à Stéphanie Carnesecchi. Grâce à elle j'ai pu arriver au laboratoire du Dr. Raul. Elle m'a encouragée à réaliser ma thèse à un moment de ma vie où je voulais abandonner mes études.

Je remercie chaleureusement Barbara Fischer qui a disposé de son temps au cours de son doctorat pour m'apprendre à utiliser le cytomètre en flux. Je la remercie pour ses conseils et son amitié.

Je ne vais pas terminer les remerciements sans avoir pensé au Dr. Charlotte Foltzer-Jourdainne pour son amitié et sa gentillesse ainsi qu'à tous les stagiaires qui ont supporté mon esprit autoritaire et mes exigences. Je n'oublie pas Anne Winter, Alexandre Peter, Nelly Bochard, Nicolas Schall.

Je remercie également ma famille adorée, qui m'a soutenue tout le long de mes études en France, mes amis et toutes les personnes de l'IRCAD avec qui, j'ai passé de bons moments de détente.

Je suis arrivée au Laboratoire de Prévention Nutritionnelle du Cancer INSERM-UMRS682, à l'IRCAD le 1^{er} avril 2003. J'ai réalisée ma thèse en Biologie Cellulaire et Moléculaire sous la direction du Docteur Francis Raul. Je termine ainsi mon cycle des 3 ans et 7 mois en ayant comme souvenir des moments de pur bonheur. Merci Chef, merci Francine. Je vous n'oublierai jamais.

A ma mère Sofia

A mon père Ioannis

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	12
INDEX DES FIGURES	15
INDEX DES TABLEAUX	16
AVANT-PROPOS	17
INTRODUCTION.....	18
I. LES OXYDES DU CHOLESTEROL.....	18
1. Généralités	18
2. Sources des oxystérols	19
2.1 Alimentation	19
2.2 Voies de synthèse des dérivés oxygénés en position 7	20
3. Présence du 7 β -hydroxycholestérol dans le plasma.....	21
4. Oxydation des LDL.....	22
5. Biosynthèse des oxystérols	22
6. Récepteurs des oxystérols	23
6.1 Les récepteurs cytosoliques	24
<i>a. La famille des protéines OSBP (Oxysterols Binding Proteins).....</i>	<i>24</i>
<i>b. La famille des protéines ORP (OSBP-related proteins).....</i>	<i>24</i>
<i>c. Protéines fixant les oestrogènes</i>	<i>24</i>
6.2 Les récepteurs nucléaires.....	25
<i>a. Récepteurs nucléaires orphelins LXR (Liver X Receptors).....</i>	<i>25</i>
<i>b. Récepteur arylhydrocarbène (AhR).....</i>	<i>25</i>
<i>c. Facteur stéroïdogénique-1 (SF-1).....</i>	<i>25</i>
7. Protéines se fixant sur les éléments de réponse aux stérols (SREBP)	26
8. Effets biologiques	27
8.1 Membranes cellulaires	27
8.2 Activité pro-inflammatoire	27
8.3 Induction de la mort cellulaire et activité cytotoxique.....	27
II. LES OXYDES DES PHYTOSTEROLS	29
1. Phytostérols : Généralités.....	29

2. Les oxydes des phytostérols : synthèse.....	31
3. Les oxydes de phytostérols dans l'alimentation	32
4. Les oxydes des phytostérols dans l'organisme	33
5. Les propriétés biologiques du 7β-hydroxystérol.....	34
III. LE CANCER COLORECTAL	35
1. Généralités	35
2. La cancérogenèse colique	36
IV. LA MORT CELLULAIRE	39
1. Généralités	39
2. Apoptose	40
2.1 Généralités	40
2.2 Les caspases.....	41
2.3 Les substrats des caspases	44
2.4 Régulation des caspases.....	45
2.5 Voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose	46
2.6 Voie des récepteurs extracellulaires ou voie extrinsèque de l'apoptose.....	48
2.7 Fragmentation de l'ADN.....	49
2.8 Perméabilisation de la membrane mitochondriale.....	50
2.9 Les protéines de la famille Bcl-2	53
<i>a. Protéines de la famille Bcl-2 et perméabilisation mitochondriale.....</i>	<i>55</i>
3. Le stress oxydatif	56
4. Les lysosomes	58
MATERIELS ET METHODES	60
I. ETUDES <i>IN VITRO</i>	60
1. La lignée cellulaire Caco-2	60
2. Culture cellulaire.....	60
3. Molécules testées	61
4. Croissance cellulaire	62
4.1. Test à la sulforhodamine B	62
4.2. Comptage des cellules	63
5. Cytométrie en flux	63
5.1. Généralités	63
5.2 Cycle cellulaire et mesure des particules hypodiploïdes	65

5.3 Marquage à l'Annexine-V /IP : distinction nécrose-apoptose.....	66
5.4. Production du stress oxydatif.....	67
5.5. Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes.....	69
5.6. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial.....	70
5.7. Mesure de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax.....	71
6. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH).....	72
7. Biosynthèse et catabolisme des polyamines.....	74
7.1 Ornithine Décarboxylase (ODC).....	74
7.2 S-Adénosyl Méthionine Décarboxylase (AdoMetDC).....	74
7.3 Dosage de : Putrescine, Spermidine, Spermine & formes acétylées.....	75
8. Fragmentation d'ADN.....	77
9. Mesure de l'activité des caspases : -3, -8 et -9.....	77
10. Libération du cytochrome <i>c</i>	78
11. Mesure de l'activité enzymatique des protéines kinases MAPK.....	79
12. Extraction protéique et Western Blot.....	80
13. Microscopie Optique : Coloration de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342....	82
14. Analyse des ultrastuctures cellulaires par microscopie électronique.....	83
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	85
CHAPITRE I.....	85
1. Résumé.....	86
2. Introduction.....	87
3. Résultats : PUBLICATION n° 1.....	89
4. Résultats complémentaires.....	90
5. Conclusion.....	91
CHAPITRE II.....	92
1. Résumé.....	93
2. Introduction.....	94
3. Résultats : PUBLICATION n° 2.....	95
4. Résultats complémentaires.....	96
5. Conclusion.....	104

CHAPITRE III	105
1. Résumé.....	106
2. Introduction.....	107
3. Resultats : PUBLICATION n° 3.....	110
4. Resultats complémentaires.....	111
5. Conclusion	113
DISCUSSION GENERALE.....	114
CONCLUSION GENERALE	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	125
PUBLICATIONS	151
PARTICIPATIONS	152

LISTE DES ABREVIATIONS

- 7 β -OHchol: 7 β -hydroxycholestérol
7 β -OHsito: 7 β -hydroxysitostérol
ACINUS: Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the nucleUS
AEBS: AntiEstrogen-Binding Site
AhR: Arylhydrocarbon Receptor
AIF: Apoptosis Inducing Factor
AMD: S-Adénosyl Méthionine Décarboxylase
ANT: Adenine Nucleotide Transporter
AO: Acridine Orange
Apaf-1: Apoptotic Protease Activating Factor 1
ASG: Acylated Steryl Glycoside
BH: Bcl-2 Homology
BIR: Baculovirus IAP domain
CAD: Caspase-Activated DNase
CARD: Caspase Activated Recruitment Domain
c-FLIP: cellular FLICE Inhibitory Protein
cIAP: cellular IAP
CsA: Cyclosporine A
CyD: Cyclophilin D
Cyt *c*: Cytochrome *c*
dcSAM: SAM décarboxylée
DED: Death Effector Domain
DFF: DNA Fragmentation Factor
DiOC₂(3): 3,3'-DiethylOxacarboCyanine iodide
DISC: Death-Inducing Signaling Complex
DNA-PK: DNA-dependent Protein Kinase
DR: Death Receptors
 $\Delta\Psi_m$: Potentiel Transmembranaire Mitochondrial
Endo G: Endonucléase G
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ERO: Espèces Réactives d'Oxygène
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter

FADD: Fas Associated Death Domain
FAP: Familial Adenomatous Polyposis
FITC: Fluorescein Isothiocyanate
FS: Free Sterol
FSC: Forward Scatter
HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl Coenzyme A
HNPCC: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer
HSE: Hydroxycinnamate Steryl Ester
IAP: Inhibitor of Apoptosis Proteins
ICAD/DFF45: Inhibitor Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor
IP: Iodure de Propidium
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
LDH: Lactate DesHydrogenase
LDL: Low Density Lipoprotein
LMP: Lysosomal Membrane Permeabilization
LXR: Liver X Receptors
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MEB: Microscopie Electronique à Balayage
MET: Microscopie Electronique à Transmission
MMP: Mitochondrial Membrane Permeabilization
MIMP: Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization
MOMP: Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MPT: Mitochondrial Permeability Transition
NAIP: Neuronal IAP
NLS: Nuclear Localisation Sequence
NO: Oxyde Nitrique
ODC: Ornithine Décarboxylase
ORP: OSBP-related protein
OSBP: Oxysterols Binding Protein
PAO: Polyamine Oxydase
PARP: Poly-(ADP-Ribose)-Polymérase
PE: Phycoérythrine
PKB: Protein Kinase B
PKC: Protein Kinase C

PS: PhosphatidylSérine
PTPC: Permeability Transition Pore Complex
RE: Reticulum Endoplasmique
ROS: Reactive Oxygen Species
RT: Room Temperature
SAM: S-Adénosyl Méthionine
SCAP: SREBP-Cleavage Activating Protein
SE: Steryl Fatty Acid Ester
SF-1: Steroidogenic Factor 1
SG: Steryl Glycoside
Smac-DIABLO: Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor
Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi
SMS: Spermine Synthase
SOD: SuperOxyde Dismutase
SRB: Sulforhodamine B
SREBP: Sterol Response Element Binding Protein
SRM: Spermidine Synthase
SSAT: Spermidine/Spermine N¹-acétyle transférase
SSC: Side Scatter
VDAC: Voltage Dependent Anion Channel
XIAP: X-chromosome linked IAP
Z.VAD-fmk: Benzoloxo-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

INDEX DES FIGURES

Figure 1: Structures chimiques du cholestérol et des 5 oxystérols les plus importants.....	18
Figure 2: Formation de dérivés oxygénés en position 7 par auto-oxydation du cholestérol.	20
Figure 3: Les phytostérols les plus répandus.....	29
Figure 4: Structures chimiques des principaux oxydes du β -sitostérol.....	32
Figure 5 : Estimation de l'incidence des cancers et du taux de mortalité au niveau mondial.	35
Figure 6 : Cascade des événements impliqués dans la cancérogenèse colique et agents chimio-préventifs.....	38
Figure 7 : Schéma de l'activation des caspases.....	43
Figure 8: Assemblage de l'apoptosome.	47
Figure 9 : Les deux voies principales de l'apoptose.	48
Figure 10 : Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale.	51
Figure 11 : Les protéines de la famille Bcl-2.	54
Figure 12 : Cytométrie en flux	63
Figure 13 : Mesure de la taille (FSC) et de la granularité (SSC) cellulaire par le cytomètre.....	64
Figure 14 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....	65
Figure 15 : Perméabilisation de la membrane cellulaire par le méthanol et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (I.P.).....	66
Figure 16 : Externalisation des phosphatidylsérines au cours de l'initiation de l'apoptose.....	66
Figure 17 : Mécanisme d'action du 2',7'-dichlorohydrofluorescéine (HDCF-DA).	68
Figure 18 : Echantillon standard des polyamines (chromatographie HPLC).....	76
Figure 19 : Schéma de méthode « Sandwich ELISA ».	78
Figure 20 : Schéma de la technique du dosage indirect d'un antigène.	80
Figure 21 : Marquage de l'ADN cellulaire par Hoechst 33342	90
Figure 22 : Analyse par MET - groupe témoin.	97
Figure 23 : Analyse par MET - groupe contrôle.	98
Figure 24 : Analyse par MET - groupe 7β -OHchol 24 et 32 h.	100
Figure 25 : Analyse par MET - groupe 7β -OHsito 24 et 32 h.	102
Figure 26 : Structure des principales polyamines.	107
Figure 27 : Métabolisme des polyamines : Biosynthèse et Catabolisme	108
Figure 28 : Expression intracellulaire des protéines ERK et JNK : totales et phosphorylées.	112
Figure 29 : Mécanismes cellulaires activés par le 7β -OHsitostérol (7β -OHsito).	123
Figure 30 : Mécanismes cellulaires activés par le 7β -OHcholestérol. (7β -OHchol)	124

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les récepteurs des oxystérols.....	23
Tableau 2 : Activité du 7 β -hydroxycholestérol sur différentes lignées cellulaires.....	28
Tableau 3 : Classification des caspases.....	41
Tableau 4 : Laser et filtres du cytomètre en flux Becton Dickinson.....	64
Tableau 5 : Programme d'élution des polyamines.....	76

AVANT-PROPOS

Le cancer colorectal se situe parmi les cancers les plus importants et dépend étroitement de l'environnement nutritionnel. Il est admis que la consommation de fruits et de légumes peut contribuer à la diminution du risque de développer ce type de cancer. Parmi les composants végétaux, les phytostérols semblent présenter des effets bénéfiques dans la prévention des maladies cardiovasculaires. Ils pourraient également posséder des propriétés antiprolifératives sur certaines lignées cancéreuses. Actuellement, plusieurs aliments dits « fonctionnels » contiennent des stérols végétaux dans la perspective de réduire le taux de cholestérol circulant. Les phytostérols présents dans l'alimentation peuvent s'oxyder suite au stockage et à la cuisson au même titre que le cholestérol et ces oxydes pourraient avoir des effets physiopathologiques encore mal connus.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressée aux propriétés biologiques du 7 β -hydroxysitostérol et du 7 β -hydroxycholestérol, qui sont les formes oxydées les plus abondantes. Des études précédentes avaient montré que le 7 β -hydroxysitostérol possède une activité cytotoxique sur des lignées cancéreuses mais rares sont les données sur les mécanismes d'action. En revanche, de nombreuses études ont démontré les propriétés pro-athérogènes et cytotoxiques du 7 β -hydroxycholestérol. Mon travail a porté sur la comparaison des effets cytotoxiques du 7 β -hydroxysitostérol *versus* le 7 β -hydroxycholestérol. Ces deux molécules bien qu'elles présentent une grande similarité structurale, elles diffèrent par l'existence d'un groupe éthyle supplémentaire en position 24 pour le 7 β -hydroxysitostérol. Grâce aux données actuelles sur les propriétés biologiques du 7 β -hydroxycholestérol, nous avons recherché les voies et les mécanismes intracellulaires susceptibles d'être activés par le 7 β -hydroxysitostérol. En plus des connaissances acquises au cours de ce travail de thèse sur l'activité biologique du 7 β -hydroxysitostérol, nous avons apporté de nouvelles informations sur les propriétés du 7 β -hydroxycholestérol.

Après une présentation des oxydes de cholestérol et de phytostérols et leurs effets biologiques, une deuxième partie de l'introduction sera consacrée à quelques généralités sur le cancer colorectal. Enfin la dernière partie de l'introduction portera sur l'apoptose et sur les mécanismes intracellulaires impliqués. Après une présentation des méthodologies utilisées au cours de ce travail de thèse, les résultats expérimentaux seront rapportés sous forme de publications. Les conclusions et les perspectives seront développées dans une dernière partie.

INTRODUCTION

I. LES OXYDES DU CHOLESTEROL

1. Généralités

Les oxydes de cholestérol, appelés également oxystérols, sont des molécules de 27 atomes de carbons dérivées du cholestérol qui contiennent des atomes d'oxygène additionnels soit au niveau du noyau stéroïde, soit au niveau de la chaîne latérale. Ils font également partie de la famille des triterpènes. Dans les années 70, Kandutsch et Chen (1973, 1974) ont découvert que certains dérivés oxygénés du cholestérol, y compris le 7 β -hydroxycholestérol avaient des propriétés antiprolifératives et un pouvoir régulateur de la biosynthèse du cholestérol au niveau cellulaire. Les formes oxydées majeures identifiées *in vivo* sont présentées sur la Figure 1.

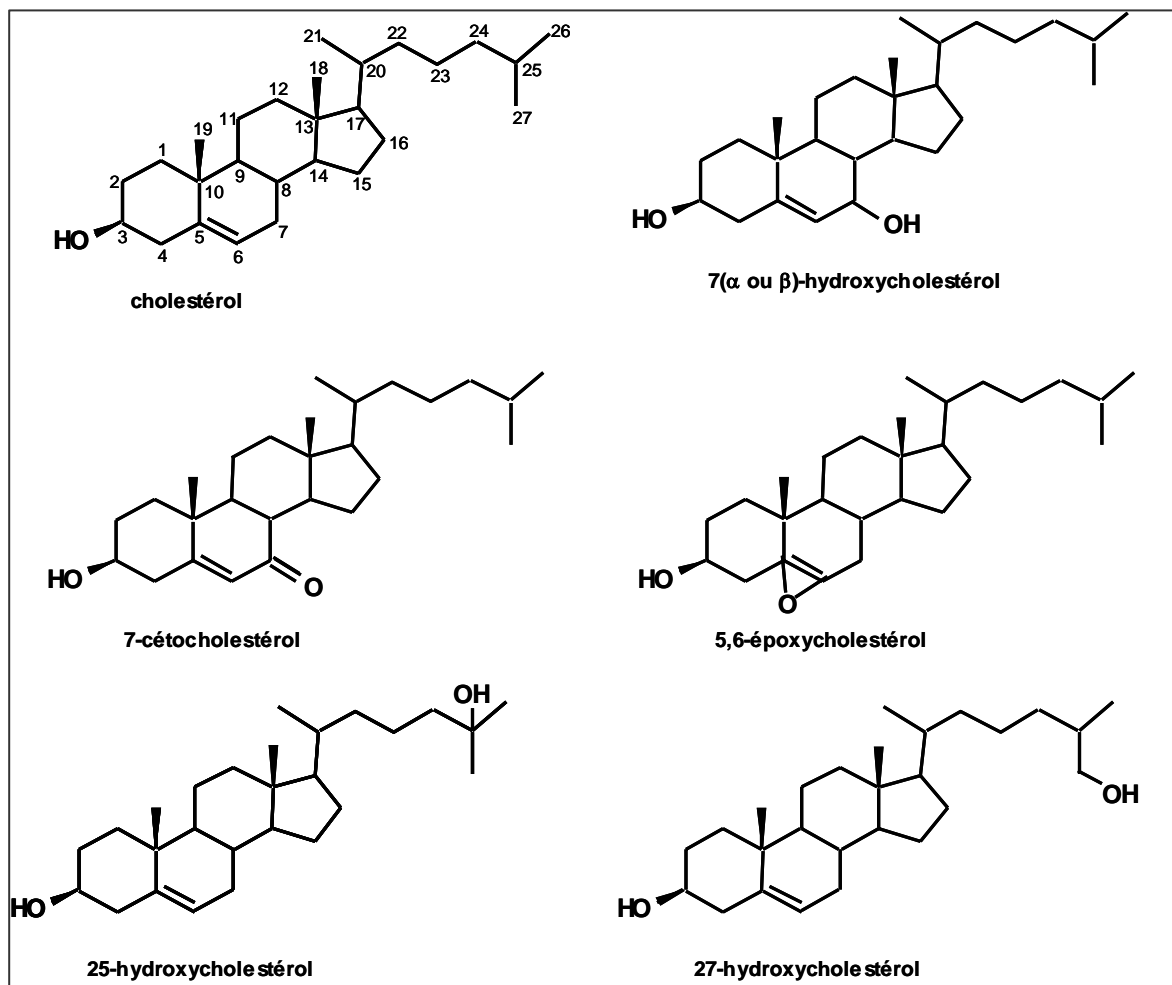


Figure 1 : Structures chimiques du cholestérol et des 5 oxystérols les plus importants.

De nombreuses études ont montré l'implication de ces molécules dans divers processus biologiques. Il a été démontré que certains oxystérols sont des régulateurs naturels de la synthèse de stérols et inhibiteurs de l'activité de l'enzyme 3-oxy-3-méthylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase. Ils peuvent être impliqués dans la pathogenèse d'athérosclérose en tant que composants des LDL (Low Density Lipoprotein) oxydés, induire l'apoptose chez un grand nombre de cellules ou affecter le développement de la calcification des cellules vasculaires, etc. (Schroepfer, 2000). Brown et Goldstein (1997) ont étudié les mécanismes complexes de la régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol, et ont démontré que certains oxystérols y participent en affectant les facteurs de transcription. Toutes ces propriétés biologiques ne représentent qu'une partie du potentiel physiopathologique des oxystérols.

2. Sources des oxystérols

2.1 Alimentation

Tous les aliments contiennent du cholestérol susceptible de former des dérivés oxydés. Les traitements thermiques, le stockage et les radiations ionisantes provoquent la formation d'oxystérols. La structure de la matrice alimentaire ainsi que la présence d'anti-oxydants protègent le cholestérol. Le cholestérol est un constituant majeur des membranes des cellules végétales et animales. Parmi les aliments, l'œuf est une source majeure de cholestérol (300 à 500 mg/100 g). Le jaune d'œuf est riche en cholestérol, qui est protégé de l'oxydation. En revanche, la poudre d'œuf ne confère pas de protection optimale contre les oxydations. De plus, le processus de préparation de cette poudre génère des radicaux libres qui favorisent l'oxydation du cholestérol (Fontana et coll., 1992, 1993). La teneur en oxystérols est exprimée en pourcentage du cholestérol et reflète la qualité d'un aliment. Les méthodes de stockage et de préparation des aliments doivent générer une teneur en oxydes de cholestérol qui soit inférieure à 0,1% pour être considérées conformes. Plusieurs laboratoires ont mesuré le taux des oxystérols dans divers produits alimentaires commerciaux : lait en poudre pour enfants, beurre, viandes et poissons préparés à froid, produits laitiers etc. (Schmarr et coll., 1990; Ohshima et coll., 1993; Rose-Sallin et coll., 1995; Angulo et coll., 1997). Les oxystérols majoritaires dans toutes ces préparations sont ceux dont le groupement hydroxyle se situe en position 7 (7-hydroxycholestérol (α ou β), 7-cétocholestérol).

Un des problèmes majeurs dans l'identification de ces dérivés oxygénés dans les échantillons alimentaires est la formation spontanée des oxydes de cholestérol au cours de l'analyse (Rose-Sallin et coll., 1995).

2.2 Voies de synthèse des dérivés oxygénés en position 7

Deux voies de synthèse principales sont responsables de l'oxydation du cholestérol en position 7 : l'auto-oxydation et le catabolisme du cholestérol :

-L'auto-oxydation : il s'agit d'une réaction majeure non enzymatique dans la détérioration oxydative du cholestérol. Elle est catalysée en présence de radicaux libres, d'ions métalliques et par la température. Nous observons d'abord la formation des isomères de 7-hydroperoxycholestérol qui sont les produits intermédiaires très instables. Ces isomères se convertissent en 7 α - ou 7 β -hydroxycholestérol et en 7-cétocholestérol (Peng et Taylor, 1984; Brown et Jessup, 1999; Yan et coll., 1999; Rodriguez-Estrada et coll, 2004) (Figure 2).

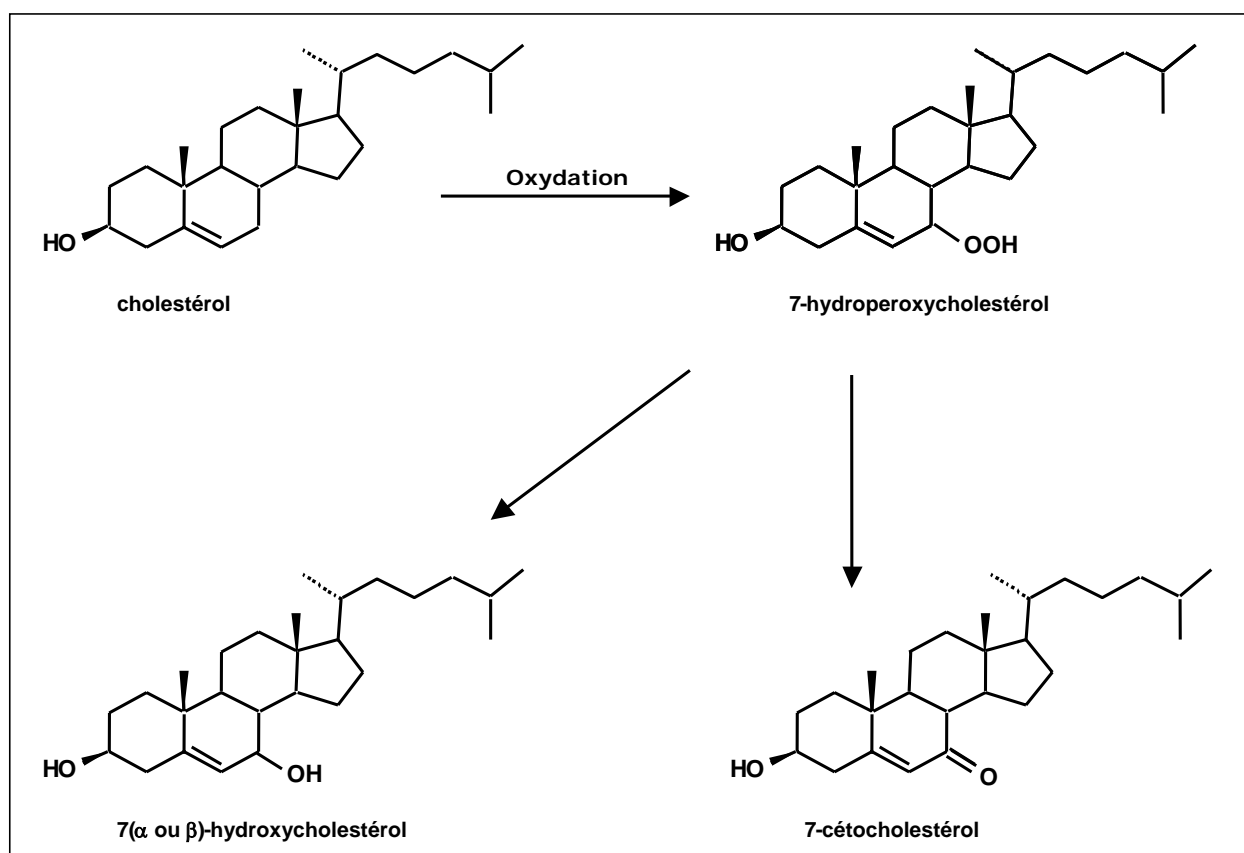


Figure 2 : Formation de dérivés oxygénés en position 7 par auto-oxydation du cholestérol.

-L'oxydation enzymatique : certains oxystérols retrouvés *in vivo* sont issus du catabolisme du cholestérol qui a lieu dans le foie lors de la synthèse des acides biliaires (Brown et coll., 1997). Les enzymes qui catalysent la formation des oxystérols sont des hydrolases spécifiques pour chaque type d'oxystérol synthétisé. L'enzyme microsomale, la 7 α -hydrolase, catalyse la formation du 7 α -hydroxycholestérol. Les 24-, 25- et 27-hydrolases génèrent les dérivés oxydés possédant un groupement hydroxy sur la chaîne latérale. Il y a peu de données qui confirment l'existence d'un mécanisme enzymatique responsable de la formation du 7 β -hydroxycholestérol. Il est généralement admis que les 7-cétocholestérol et 7 β -hydroxycholestérol ne se forment pas par voie enzymatique *in vivo*. Néanmoins, Shoda et coll. (1993) ont mis en évidence la conversion du 7 α -hydroxycholestérol en 7 β -hydroxycholestérol dans les mitochondries hépatiques de rats.

3. Présence du 7 β -hydroxycholestérol dans le plasma

Les études sont peu nombreuses et restent contradictoires. Ainsi, Kudo et coll. (1989) n'ont trouvé que des traces du 7 β -hydroxycholestérol dans le plasma humain des sujets normaux. En revanche, d'autres études ont détecté des quantités significatives de cet oxystérol dans le plasma (Koopman et coll., 1987; Van Doormaal et coll., 1989; Breuer et Björkhem, 1990; Sevanian et coll., 1994). Il reste toutefois à noter que la plupart de ces études expliquent la présence du 7 β -hydroxycholestérol en tant que produit de l'auto-oxydation du cholestérol au cours de la préparation des échantillons pour l'analyse. L'auto-oxydation du cholestérol, qui produit facilement des résultats avec des taux plasmatiques trop élevés en oxystérols, reste un problème majeur dans les processus d'isolation et d'analyse. Il est donc évident que malgré la présence de cet oxystérol dans les préparations alimentaires, sa présence dans le plasma en tant que stérol libre reste à déterminer. Il a été démontré qu'il peut subir une estérification et se trouver dans le plasma sous forme de mono- ou diesters avec l'acide palmitique, stéarique et oléique (Dzeletovic et coll., 1995; Smith et coll., 1981).

4. Oxydation des LDL

Une des sources la plus probable du 7 β -hydroxycholestérol est l'auto-oxydation du cholestérol au cours de l'oxydation des LDL (Brown et Jessup, 1999; Colles et coll., 2001; Schroepfer, 2000). Les mécanismes physiologiques d'oxydation des LDL ne sont pas très bien identifiés. Il a été montré *in vitro* que les trois types cellulaires principaux des parois vasculaires (cellules endothéliales, musculaires lisses et monocytes-macrophages) induisent des modifications oxydatives des LDL (Henriksen et coll., 1981; Heinecke et coll., 1984; Morel et coll., 1984).

L'oxydation des LDL fait intervenir des systèmes enzymatiques tels que les lipooxygénases (Berliner et Heinecke, 1996; Heinecke, 1997), les myéloperoxydases (Daugherty et coll., 1994) ou des substances directement oxydantes telles que les ions métalliques (Berliner et Heinecke, 1996) et les radicaux libres (Hiramatsu et coll., 1987; Cathcart et coll., 1989). Le taux élevé du 7 β -hydroxycholestérol dans les fractions des LDL oxydés est souvent associé à un risque élevé d'athérosclérose (Brown et Jessup, 1999). Pourtant il n'y pas encore de preuves qui justifient la contribution des oxystérols dans l'athérogenèse.

5. Biosynthèse des oxystérols

En 1973, Kandutsch et Chen ont été les premiers à démontrer que certains dérivés oxygénés du cholestérol pouvaient inhiber *in vitro* la biosynthèse de stérols dans des cellules lymphocytaires et hépatiques murines. Les 7-céto- 7 α - et 7 β -hydroxycholestérol inhibent l'activité de la HMG-CoA réductase perturbant ainsi la biosynthèse des stérols. Parmi les oxystérols, ceux qui sont oxygénés sur la chaîne latérale sont les plus efficaces dans la modulation de l'activité de la l'HMG-CoA réductase. Toutefois, des études ont montré que le 7 β -hydroxycholestérol pourrait avoir un effet inhibiteur direct sur l'enzyme au sein de différentes lignées cellulaires (Richert et coll., 1984; Behr et coll., 1991). La relation entre la cytotoxicité de la molécule et son pouvoir modulateur de l'activité de la HMG-CoA réductase reste incertaine.

6. Récepteurs des oxystérols

Il existe deux catégories de récepteurs des oxystérols : les récepteurs cytosoliques et les récepteurs nucléaires. Les deux types interviennent dans la régulation du métabolisme du cholestérol (Tableau 1).

Type de recepteur	Affinité	Références
<u>Récepteurs cytosoliques</u>		
OSBP1	25-hydroxycholestérol	Kandutsch et Chen, 1973; Patel et Thompson, 1990; Levanon et coll., 1990; Moreira et coll., 2001
OSBP2	7-cétocholestérol	
ORP2,3,5	phospholipides	Laitinen et coll., 1999
ORP1,4	25-hydroxycholestérol	Xu et col., 2001 Wang et coll., 2002
AEBS	7-, 6-cholestanol 7-cétocholestérol 7 β -hydroxycholestérol	Hwang, 1990
<u>Récepteurs nucléaires</u>		
LXR α	24(S)-, 25-époxycholestérol	Janowski et coll., 1999
LXR β	22(R)-hydroxycholestérol	
AhR	7-cétocholestérol	Savouret et coll., 2001
SF-1	25-, 27-hydroxycholestérol	Lala et coll., 1997

Tableau 1 : Les récepteurs des oxystérols.

6.1 Les récepteurs cytosoliques

a. La famille des protéines OSBP (Oxysterols Binding Proteins)

En 1977, Kandutsch et coll. ont mis en évidence l'existence de protéines fixant les oxystérols, désignées Oxysterols Binding Proteins (OSBP). Ces protéines avaient une forte affinité pour le 25-hydroxycholestérol. Cette affinité est souvent associée au potentiel de cet oxystérol à diminuer l'activité de la HMG COA réductase (Kandutsch et Thompson, 1980; Taylor, 1992). Les OSBP sont des protéines cytosoliques, ubiquitaires qui après leur fixation à l'oxystérol, sont transloquées du cytosol à l'appareil de Golgi (Ridgway et coll., 1992). Il existe deux formes d'OSBP : OSBP1 et OSBP2. L'OSBP2 qui présente une forte similitude avec l'OSBP1 est localisée principalement dans la rétine et est souvent associée aux membranes cellulaires (Moreira et coll., 2001). Contrairement à l'OSBP1 pour qui, les oxystérols oxydés en position 7 semblent avoir une faible affinité (Patel et Thompson, 1990), l'OSBP2 fixe le 7-cétocholestérol et ne présente qu'une faible affinité pour le cholestérol et le 25-hydroxycholestérol (Moreira et coll., 2001).

b. La famille des protéines ORP (OSBP-related proteins)

Dans la famille d'OSBP, il existe une autre catégorie nommée OSBP-related proteins (ORP). Laitinen et coll. (1999) ont recherché des séquences homologues à l'OSBP chez l'homme et ont identifié 6 nouveaux cDNA codant pour des protéines ayant des localisations différentes. Parmi ces ORP, ORP1 est présente en quantité importante dans le cerveau et son expression est régulée par le 25-hydroxycholestérol. ORP1 pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol dans le système nerveux central (Laitinen et coll., 1999). Il existe également d'autres formes d'ORP dont leur rôle reste à déterminer.

c. Protéines fixant les oestrogènes

Il existe des protéines intracellulaires fixant les oestrogènes (AEBS pour AntiEstrogen-Binding Site) (Hwang, 1990, Schroepfer, 2000). Elles ont été identifiées essentiellement dans les microsomes et sont distribuées de manière ubiquitaire. Le 7 β -hydroxycholestérol figure parmi les oxystérols qui présentent les plus fortes affinités pour ces protéines. L'importance et les conséquences de la fixation des oxystérols sur les AEBS restent inconnues.

6.2 Les récepteurs nucléaires

a. Récepteurs nucléaires orphelins LXR (Liver X Receptors)

En 1996, Janowski et coll. ont démontré que certains oxystérols activent des récepteurs nucléaires qui contrôlent la transcription de facteurs impliqués dans : la biosynthèse des acides biliaires (Lehmann et coll., 1997), le transfert des esters du cholestérol entre les lipoprotéines et le transport réverse du cholestérol (Tall et coll., 2000), l'exportation du cholestérol au niveau des macrophages et fibroblastes (Venkateswaran et coll., 2000), la régulation de la synthèse du cholestérol et des acides gras (Repa et coll., 2001), l'augmentation de l'expression de l'apoprotéine E dans les macrophages et les adipocytes (Laffitte et coll., 2001).

Les LXR existent sous deux formes distribuées différemment au sein des tissus : la forme LXR α qui est exprimée dans les tissus dont le métabolisme lipidique est important et la forme LXR β qui a une localisation ubiquitaire (Schroepfer, 2000). Les oxystérols oxydés sur la chaîne latérale ont une forte affinité pour ce type de récepteurs. Par contre, les oxystérols oxydés en position 7 sont de très mauvais ligands. Les LXR pourraient être impliqués dans l'homéostasie du cholestérol cellulaire (Janowski et coll., 1999).

b. Récepteur aryhydrocarbène (AhR)

Ce récepteur fixe un certain nombre de xénobiotiques dont les dioxines, les benzopyrènes et les polychlorobiphényles. Les travaux de Savouret et coll. (2001) ont démontré que le 7-cétocholestérol est un modulateur endogène du récepteur AhR *in vivo* et *in vitro*.

c. Facteur stéroïdogénique-1 (SF-1)

SF-1 est un membre de la famille des récepteurs orphelins et joue un rôle important dans la régulation de l'expression de divers composants de la stéroïdogénèse. Les 25- et 27-hydroxycholestérol augmentent l'activité transcriptionnelle induite par le SF-1 (Lala et coll., 1997).

La plupart des travaux sur l'identification et l'analyse fonctionnelle de ces récepteurs, ont utilisé comme substrats les oxystérols issus de la voie enzymatique, qui présentent des propriétés inhibitrices dans la synthèse du cholestérol. Excepté le travail fait sur les AEBS (Hwang et coll., 1990), il existe peu de données sur la relation entre le 7 β -hydroxycholestérol et ces récepteurs (Schroepfer, 2000).

7. Protéines se fixant sur les éléments de réponse aux stérols (SREBP)

Les SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) sont des facteurs de transcription qui activent spécifiquement des gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol, l'endocytose des LDL, la synthèse des acides gras et le métabolisme du glucose (Edwards et coll., 2000). Il existe trois formes : SREBP-1a, SREBP-1c et SREBP-2, codées par deux gènes différents. Les SREBP sont initialement synthétisés sous forme de protéines transmembranaires, fixées au niveau du noyau et du réticulum endoplasmique (RE). Lorsque la concentration en cholestérol cellulaire est faible, des protéases clivent les SREBP, libérant ainsi une partie soluble qui est le facteur de transcription. Ce facteur migre vers le noyau, il se fixe sur un élément de réponse aux stérols (SRE : Sterol Response Element) situé au niveau du promoteur du gène cible, et active sa transcription. La quantité de cholestérol ou des oxystérols présents dans la cellule régule l'activation de ce facteur de transcription (Schroepfer, 2000). Le clivage des SREBP est sous le contrôle de la protéase SCAP (SREBP-Cleavage Activating Protein), qui joue le rôle de protéine chaperonne en favorisant le transport des SREBP non clivés, depuis le RE vers l'appareil de Golgi. Dans l'appareil de Golgi d'autres protéases peuvent cliver et libérer les fragments actifs des SREBP. Les SREBP peuvent également être clivés par des caspases au cours de l'apoptose (Higgins et Ioannou, 2001).

Seuls les effets du 25-hydroxycholestérol sur ces protéines sont étudiés, en tant que régulateur potentiel de la biosynthèse des stérols. Les effets du 7 β -hydroxycholestérol n'ont pas été décrits dans cette théorie.

8. Effets biologiques

8.1 Membranes cellulaires

Les oxystérols peuvent perturber les membranes cellulaires étant donné que leur structure est proche de celle du cholestérol. Ils affectent la fluidité et la perméabilité membranaire et l'activité de la protéine kinase C (PKC) (Schroepfer, 2000). Toutes ces propriétés ont été décrites pour différents oxystérols. En ce qui concerne le 7 β -hydroxycholestérol, Richert et coll. (1984) ont démontré qu'il diminuait la fluidité membranaire des cellules hépatiques, cet effet étant corrélé avec la réduction de l'activité de l'HMG-CoA reductase induite par cet oxystérol. Pannecoucke et coll. (1994) ont montré que le 7 β -hydroxycholestérol au sein de préparations membranaires artificielles, modifiait la fluidité membranaire.

8.2 Activité pro-inflammatoire

L'activité pro-inflammatoire des cellules endothéliales se caractérise par l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β ainsi que, par l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1. Le 7 β -hydroxycholestérol peut induire l'activation d'une telle réponse pro-inflammatoire (Lemaire et coll., 1998).

8.3 Induction de la mort cellulaire et activité cytotoxique

La cytotoxicité des oxystérols a largement été décrite dans la littérature. Le 7 β -hydroxycholestérol a suscité beaucoup d'intérêt par sa forte présence dans les lésions athérosclérotiques en tant que composant des LDL oxydés (Brown et Jessup, 1999; Schroepfer, 2000). Il induit l'apoptose des macrophages et des monocytes et l'apoptose est un processus important dans le développement d'athéromes. Toutefois, le 7 β -hydroxycholestérol, induit l'apoptose ou la nécrose dans d'autres types cellulaires qui sont liés au développement tumoral. Le Tableau 2 présente une synthèse des travaux effectués concernant le 7 β -hydroxycholestérol. Les travaux antérieurs à 1999 sont décrits de façon exhaustive par Schroepfer (2000). Il est difficile de comparer toutes ces études car il semblerait que la toxicité de cette molécule varie en fonction des conditions expérimentales. Globalement dans la littérature, la concentration utilisée varie entre 10 à 100 μ M (5 à 40 μ g/ml) et les temps d'incubation avec les cellules entre 12 et 96 h.

Lignées cellulaires	Activité	Références
Athérogénèse Cellules endothéliales /macrophages/monocytes	Apoptose, homéostasie du Ca ²⁺ Fragmentation ADN, activation Fas/FasL, activation caspases, perméabilisation mitochondriale, stress oxydatif, structures myéliniques perturbées, nécrose, accumulation de lipides, accumulation ferritine, perturbation lysosomiale et libération cathépsines, activation MAP kinases, génération céramides, augmentation taux du glutathion, apoptose indépendante des caspases	Ryan L et coll., 2006 Lizard et coll., 1999; O'Callaghan et coll., 2001, 2002; Ares et coll., 2000, Lee et Chau, 2001; Li et coll., 2001, 2005; Lyons et coll., 2001; Miguet et coll., 2001; Miguet-Alfonsi et coll., 2002; Uemura et coll., 2002; Maguire et coll., 2003; Biasi et coll., 2004; Li et Yuan, 2004; O'Sullivan et coll., 2005; Prunet et coll., 2005, 2006; Ruiz et coll., 2005; Ryan L et coll., 2004a,b, 2005
Cancer		
Colon	Clivage PARP, activation caspases Nécrose	Maier et coll., 1999 Ryan E et coll., 2005
Hépatome	Augmentation sensibilité aux radiations	Hyun et coll., 2002
Leucémie	Retro-régulation Bcl-2, retro-régulation p21, accumulation phase G ₂ /M	Lim et coll., 2003
Lymphome	Cytotoxicité, fragmentation ADN, activation caspases	Yi et coll., 1990
Poumon	Apoptose, activation caspases, perméabilisation mitochondriale, stress oxydatif	Kang et coll., 2005
Alzheimer	Neurotoxique	Nelson et Alkon, 2005

Tableau 2 : Activité du 7 β -hydroxycholestérol sur différentes lignées cellulaires.

Les processus qui sont activés dans les différentes lignées cellulaires sont principalement caractérisés par l'induction de l'apoptose associée à la fragmentation d'ADN, l'activation des caspases par voie mitochondriale et voie extrinsèque, la perméabilisation de la mitochondrie, libération du cytochrome *c*, le clivage de la PARP (poly-(ribo-adénine)-polymérase), la régulation de la protéine Bcl-2 etc. Ainsi plusieurs mécanismes de signalisation cellulaire au cours de l'apoptose sont proposés dans la littérature, ce qui suggère que d'une part, il est possible que plusieurs voies d'activation co-existent au sein d'une même cellule et d'autre part, il existe des mécanismes différents en fonction du type cellulaire ainsi que des conditions expérimentales.

II. LES OXYDES DES PHYTOSTEROLS

1. Phytostérols : Généralités

Les cellules de mammifères contiennent du cholestérol qui sert à réguler la fluidité, la perméabilité et les propriétés métaboliques des membranes. Les cellules végétales possèdent une grande variété de stérols en plus du cholestérol, les phytostérols (Moreau et coll., 2002). Actuellement, une centaine de phytostérols sont connus. Ils font partie de la famille des triterpènes et se différencient du cholestérol par la présence d'une double liaison et/ou d'un groupement méthyle ou éthyle en position C24 de la chaîne alkyle latérale. Certains portent également un groupe méthyle supplémentaire sur la partie cyclique du noyau stéroïde. Les phytostérols les plus répandus, retrouvés dans les cellules des plantes supérieures, sont les Δ^5 -phytostérols, caractérisés par la présence d'une double liaison entre les C5 et C6 au niveau du cycle B du noyau. Parmi ceux-ci, il y a le β -sitostérol (45-95% de stérols totaux présents dans les plantes), le stigmastérol, le campestérol et le brassicastérol (Moreau et coll., 2002) (Figure 3).

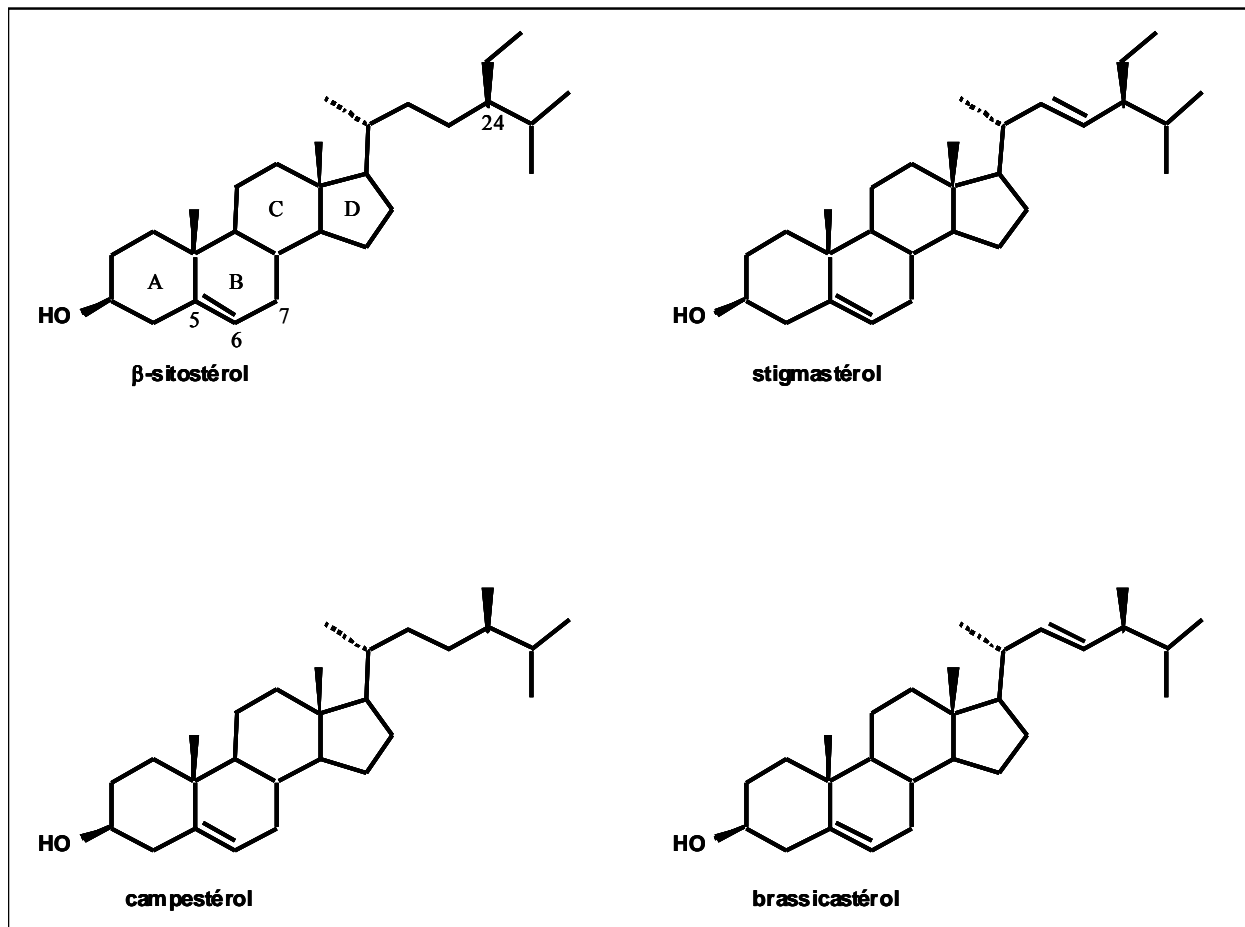


Figure 3 : Les phytostérols les plus répandus.

Dans les tissus végétaux, les phytostérols sont présents dans les fruits et légumes sous cinq formes différentes : la forme libre (FS: free sterol), la forme d'esters d'acides gras (SE: steryl fatty acid ester), la forme de dérivés glycosylés (SG: steryl glycosid), la forme d'esters d'acides gras de dérivés glycosylés (ASG: acylated steryl glycosid), la forme d'esters d'hydroxycinnamates (HSE: hydroxycinnamate steryl ester). Les formes SE, SG, ASG et HSE caractérisent les phytostérols communément appelés « phytostérols conjugués » (Moreau et coll., 2000).

La quantité de phytostérols consommée varie entre 140 à 360 mg par jour et provient en grande partie des huiles végétales, des céréales, des fruits et des légumes (Piironen et Lampi, 2004). L'absorption des phytostérols au niveau de l'intestin grêle est inférieure à celle du cholestérol. Pour un régime alimentaire riche en phytostérols de 160 à 360 mg/jour seulement 0,3 à 1,7 mg/dl de stérols végétaux sont retrouvés dans le sang (Ling et Jones, 1995). De nombreuses études ont porté sur le potentiel des phytostérols à réduire le taux d'absorption de cholestérol dans le cadre d'une prévention des maladies cardiovasculaires (Ho et coll., 2005; de Jong et coll., 2003). Il a été démontré que la consommation d'esters de phytostérols (2-3 g/jour), en combinaison avec une alimentation faible en graisses, pouvait permettre la réduction du taux de cholestérol plasmatique total et du LDL-cholestérol (Miettinen et Gylling, 2004, Tikkanen, 2005). Il est généralement admis que les phytostérols sont plus lipophiles que le cholestérol et ont ainsi, une affinité plus importante pour les micelles qui sont impliquées dans le processus digestif (Tapiero et coll., 2003). En revanche, la concentration du taux de HDL-cholestérol ne semble pas être affectée par les stérols végétaux. Ils peuvent également se comporter en tant que substrats des enzymes bactériennes au niveau du côlon, ce qui inhibe la métabolisation du cholestérol et favorise son élimination fécale (Rao et Janezic, 1992).

Actuellement, plusieurs aliments dits « fonctionnels » contiennent des esters de phytostérols ou des phytostanols. Il s'agit de margarines et de produits laitiers, tels que les produits Fruit d'Or Pro-activ : 8 g/100 g des stérols végétaux sont sous forme d'esters dans les margarines Cuisine ou Tartine ; 0,6 g/100 g des stérols végétaux sont sous forme libre dans les yaourts nature ou fruits ; 0,3 g/100 g des stérols végétaux sont également sous forme libre dans le lait demi-écrémé (Institut d'Or Pro-Activ).

L'intérêt pour la consommation des stérols végétaux a conduit au développement de recherches sur les autres propriétés biologiques éventuelles de ces composés. Des études ont ainsi porté sur les propriétés antitumorales des phytostérols (cellules cancéreuses du sein, du côlon, de la prostate, du poumon) ainsi que sur leurs effets modulateurs au niveau du système immunitaire (Awad et Fink, 2000; Bouic, 2001; Berger et coll., 2003 ; Tapiero et coll., 2003; Ovesna et coll., 2004). En revanche, les résultats obtenus *in vivo* restent contradictoires (Quilliot et coll., 2001; de Jong et coll., 2004). Toutefois, il est difficile de comparer les différents travaux car les phytostérols sont utilisés sous diverses formes chimiques, isolés ou sous forme de mélange et les conditions expérimentales varient d'une étude à l'autre.

2. Les oxydes des phytostérols : synthèse

Les stérols végétaux présents dans les aliments peuvent s'oxyder lors du stockage et de la cuisson au même titre que le cholestérol. Les mécanismes d'oxydation des phytostérols sont similaires à ceux du cholestérol. L'insaturation portée sur le cycle B du noyau stérol ou celle située sur la chaîne alkyle latérale sont particulièrement sensibles aux phénomènes d'oxydation. Les principaux oxydes retrouvés dans les aliments sont les formes hydroxyles, cétones et époxydes (Plat et coll., 2001). Comme pour les oxydes du cholestérol, notre intérêt se porte sur les oxydes du β -sitostérol et plus particulièrement, sur le 7 β -hydroxysitostérol (Figure 4).

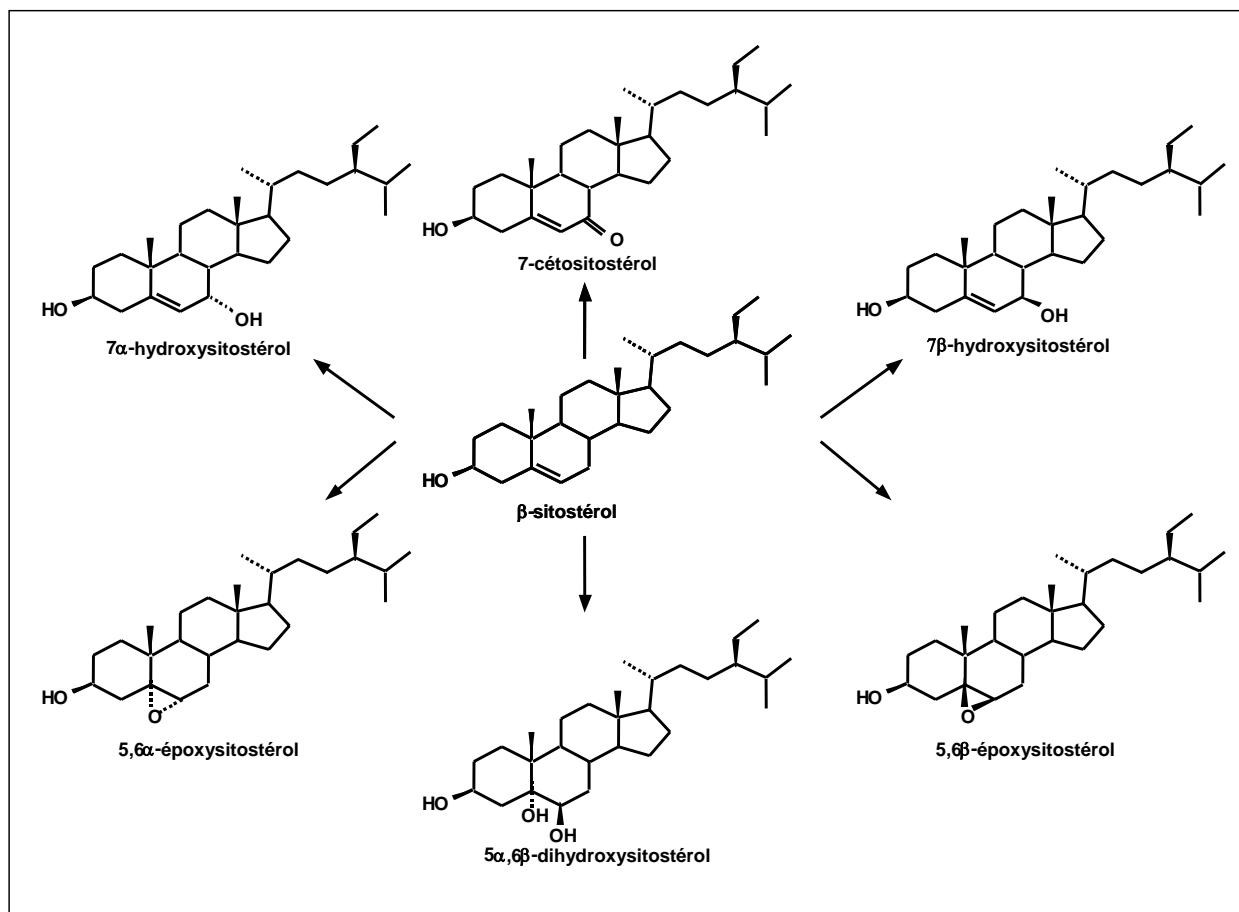


Figure 4 : Structures chimiques des principaux oxydes du β -sitostérol.

3. Les oxydes de phytostérols dans l'alimentation

Les phytostérols sont des produits stables. Cependant, ils présentent des insaturations et peuvent ainsi s'oxyder à des températures élevées ou en présence de l'air (Soupas et coll., 2002). La détermination des oxydes de phytostérols est très difficile. Cette famille dénombre de nombreux membres dont la structure est similaire, leur quantité présente dans les aliments se calcule en traces, les fractions lipidiques de certains aliments et les échantillons biologiques, sont complexes à analyser et les oxydes des phytostérols peuvent se dégrader et/ou se former au cours de l'analyse des échantillons. (Plat et coll., 2001; Zhang et coll., 2005, 2006; Johnsson et Dutta, 2005). Il existe peu de données dans la littérature à cause de l'absence de protocoles d'expérimentation précis, sur l'extraction et la purification des différents oxydes à l'état isolé (Grandgirard et coll., 2004c). Certains travaux ont montré que le raffinage et le stockage des matières grasses végétales pouvaient également conduire à l'oxydation des stérols. (Kochlar, 1983).

Des expérimentations réalisées sur les huiles alimentaires, le beurre et la margarine contenant du β -sitostérol, ont mis en évidence la formation d'oxydes de ce stérol avec une préférence pour la configuration 7β (Guardiola et coll., 2004).

4. Les oxydes des phytostérols dans l'organisme

Grandgirard et coll., (1999) ont travaillé sur l'absorption intestinale des oxydes des phytostérols et il semblerait que leur absorption est inférieure à celle des oxydes du cholestérol. D'autres études chez les rats alimentés avec des oxydes des phytostérols ont montré qu'une faible quantité de ces oxydes se retrouve dans le sérum ou le plasma des animaux (Grandgirard et coll., 2004a; Tomoyori et coll., 2004). Il semblerait que l'incorporation des oxydes des phytostérols dans les tissus de hamsters, dépend étroitement de la concentration de ces oxydes présents dans l'alimentation. En ce qui concerne des études chez l'homme, les oxydes des phytostérols et parmi eux le 7β -hydroxysitostérol, sont retrouvés dans le sérum des patients atteints de phytostérolémie. Il s'agit d'une pathologie rare qui est caractérisée par un stockage anormal des stérols végétaux dans le sérum et une prédisposition importante à une athérosclérose prématurée (Plat et coll., 2001). Enfin, Grandgirard et coll. (2004b) ont détecté des oxydes des phytostérols dans le plasma humain de volontaires sains. Ces chercheurs ont prélevé le sang de 13 volontaires, hommes et femmes confondus et ont détecté des quantités variant de 4,8 à 57,2 ng/ml de plasma. Cependant, ils ne précisent pas la nature de l'alimentation de ces individus et ils suggèrent que la présence de ces oxydes est due soit à la composition du régime alimentaire soit à l'oxydation des phytostérols *in vivo* dans le plasma. Il est ainsi évident que depuis que, les oxydes des phytostérols peuvent être d'origine alimentaire, nous pouvons nous demander si ces oxydes se forment également *in vivo*. En effet, il existe des études qui suggèrent que certains phytostérols ainsi que les formes oxydées subissent des réactions métaboliques avant qu'ils ne soient excrétés (Guardiola et coll., 2002; Grandgirard et coll., 1999; 2004a,d). Pourtant un tel processus doit être vérifié. De plus, il n'existe aucune évidence sur l'oxydation des phytostérols par voie non enzymatique *in vivo* (Grandgirard et coll., 2004d).

5. Les propriétés biologiques du 7 β -hydroxysitostérol

La cytotoxicité des oxydes des phytostérols n'a pratiquement pas été explorée et les résultats sont contradictoires. Il est important de noter que la difficulté de purifier les oxydes des phytostérols, a conduit à l'utilisation de mélanges contenant des taux variables des différents oxydes des stérols végétaux. Adcox et coll. (2001) ont montré que les oxydes des β -sitostérol et campestérol en mixture, ont les mêmes effets cytotoxiques que les oxydes du cholestérol sur les macrophages C57BL/6 en culture mais, à des concentrations plus importantes. Maguire et coll. (2003) ont comparé les effets cytotoxiques du 7 β -hydroxysitostérol et du 7 β -hydroxycholestérol sur les macrophages U937 et ont conclu que les deux composants induisent l'apoptose accompagnée d'une chute du glutathion intracellulaire, liée à une génération de stress oxydatif. Dans cette étude, la concentration du 7 β -hydroxysitostérol était supérieure à celle du 7 β -hydroxycholestérol. Ryan et coll. (2005) ont également comparé les effets cytotoxiques des oxydes des phytostérols à ceux des oxydes du cholestérol. Toutes les molécules sont fournies sous forme de mélange. Ces composés activent l'apoptose chez les macrophages U937, alors qu'ils provoquent la nécrose des cellules cancéreuses coliques Caco-2 et hépatiques HepG2. En revanche, une étude *in vivo* réalisée par Lea et coll. (2004) décrit que les oxydes d'esters des phytostérols administrés à des rats sous forme de mixture (30% d'oxydes), n'ont aucun effet génotoxique ou cytotoxique.

Il semblerait que les propriétés biologiques des oxydes des phytostérols dépendent du type cellulaire et du type de la molécule administrée. De plus, le mode d'administration sous la forme d'un mélange ou sous la forme de molécule isolée, pourrait jouer un rôle crucial sur les propriétés biologiques observées.

III. LE CANCER COLORECTAL

1. Généralités

Les cancers figurent parmi les principales causes de décès dans la plupart des pays industrialisés. Au rang mondial et selon les données estimées en 2000, l'incidence des cancers et le taux de mortalité associée, ont augmenté de l'ordre de 22% depuis 1990 (Parkin, 2004). Les cancers colorectaux sont au troisième rang des cancers tous sexes confondus. Ce cancer vient au troisième rang chez l'homme, derrière le cancer du poumon et le cancer de la prostate, alors que chez la femme, il occupe la quatrième position derrière le cancer du sein, de l'estomac et de l'utérus (Figure 5). La France se classe parmi les pays ayant une fréquence élevée de cancers colorectaux, juste derrière les Etats-Unis et l'Australie. En 2000, plus de 36.000 nouveaux cas ont été diagnostiqués (Ligue, 2002). La distribution géographique montre que l'incidence du cancer colorectal pour la période 1980-2000, est plus importante dans les départements du Haut-Rhin et Bas-Rhin que dans les départements localisés au sud du pays (Hérault, Tarn). La fréquence d'apparition de ce type de cancer augmente avec l'âge et son incidence double ensuite à chaque décennie. L'âge moyen de diagnostic est d'environ 70 ans (Bouvier et coll., 2006).

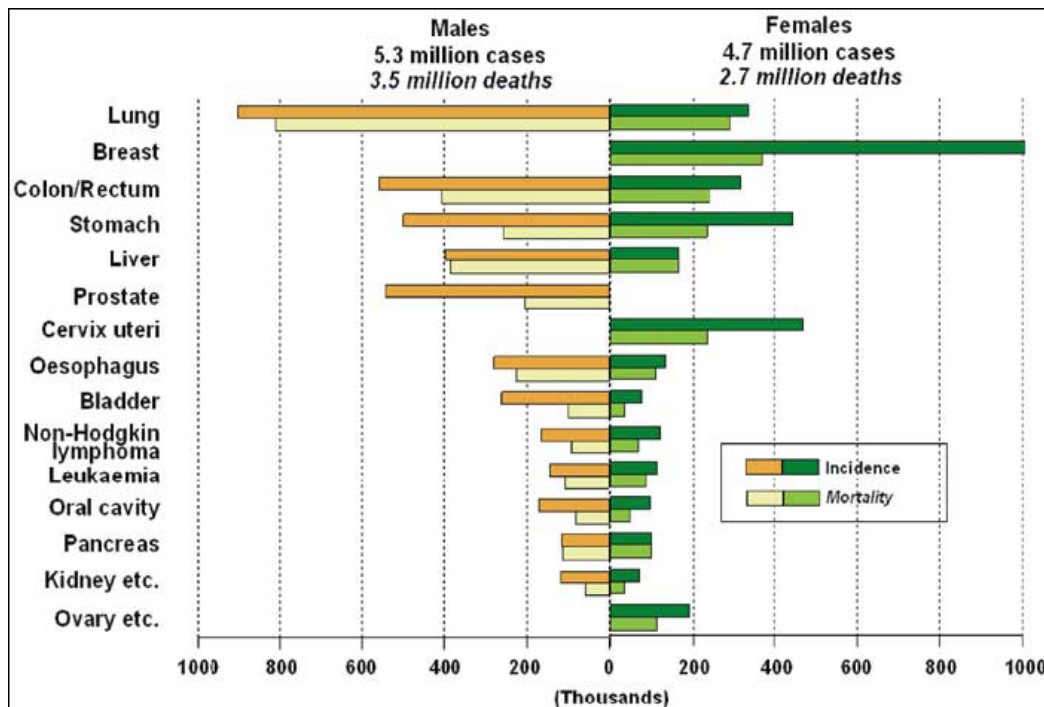


Figure 5 : Estimation de l'incidence des cancers et du taux de mortalité au niveau mondial. (Parkin, 2006)

Il est communément admis que le cancer est une maladie multifactorielle en raison de nombreux facteurs qui peuvent concourir à son déclenchement : il existe les facteurs biologiques individuels (prédispositions génétiques à certains cancers, polymorphisme génétique...) et les facteurs liés aux comportements individuels et à l'environnement au sens large (tabagisme, consommation d'alcool, habitudes alimentaires, exposition à des produits chimiques...). C'est aussi une maladie multiphasique puisque son développement est un phénomène prolongé dans le temps, comportant plusieurs étapes. Ces différentes étapes sont issues du déroulement d'événements génétiques et épigénétiques. Les événements génétiques correspondent à une accumulation d'altérations génétiques irréversibles, transmises de manière héréditaire ou induites par des facteurs environnementaux génotoxiques, ou dues à l'instabilité génétique des cellules tumorales au fur et à mesure de leur transformation. Les événements épigénétiques sont un ensemble de modulations en partie réversibles, favorables à la cancérogenèse, induites par des facteurs endogènes (hormones, facteurs de croissance...) ou exogènes (nutriments...) qui interviennent de multiples manières (modification de l'expression d'un gène, activation ou inhibition d'enzymes...), en particulier sur les voies de régulation de la prolifération et/ou de la mort cellulaire (Riboli et coll., 1996).

2. La cancérogenèse colique

Le côlon présente sur sa paroi colique quatre couches : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est composée d'un épithélium monostratifié qui pénètre à l'intérieur des cryptes qui sont nombreuses et régulièrement espacées. Lors de la cancérogenèse colique et plus précisément au moment de la formation des adénomes, les entérocytes s'accumulent à la base des cryptes indiquant vraisemblablement un défaut dans l'adhérence et/ou dans la migration des cellules. L'équilibre entre division et mort cellulaire est perturbé, entraînant une prolifération anarchique des cellules dans les cryptes. Ces phénomènes sont associés à des altérations de deux grands types de gènes : les proto-oncogènes qui activent la prolifération cellulaire et les gènes suppresseurs de tumeurs qui l'inhibent (Meunier et coll., 1988).

La cancérogenèse est caractérisée par trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation correspond à l'acquisition de caractères néoplasiques suite à une ou plusieurs lésions stables et irréversibles de l'ADN induites par un agent carcinogène. Les cellules initiées restent dans un état quiescent pendant un laps de temps important sans exprimer leurs potentialités oncogènes. L'apparition de cellules initiées est nécessaire mais n'est pas suffisante pour conduire à un développement tumoral. Le passage des cellules initiées d'un état quiescent à un état prolifératif nécessite l'intervention d'autres facteurs. Ce passage est initié au cours de la phase de promotion où les cellules cancéreuses se transforment en clones cancéreux. Il s'agit d'une étape réversible, tout au moins dans la phase initiale, si l'exposition à l'agent promoteur n'est pas réitérée. La progression correspond à la transformation irréversible des cellules initiées précancéreuses et à l'apparition clinique de la tumeur. Cette phase se caractérise par une grande instabilité génomique. Suite à ces trois phases, il y a celle de l'invasion et de la dissémination des cellules tumorales s'échappant de leur organe d'origine, pour migrer vers d'autres tissus et former des métastases à distance. Ce modèle multiphasique ne dévoile pas toute la complexité des mécanismes conduisant à la formation d'une tumeur maligne. Néanmoins, il représente le schéma conciliant les données issues de la cancérogenèse expérimentale et humaine.

Ainsi, le cancer colorectal résulte d'une série de modifications génétiques qui amènent à la perte progressive et irréversible du contrôle de la croissance cellulaire et de la différenciation. L'existence d'un grand nombre de voies moléculaires responsables de ces modifications, justifie l'existence des plusieurs tumeurs intestinales avec le phénotype du cancer colorectal mais de nature biologique différente. Nous citons le cancer colorectal sporadique, la polypose adénomateuse familiale ou FAP (Familial Adenomatous Polyposis) et les syndromes de polypose qui lui sont associés, le cancer colorectal héréditaire sans polypose ou HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer), le cancer colorectal associé à l'inflammation intestinale et le cancer colorectal familial. Il est évident que l'existence de tous ces types de cancer colorectal complique les efforts en terme de prévention et de thérapie (Ponz de Leon et Percesepe, 2000).

Au cours de la cancérogenèse colique, un grand nombre de gènes, molécules ou signaux cellulaires sont altérés. Parmi eux, il existe des régulateurs de l'apoptose tels que la protéine p53, les inhibiteurs d'apoptose (IAP : Inhibitor of Apoptosis), la protéine COX-2 etc. La Figure 6 décrit les événements moléculaires au cours de la cancérogenèse colique qui transforment la muqueuse colonique normale en carcinome à travers des étapes de dysplasie. Les divers agents chimiopréventifs, qui peuvent agir à différents niveaux de la cancérogenèse colique sont également présentés (Raju et Cruz-Correa, 2006). La plupart d'entre eux visent à sensibiliser les cellules face à l'apoptose. Les cellules tumorales échappent souvent au processus apoptotique et son activation constitue une nouvelle stratégie pour contourner la résistance des cellules tumorales face à la mort.

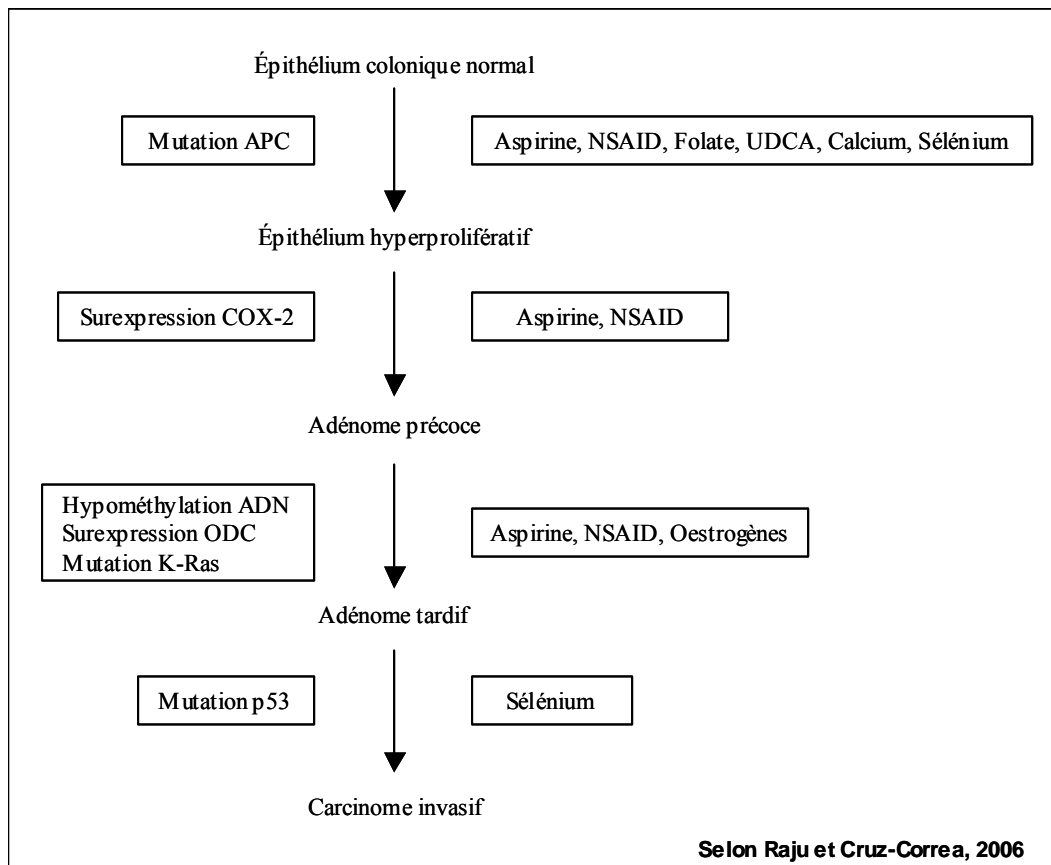


Figure 6 : Cascade des événements impliqués dans la cancérogenèse colique et agents chimiopréventifs.

NSAID : Nonsteroidal anti-inflammatory drugs ; UDCA : Ursodeoxycholic acid.

IV. LA MORT CELLULAIRE

1. Généralités

La mort cellulaire est un processus qui peut survenir soit spontanément soit en présence d'agents cytotoxiques. Des 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 enclenchée accidentellement ou intentionnellement en présence d'agents cytotoxiques. Du point de vue morphologique, les cellules qui meurent par nécrose sont caractérisées par l'augmentation du volume de leur cytoplasme, le gonflement de différents organites et la distorsion de la chromatine. La membrane cellulaire se désintègre, et il y a ainsi libération de tout le contenu intracellulaire. Un tel processus peut être à l'origine d'inflammations et de dommages au niveau des tissus (Proskuryakov et coll., 2003). L'apoptose ou mort programmée 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 spécifiques.

Enfin, il existe de nombreuses études qui ont mis en évidence l'existence de deux autres types de mort cellulaire, qui peuvent être dépendants ou indépendants de l'apoptose. Il s'agit de la mort cellulaire par inhibition de l'autophagie et la mort cellulaire par sénescence. L'autophagie est un processus qui permet le renouvellement des composants cellulaires lorsque les conditions nutritives de la cellule sont limitées. L'autophagie fait intervenir les lysosomes et leurs enzymes. Elle peut être activée soit lorsque les mécanismes effecteurs de l'apoptose sont inhibés soit en présence des inhibiteurs des enzymes des caspases qui sont les enzymes clés de l'apoptose (Kroemer et Jäättelä, 2005). 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. Apoptose

2.1 Généralités

Le terme apoptose est utilisé pour décrire une des formes de mort cellulaire survenue dans les organismes multicellulaires. L'apoptose est définie en tant que mort cellulaire programmée qui implique le « suicide » des cellules à l'état individuel en faveur du bon fonctionnement de l'organisme dans son ensemble. L'apoptose est un processus qui 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).

L'activité apoptotique est nécessaire aussi bien lors du développement d'un organisme durant les changements morphologiques qu'il subit à l'embryogenèse, que pendant l'activation du système immunitaire (Siegel, 2006). Ce processus est essentiel dans le maintien du nombre de cellules dans les tissus et de manière générale, dans le maintien de l'équilibre de l'organisme. L'inhibition de l'apoptose ou une apoptose défectueuse ont 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).

L'apoptose conduit à la perte de l'intégrité des membranes cellulaires, ainsi qu'au gonflement et la rupture de la cellule sans provoquer de dommages aux cellules environnantes. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par des changements morphologiques stéréotypiques tels que le rétrécissement cellulaire, la perte de l'homogénéité de la forme, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la dégradation des protéines, le désassemblage des organites et la formation des corps apoptotiques qui sont éliminés par le système immunitaire (Jones et Gores, 1997).

De nombreux *stimuli* localisés à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont à l'origine de l'enclenchement d'un processus apoptotique. Dans certains cas, 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, l'interruption de la signalisation qui régule le cycle cellulaire, les ligands de récepteurs spécifiques de la mort cellulaire (DR : Death Receptors).

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 et coll., 2006b).

2.2 Les caspases

Les facteurs typiques de l'apoptose sont des enzymes protéolytiques connues sous le nom des caspases (Cysteiny-ASpartate-SPECific proteASES). Le génome humain code pour au moins 14 caspases (Tableau 3).

Caspase	Fonction	Unité interaction
	Activateurs des cytokines	
Caspase-1	Interleukine (IL)-1 β	CARD
Caspase-4	-	CARD
Caspase-5	-	-
Caspase-11	-	-
Caspase-12	Niveau RE, active caspase-3/9	-
Caspase-13	-	-
Caspase-14	-	-
	Initiatrices	
Caspase-2	Libération cytochrome c	CARD
Caspase-8	Voie extrinsèque	DED
Caspase-9	Voie intrinsèque	CARD
Caspase-10	Voie extrinsèque	DED
	Effectrices	
Caspase-3	Déclenche l'apoptose	-
Caspase-6	-	-
Caspase-7	-	-

Tableau 3: Classification des caspases.

Il y a 7 caspases responsables de l'apoptose qui sont divisées en deux groupes :

- les caspases initiatrices (2, 8, 9 et 10), qui possèdent une région N-terminale longue ;
- 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 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 de 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. La 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 tétramères suite à l'association de deux hétérodimères, qui contiennent chacun deux sites catalytiques indépendants (Wilson et coll., 1994). L'activation des pro-caspases se déroule en deux étapes au niveau de sites consensus, toujours après la liaison Asp-X (Amarante-Mendes et Green, 1999) (Figure 7).

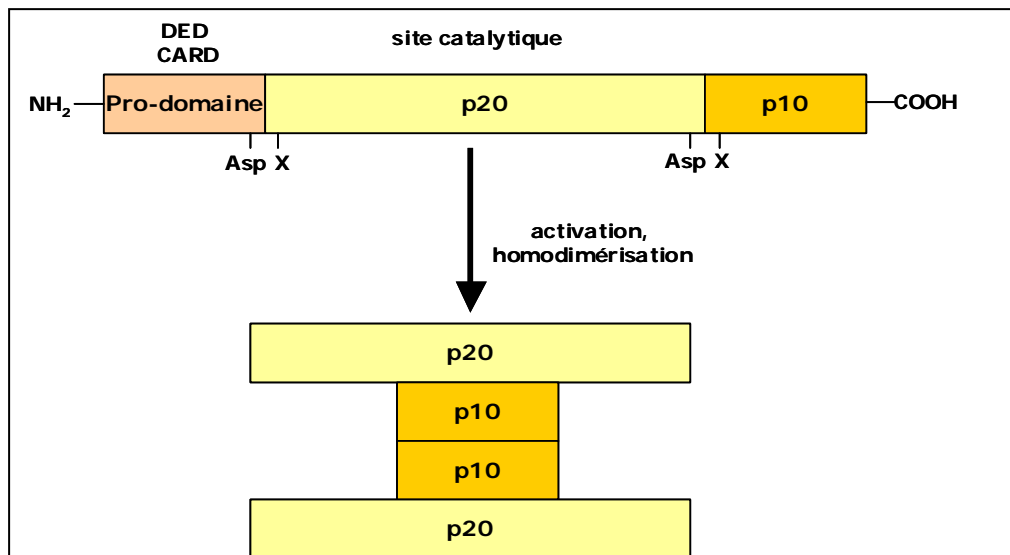


Figure 7 : Schéma de l'activation des caspases.

L'activation des caspases initiatrices peut être achevée par la formation de complexes polyprotéiniques, tels que l'inflammasome (Martinon et Tschopp, 2004), le piddosome (Tinel et Tschopp, 2004) le DISC (Death-Inducing Signaling Complex) (Krammer, 2000) et l'apoptosome (Jiang et Wang, 2004) :

-L'inflammasome participe dans le processus inflammatoire et active soit la caspase-1 nécessaire à la sécrétion de l'interleukine mature IL-1 β soit les caspases -4 et -5. Son rôle dans l'apoptose n'est pas très bien élucidé ;

-Le piddosome catalyse la maturation de la pro-caspase-2 en réponse aux dommages à l'ADN ;

-Le DISC est formé suite à l'activation du récepteur CD95/Fas et stimule ainsi la maturation de la pro-caspase-8. Le DISC participe à la voie extrinsèque de l'apoptose qui est contrôlée par des récepteurs de la surface membranaire ;

-L'apoptosome se forme au cours de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Suite à la perturbation mitochondriale, le cytochrome *c* (cyt *c*) est libéré dans le cytosol et en association avec le facteur Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) forme l'apoptosome, qui favorise la maturation de la pro-caspase-9.

L'activation massive des caspases est souvent nécessaire dans l'activation de l'apoptose et le circuit d'une telle machinerie est très complexe. Souvent, l'activation des caspases initiatrices -2 -9 ou -8 n'est pas suffisante pour aboutir à l'apoptose, ce qui nécessite une amplification de la réaction par la perméabilisation mitochondriale ainsi que l'implication d'autres organites (Danial et Korsmeyer, 2004; Enoksson et coll., 2004).

2.3 Les substrats des caspases

Des études menées par Thornberry et coll. (2000), ont défini des groupes de caspases selon la spécificité du substrat. Ces chercheurs ont utilisé des tétrapeptides de synthèse avec différentes combinaisons d'acides aminés. Les résidus présents en position P4-P2 influent sur la spécificité de la caspase. Les caspases -2, -3 et -7 ont une affinité pour l'aspartate en position P4. Les caspases -8, -9 et -10 préfèrent les acides aminés en position P4 qui possèdent une chaîne aliphatique. Ces résultats ne sont pas exhaustifs car d'autres études ont apporté des éléments supplémentaires sur le type et la taille de la séquence des acides aminés (Talanian et coll., 1997). Il est possible, que les similarités entre les séquences des tétrapeptides de synthèse et les séquences peptidiques, qui associent les sous unités dans certaines caspases (ex. -2, -8, -9), reflètent la capacité de ces caspases à s'autocliner (Thornberry et coll., 1997). Les peptides de synthèse sont largement étudiés et ils permettent également de synthétiser des inhibiteurs spécifiques pour affiner des études *in vitro*. En ce qui concerne les substrats naturels, il s'agit de protéines de grande taille et l'affinité d'une caspase pour son substrat peut être déterminée aussi bien par la séquence des acides aminés que par la structure de la protéine.

Un grand nombre de substrats naturels sont définis et le clivage protéolytique par les caspases dépend du contexte et de l'état cellulaire. Au cours de l'apoptose, les caspases inactivent au moins deux protéines nécessaires pour l'intégrité du génome, la PARP (Poly-(ribo-Adénine)-polymérase) et la DNA-PK (DNA-dependent Protein Kinase). En même temps, elles activent d'autres pro-caspases ou endonucléases responsables de la fragmentation d'ADN tel que le ICAD/DFF45 (Inhibitor Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor). Les caspases interviennent de manière générale dans : l'élimination des cellules lors des processus de la réparation ou leur maintien lorsque ceci est possible, l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, l'inactivation des inhibiteurs d'apoptose, l'initiation des modifications structurales et morphologiques qui marquent la mort cellulaire (Nicholson, 1999).

2.4 Régulation des caspases

La régulation de l'activité des caspases fait intervenir des phosphorylations, l'acide nitrique, des protéines inhibitrices à domaines CARD et DED, les protéines IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Deveraux et coll., 1998) :

-Les phosphorylations : de nombreuses études ont démontré que la régulation de la caspase-9 fait intervenir le processus de phosphorylation. Les protéines PKB-Akt (Protein Kinase B) et ERK2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 2) sont impliquées dans la phosphorylation de la caspase-9 qui a pour conséquence l'inhibition du processus protéolytique de la pro-caspase-9 et donc la diminution de son activité (Johnson et Jarvis, 2004) ;

-La nitrosylation : il a été démontré que le taux d'oxyde nitrique (NO) présent dans la cellule, le type cellulaire ainsi que l'état d'oxydo-réduction cellulaire, peuvent réguler l'activité des caspases. L'interaction du NO avec les groupements thiols des protéines conduit à la S-nitrosylation. Lorsqu'elle a lieu au niveau du site catalytique des caspases, l'apoptose peut être inhibée. La caspase-3 possède une cystéine au niveau de son site catalytique, constituant ainsi une cible potentielle pour NO (Kim et coll. 1997, 2002) ;

-Protéines inhibitrices à domaine CARD ou DED : il s'agit de molécules qui miment les caspases par leur domaine CARD ou DED. Elles sont catalytiquement inactives, mais en empêchant le recrutement et l'oligomérisation des caspases, elles inhibent l'apoptose. La protéine cellulaire c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) possède un domaine DED. Elle empêche le recrutement de la pro-caspase-8 et bloque ainsi l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque (Kataoka, 2005) ;

-Protéines IAP : la famille des protéines IAP est un ensemble de facteurs dont la séquence peptidique est hautement conservée. Ils participent aussi bien dans la régulation des deux voies apoptotiques, que dans le cycle et la signalisation cellulaires. Les protéines IAP identifiées chez l'homme sont : XIAP (X-chromosome linked IAP), cIAP1 et 2 (cellular IAP), NAIP (Neuronal IAP), livine et survivine. Excepté la NIAP, les autres IAP sont très bien étudiées. Les XIAP, cIAP1 et cIAP2 contiennent trois copies en tandem d'un motif de 70 acides aminés nommé BIR (Baculovirus IAP domain), ainsi qu'un doigt de zinc. Les cIAP1 et cIAP2 contiennent en plus, un site CARD. L'activité des protéines IAP dépend du domaine BIR. Le BIR2 fixe et inhibe l'activité des caspases -3 et -7, alors que le BIR3 est un segment inhibiteur de la caspase-9. Le domaine BIR1 n'a pas un potentiel inhibiteur. La survivine contient une seule copie du domaine BIR, structuralement similaire au BIR3 de la XIAP. Il est donc admis que cette protéine fixe et inhibe la caspase-9. L'activité de la survivine ne se limite pas aux caspases, mais elle est étroitement liée au cycle cellulaire et elle bloque également d'autres facteurs qui interviennent notamment dans la fragmentation de l'ADN (Wrzesien-Kus, 2004).

2.5 Voie mitochondriale ou intrinsèque de l'apoptose

L'importance du rôle de la mitochondrie dans l'activation de l'apoptose est largement étudiée et décrite (Green and Kroemer, 2004; Kim et coll., 2005; Dejean et coll., 2006). Les *stimuli* extracellulaires ou intracellulaires tels que l'hypoxie, les produits du stress oxydatif, les radiations gamma ou UV, l'absence de facteurs de croissance, les molécules cytotoxiques etc., peuvent enclencher une perturbation de la membrane mitochondriale qui conduit à la fragmentation de l'ADN soit par le biais des caspases soit indépendamment de celles-ci (Kim et coll, 2006c; Mohamad et coll., 2005).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale permet la libération dans le cytosol des molécules pro-apoptotiques, qui se localisent normalement dans l'espace intermembranaire mitochondrial : le cyt *c*, le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et la protéine Smac-DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor Apoptosis (IAP)-Binding protein LOw Pi) (Acehan et coll., 2002; Schefer et Kornbluth, 2006). Au cours de l'activation de cette voie, il y a formation de l'apoptosome constitué du cyt *c*, du facteur Apaf-1 et de la pro-caspase-9. En présence du dATP, le cyt *c* cytosolique se fixe sur l'Apaf-1 et initialise ainsi, la multimérisation de ce dernier.

Suite à des changements conformationnels, il y a exposition du domaine CARD dans la partie N-terminale de l'Apaf-1, ce qui permet des interactions avec d'autres sites CARD, notamment celui présent dans la pro-caspase-9. Il y a formation ainsi d'un complexe heptamérique, l'apoptosome. Il est constitué d'un corps principal formé de 7 molécules de la caspase-9 entourés par 7 complexes cyt *c*/Apaf-1 (Figure 8).

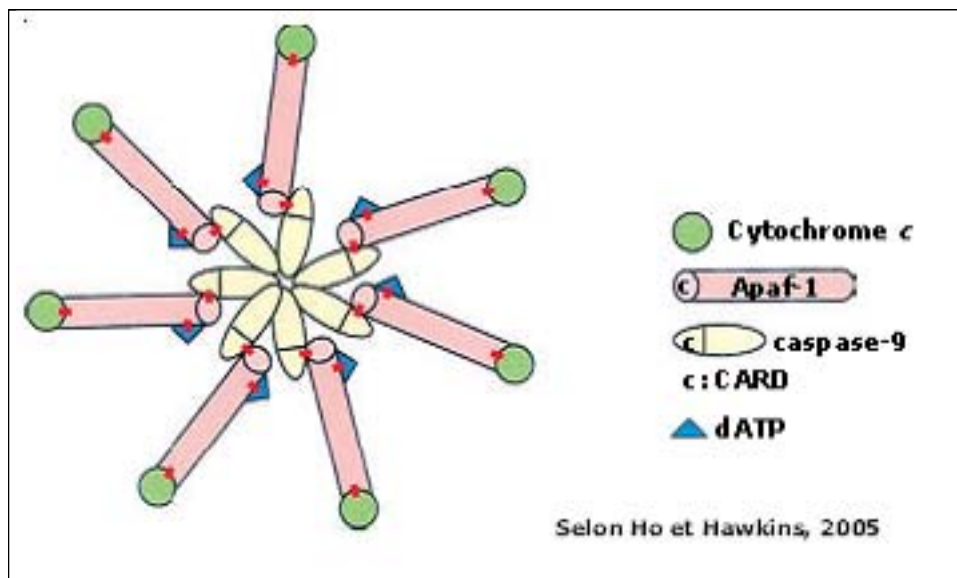


Figure 8 : Assemblage de l'apoptosome.

Il est possible que la formation d'un tel complexe ait pour fonction d'induire des changements conformationnels de la caspase-9 pour favoriser l'activation de la pro-caspase-3 (Rodriguez et Lazebnik, 1999). Même en présence de mutations au niveau de la séquence peptidique de la caspase-9, celle-ci active la pro-caspase-3 (Stennicke et coll., 1999).

2.6 Voie des récepteurs extracellulaires ou voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque nécessite l'activation des récepteurs extracellulaires tels que les récepteurs Fas/CD95, TNF α et TRAIL (Schmitz et coll., 2000) par des ligands spécifiques. La fixation du ligand conduit à l'oligomérisation du complexe ligand/récepteur et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Des caspases initiateuses telles que les pro-caspases -8 ou -10, s'associent au complexe récepteur/ligand par le biais des molécules adaptatrices et ils forment ainsi le complexe DISC. La pro-caspase engagée est activée par protéolyse. La caspase initiateuse mature active à son tour les caspases effectrices -3 ou -7.

Les deux voies semblaient au départ fonctionner de manière indépendante. Pourtant dans certains cas de figure, il existe une liaison entre elles, à travers les protéines de la famille Bcl-2. En effet, la caspase-8 intervient également dans le clivage protéolytique de la protéine pro-apoptotique Bid, membre de la famille des protéines Bcl-2. La protéine Bid migre alors vers la mitochondrie et provoque la libération du cyt *c* dans le cytoplasme, ce qui pourrait avoir pour conséquence l'activation de la caspase-9 (Li et coll., 1998; Antonsson, 2004) (Figure 9).

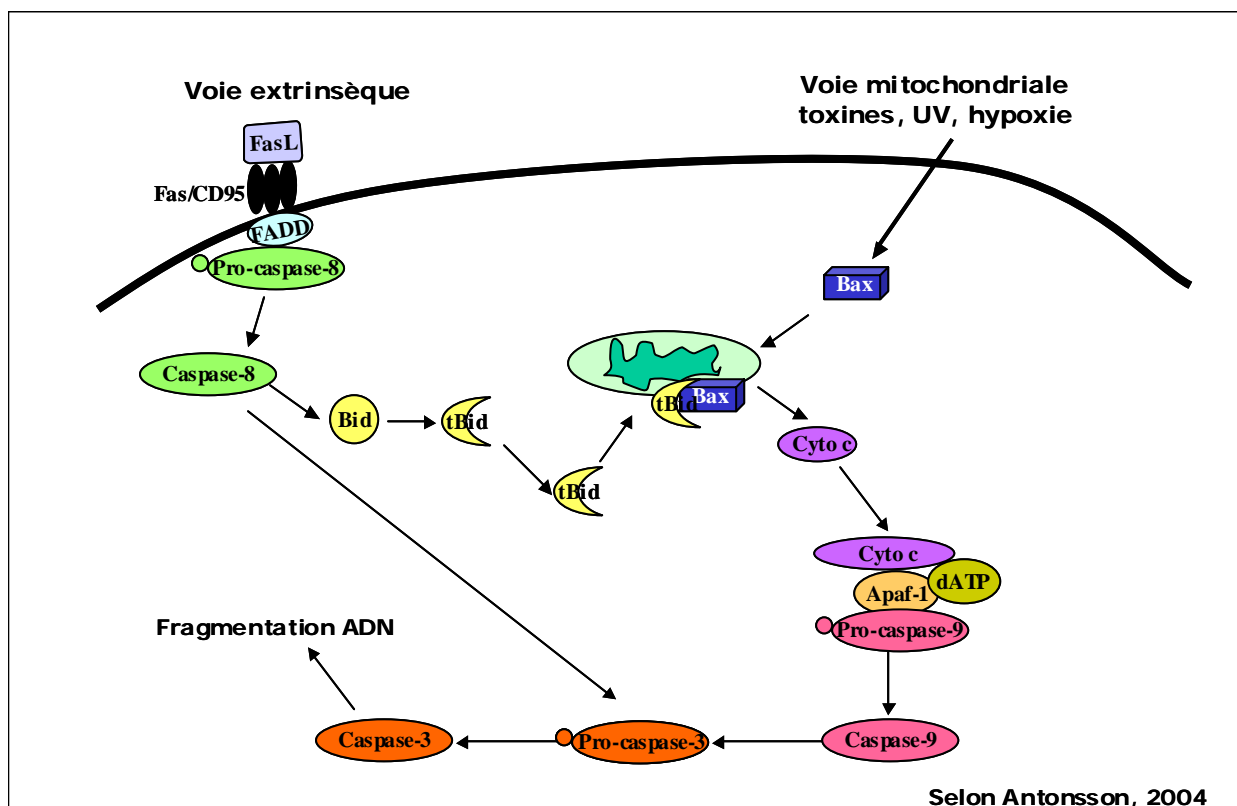


Figure 9 : Les deux voies principales de l'apoptose.

2.7 Fragmentation de l'ADN

L'apoptose est marquée morphologiquement par la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, associées à la formation de corps apoptotiques (Kroemer et Martin, 2005). L'ADN nucléaire est clivé dans un premier temps, au niveau des sites riches en A/T en générant des fragments de l'ordre de 50 à 300 pb. Ces fragments sont, par la suite digérés au niveau de régions internucléosomiales libérant des fragments d'ADN de l'ordre de 200 pb (Wyllie et coll., 1984). La fragmentation de l'ADN génomique est une étape tardive de l'apoptose et peut avoir lieu lors d'un processus apoptotique soit sous la dépendance de caspases soit indépendamment de celles-ci :

- Fragmentation de l'ADN dépendante des caspases :

La caspase-3 active une endonucléase nommée CAD (Caspase-Activated DNase). Dans les cellules non apoptotiques, la protéine CAD est associée à son inhibiteur, la protéine ICAD (Inhibitor of CAD). Les deux forment un complexe cytoplasmique, le facteur DFF (DNA Fragmentation Factor). Au cours de l'apoptose, les caspases-3 ou -7 clivent le complexe qui libère ainsi la protéine CAD. Grâce à sa séquence de localisation nucléaire (NLS), elle migre dans le noyau et clive l'ADN chromosomique. Chez l'homme le facteur DFF est composé d'une sous unité de 45 kDa (DFF45) et d'une sous unité de 40 kDa (DFF40) (Sakahira et coll., 1998; Degen et coll., 2000). La caspase-3 active également le facteur ACINUS (Apoptotic Chromatin Condensation Inducer in the nucleUS) qui agit sur la condensation de l'ADN. Enfin, les caspases clivent HELICARD qui est une hélicase cytosolique contenant un site CARD. Ce clivage permet la libération de l'hélicase sans le domaine CARD (Saelens et coll., 2004).

-Fragmentation de l'ADN indépendante des caspases :

Il existe des facteurs qui agissent indépendamment des caspases, et qui interviennent dans la fragmentation de l'ADN. Dans certains cas, l'inhibition des caspases ne suffit pas à empêcher la fragmentation de l'ADN (Lorenzo et coll., 1999). La mitochondrie libère des facteurs dont la fonction est indépendante des caspases. Le facteur AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Endo G) sont des protéines mitochondriales qui agissent indépendamment de l'activation des caspases. Le facteur AIF (67 kDa) est localisé au niveau de l'espace intermitochondrial, il est libéré en réponse à des *stimuli* apoptotiques et il migre vers le noyau où il termine sa maturation. Il a été suggéré que l'AIF se fixe à l'ADN, déplace les protéines qui lui sont associées, et recrute ou active des endonucléases, et initie ainsi la fragmentation de l'ADN de large échelle (50 Kb) (Ye et coll., 2002).

L'Endo G (35 kDa) est également localisée dans l'espace intermembranaire. Elle migre également vers le noyau et induit la fragmentation de l'ADN (Cregan et coll., 2004). Il semblerait que l'Endo G coopère avec des exonucléases et la DNase I afin de générer des fragments d'ADN internucléosomiaux. Chez *C. elegans*, l'analogue de l'Endo G interagit avec l'analogue du facteur AIF (Saelens et coll., 2004). En revanche, les interactions entre ces deux facteurs et leurs cibles exactes chez les cellules de mammifères, ne sont pas déterminées.

2.8 Perméabilisation de la membrane mitochondriale

La mitochondrie dans son fonctionnement normal possède un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) au niveau de sa membrane interne. Ce gradient est créé suite à l'efflux des ions H^+ à partir de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. La différence de concentration des protons installe un déséquilibre ionique, ce qui résulte dans la formation d'un gradient de pH et de voltage à travers la membrane mitochondriale. La mitochondrie génère l'énergie sous forme d'ATP grâce au processus de phosphorylation oxydative qui a lieu au niveau de la membrane interne. Lors de cette phosphorylation, des électrons sont générés à partir du NADH et sont transférés à l'oxygène moléculaire par une série de quatre complexes enzymatiques situés dans la membrane interne: NADH déshydrogénase (I), succinate déshydrogénase (II), cytochrome *c* réductase (III) et cytochrome *c* oxydase (IV). Les protons H^+ sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce à l'énergie qui est produite par le transfert d'électrons entre les complexes.

L'existence du $\Delta\Psi_m$ autorise une diffusion spontanée de H^+ vers la matrice par le canal ATP synthase-complexe V. Ce flux de protons est utilisé par le complexe V pour fabriquer de l'ATP, qui est exporté en échange de l'ADP (Figure 10).

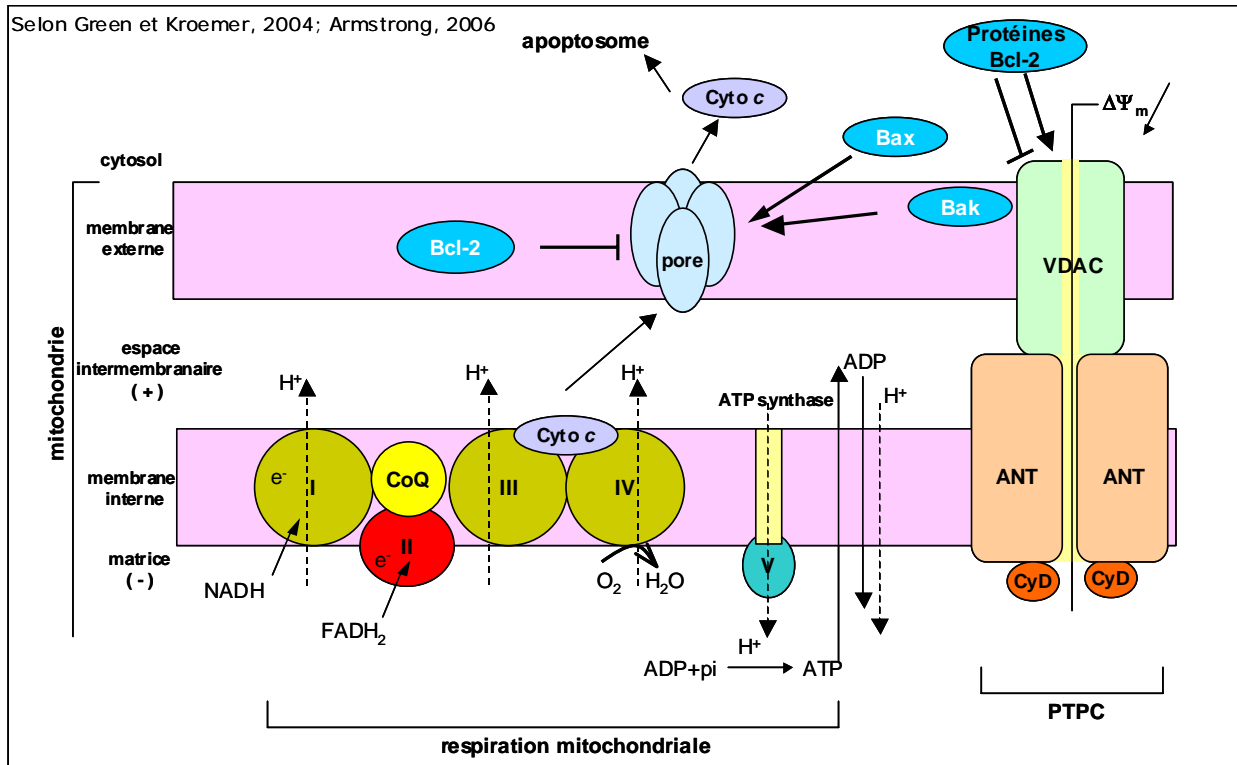


Figure 10 : Chaîne respiratoire et perméabilisation mitochondriale.

La perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilization) a lieu au cours de l'apoptose, et elle est responsable de la libération de facteurs qui résident initialement dans l'espace intermembranaire, situé entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie (cyt *c*, AIF, Endo G etc.) (Green et Kroemer, 2004). Avant, pendant et après la perméabilisation, il y a dissipation du potentiel $\Delta\Psi_m$. De manière générale, deux mécanismes sont décrits. L'un qui contrôle la perméabilisation de la membrane externe et l'autre qui contrôle la perméabilisation de la membrane interne (Armstrong, 2006).

La perméabilisation de la membrane externe ou MOMP (Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization) est gouvernée par les protéines de la famille Bcl-2 décrites plus loin. La MOMP est caractérisée par l'ouverture du canal VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) et/ou par des pores qui sont formés par les protéines de la famille Bcl-2. La perméabilisation de la membrane interne ou MIMP (Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization) est régulée par un ensemble de facteurs, qui contrôlent la transition de la perméabilité mitochondriale (MPT : Mitochondrial Permeability Transition). Ce processus est caractérisé par l'ouverture de pores formés par un complexe protéique contenant le translocateur nucléotidique ANT (Adenine Nucleotide Translocator) et la cyclophiline D (CyD). Ces pores sont également appelés PTP (Permeability Transition Pore). L'ouverture de ces pores interfère avec le transport d'électrons de la chaîne respiratoire, ainsi que la production de l'ATP. Elle provoque le gonflement de la mitochondrie suite à la redistribution des molécules d'eau et des ions entre le cytosol et la matrice mitochondriale. La perte du potentiel mitochondrial est souvent associée à l'ouverture irréversible des pores mais, d'autres événements peuvent également en être la cause. La MIMP peut ainsi précéder la MOMP et *vice versa*.

Le contact entre le MOMP et le MIMP donne naissance à un complexe polyprotéique qui contrôle la transition de la perméabilité mitochondriale, connu sous le nom PTPC (Permeability Transition Pore Complex) (Figure 10). Les facteurs qui participent à la formation du PTPC sont le VDAC et le récepteur benzodiazépine situés dans la membrane externe, l'héxokinase II qui est associée au VDAC dans la partie cytosolique, la créatine kinase qui est localisée dans l'espace intermembranaire, l'ANT localisée dans la membrane interne, la CyD située dans la matrice et les protéines de la famille Bcl-2. Le VDAC est normalement perméable à des molécules de taille de l'ordre de 5 kDa, et son association avec les pores de la membrane interne, permet l'échange des substrats de la chaîne respiratoire tels que le NADH, FADH et ATP/ADP. En revanche, la membrane interne est normalement imperméable, fonction essentielle pour l'établissement du gradient électrochimique $\Delta\Psi_m$. L'ouverture du PTPC a pour conséquence l'interférence avec la chaîne respiratoire et le passage de molécules d'eau ou de molécules de large poids moléculaire supérieur à ~1,5 kDa. Des ligands spécifiques comme la cyclosporine A (CsA) et ses dérivés ou les membres anti-apoptotiques de la famille des protéines Bcl-2 peuvent inhiber la perméabilisation mitochondriale (Zamzami et Kroemer, 2001).

2.9 Les protéines de la famille Bcl-2

Le processus de l'apoptose est contrôlé par un groupe de protéines hautement conservées au cours de l'évolution, les protéines de la famille Bcl-2. Le gène de la protéine Bcl-2, a été le premier identifié en tant que proto-oncogène dans les lymphocytes B. Au sein du lymphome, les cellules B sont résistantes grâce à la surexpression de la protéine Bcl-2 (Tsujimoto et coll., 1985). Cette famille de protéines est composée de plus d'une vingtaine de composants, avec une faible homologie entre leurs séquences totales en aminoacides. En revanche, elles présentent des fortes homologies entre des régions précises. Il s'agit de régions appelées domaines BH (Bcl-2 Homology) et elles sont essentielles pour les interactions entre protéines (Yin et coll., 1994).

La famille des protéines Bcl-2 est divisée en deux groupes : les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques présentent les 4 régions BH, sont localisées au niveau de la mitochondrie et stabilisent les membranes. Au sein du groupe pro-apoptotique, il y a deux sous groupes séparés en fonction du nombre des domaines BH présents. Il y a ainsi les protéines à plusieurs domaines BH ("multidomains") et les protéines qui contiennent uniquement le domaine BH3 (BH3-only). L'ensemble des protéines de la famille Bcl-2 est illustré par la Figure 11.

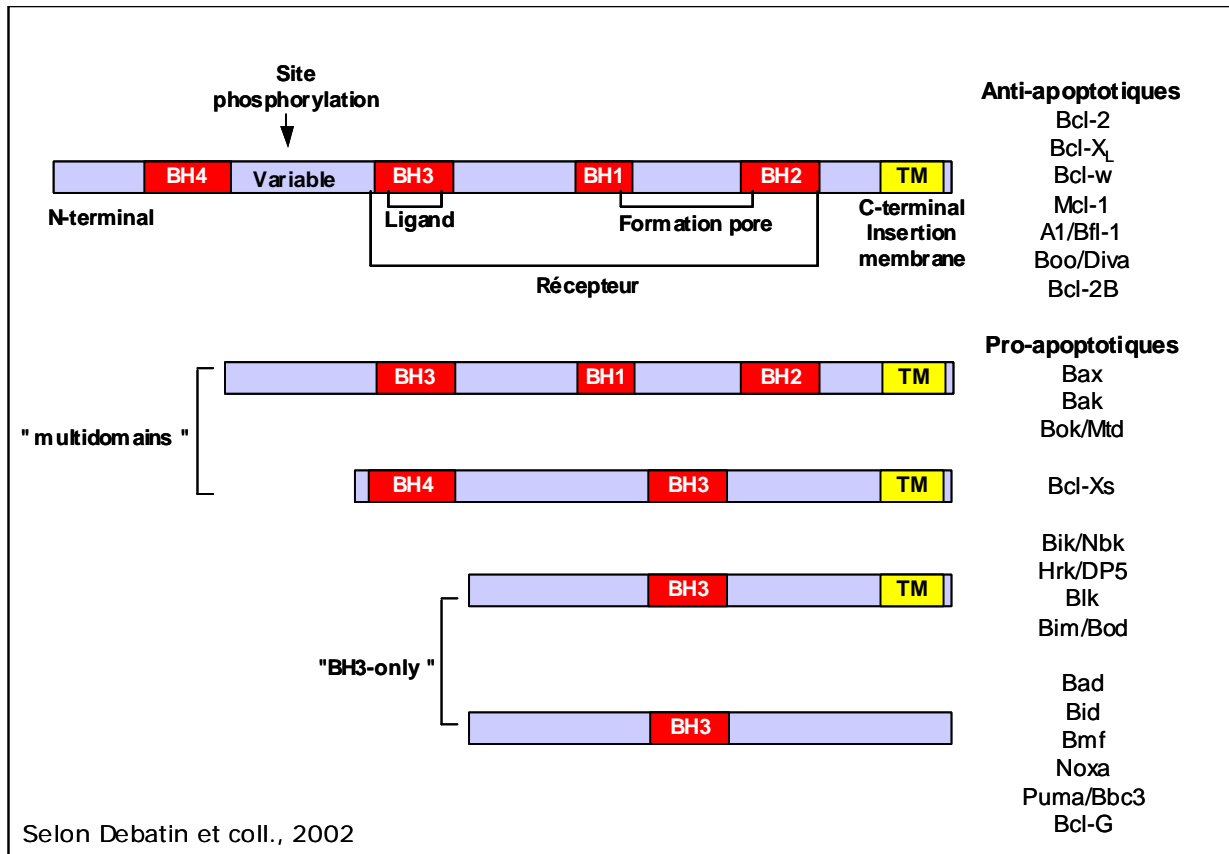


Figure 11 : Les protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » interviennent dans l'induction de l'apoptose par activation de protéines pro-apoptotiques à plusieurs domaines ou par séquestration des protéines anti-apoptotiques. Elles interviennent dans la voie extrinsèque de l'apoptose et elles peuvent mettre en relation la voie extrinsèque et la voie intrinsèque (Kim et coll., 2006a). Les autres membres forment *in vitro* des canaux à travers les biomembranes, ce qui laisse supposer une fonction dans la formation de pores (Antonsson et coll., 1997). Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle très important dans le contrôle de l'apoptose. La surexpression ou la perte de fonction de certaines protéines anti-apoptotiques et pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 déterminent la survie ou la mort cellulaire (Garrido et coll., 2003).

a. Protéines de la famille Bcl-2 et perméabilisation mitochondriale

Une des propriétés des protéines de la famille Bcl-2 est la régulation de la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie et le contrôle de la libération des facteurs pro-apoptotiques séquestrés dans l'espace intermembranaire. La protéine Bcl-2 et ses homologues anti-apoptotiques, les protéines Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1, résident au niveau de la membrane externe et stabilisent la barrière et le fonctionnement mitochondriaux. Elles empêchent la MOMP et bloquent la libération de facteurs pro-apoptotiques.

Les protéines Bax et Bak, induisent la perméabilisation mitochondriale et favorisent la libération de facteurs pro-apoptotiques. La protéine Bax réside principalement dans le cytosol et reste sous sa forme inactive en association avec d'autres facteurs. En présence de divers *stimuli* pro-apoptotiques, elle subit des changements conformationnels, qui permettent son insertion dans la membrane mitochondriale pour former un pore ou canal au niveau de la membrane externe de la mitochondrie indépendamment du VDAC (Antonsson et coll., 2001). La protéine Bak, quant à elle, est attachée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie en association avec le VDAC (Cheng et coll., 2003). Lorsque la cellule reçoit le signal pro-apoptotique, la protéine subit également des changements conformationnels, qui conduisent à son oligomérisation et à la formation d'un pore à travers la membrane mitochondriale (Korsmeyer et coll., 2000).

En ce qui concerne la localisation des protéines Bcl-2 et Bax, il existe des études qui ont démontré leur localisation au niveau de la membrane interne. Il est possible que sous certaines conditions d'activation de l'apoptose, la protéine Bax migre de la membrane externe vers la membrane interne (Marzo et coll., 1998) et la protéine Bcl-2 suit le trajet inverse (Gotow et coll., 2000). Pourtant, les mécanismes de tels mouvements restent inconnus. Enfin, les protéines Bcl-2 et Bax peuvent interagir avec les composants ANT et VDAC. La protéine Bax coopère avec le VDAC ou l'ANT pour former des pores de taille et de conductivité plus importantes alors que la protéine Bcl-2 en interaction avec le VDAC ou l'ANT, inhibe la formation des canaux ioniques (Zamzami et Kroemer, 2001).

Les protéines Bim et Bid activent l'oligomérisation et favorisent l'ancrage des protéines Bax et Bak sur la membrane mitochondriale (Eskes et coll., 2000). Les protéines Bad et Bik peuvent aussi se fixer sur la protéine anti-apoptotique Bcl-2 en déplaçant la protéine Bid qui lui est associée, en favorisant ainsi l'action de cette dernière sur la protéine Bax pour l'initiation de la perméabilisation (Armstrong, 2006). Il existe deux propriétés biochimiques majeures des protéines de la famille Bcl-2 : 1) elles ont la capacité de former des hétérodimères avec les protéines de la même famille possédant le domaine BH3 et 2) elles ont le potentiel de former des canaux ioniques à travers la membrane mitochondriale (Tjujimoto, 2003).

Les domaines BH des protéines de la famille Bcl-2 sont responsables de la régulation de la perméabilisation mitochondriale. A titre d'exemple, parmi les quatre domaines BH que la protéine Bcl-2 possède (BH1-BH4), seul le domaine BH4 est recruté pour la fonction anti-apoptotique ((Daniel et coll., 2003), alors que ceci n'est pas valable pour les protéines Bax et Bak (BH1-BH3) qui ne possèdent pas ce domaine. Les autres membres de la famille des protéines Bcl-2, qui contiennent uniquement le domaine BH3, sont considérés en tant qu'activateurs des protéines Bax et Bak (Armstrong, 2006).

3. Le stress oxydatif

Dans la famille des produits du stress oxydatif nous citons le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Ils sont encore appelés Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) ou Reactive Oxygen Species (ROS), car ils sont plus réactifs que l'oxygène. Les produits du stress oxydatif ont été considérés initialement en tant que produits toxiques du métabolisme cellulaire, pouvant altérer des constituants cellulaires. Pour se protéger de ces effets délétères, la cellule a développé un système antioxydant composé de plusieurs enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD), qui réduit l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , la catalase et la glutathion peroxydase qui réduit le H_2O_2 en H_2O . Il existe également des molécules antioxydantes non enzymatiques comme les vitamines A, C et E, les caroténoïdes, les thiols dont le glutathion, l'ubiquinone, la thiorédoxine, etc. (Valko et coll., 2006).

Le stress oxydatif intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS et la capacité antioxydante de la cellule à empêcher les lésions oxydatives. Chez les cellules des mammifères les sources de production sont principalement d'origine enzymatique. Il s'agit de la NAD(P)H oxydase membranaire et du complexe enzymatique III de la chaîne respiratoire au niveau de la mitochondrie (Figure 10). D'autres sources au niveau du cytosol ou présentes au sein des organites cellulaires, jouent également un rôle dans la modulation de la signalisation cellulaire. Une surproduction des ROS et/ou un dysfonctionnement du système antioxydant sont souvent impliqués dans les mécanismes physiopathologiques de certaines maladies (athérosclérose, maladies neurodégénératives, cancers...). Pourtant les ROS sont également des acteurs importants de la signalisation cellulaire et de la régulation des métabolismes. Ce paradoxe apparent peut être dépendant du type cellulaire, de la source productrice ainsi que de la dose des ROS (Delattre et coll., 2005). Les cellules cancéreuses peuvent produire de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène (Szatrowski et Nathan, 1991). Certains tissus du cancer du côlon produisent des ROS en excès (Keshavarian et coll., 1992). Cet excès dans les cellules tumorales pourrait maintenir la prolifération anormale à des taux élevés grâce à l'augmentation des mutations que pourrait subir l'ADN (Kang, 2002).

Même si les ROS favorisent la cancérogenèse, certains cas de figure montrent qu'ils peuvent contribuer à l'amplification des signaux de mort. En effet, les ROS peuvent faciliter la perturbation de la membrane mitochondriale et favoriser ainsi l'ouverture des canaux (Kim et coll., 2006b). La protéine anti-apoptotique Bcl-2, renforce la résistance des cellules au stress oxydatif étant donné que son rôle se résume au maintien de la fermeture des pores mitochondriaux (Armstrong, 2006). Ainsi, l'utilisation des antioxydants pourrait parfois s'avérer anti-apoptotique.

4. Les lysosomes

Dans les cellules eucaryotes, il existe des organites de forme et de taille variables. Il s'agit des lysosomes qui sont des vésicules contenant des enzymes nécessaires pour la digestion des macromolécules cellulaires. Les lysosomes se forment au niveau de l'appareil de Golgi et migrent vers la membrane plasmique. Ils contiennent des hydrolases cataboliques et participent aussi bien dans des processus de dégradation du matériel organique, dans l'induction de la mort cellulaire que dans l'invasion des cellules cancéreuses (Kondo et coll., 2005; Kroemer et Jäättelä, 2005; Tardy et coll., 2006).

Il existe deux processus de dégradation : l'hétérophagie et l'autophagie. L'hétérophagie concerne la digestion de molécules, de substances et/ou de pathogènes acheminés de l'extérieur vers le cytoplasme en assurant ainsi le bon fonctionnement cellulaire. L'autophagie concerne la digestion des composants cellulaires, en participant ainsi au renouvellement des macromolécules et des organelles. Elle démarre lorsque des composants cellulaires, destinés à être dégradés, sont renfermés dans des vacuoles limitées par une double membrane. Il s'agit des vacuoles d'autophagie. Ces vacuoles fusionnent avec les lysosomes pour générer les autolysosomes dans lesquels les hydrolases digèrent le contenu luminaire (Klionsky et Emr, 2000).

Les lysosomes peuvent participer dans l'induction de l'apoptose suite à la perméabilisation de leurs membranes. En effet, plusieurs stimuli et/ou agents lysosomotropiques induisent la perméabilisation de la membrane lysosomiale (LMP : Lysosomal-Membrane Permeabilization) en libérant ainsi des hydrolases, telles que les cathepsines capables d'initier l'apoptose dépendante ou indépendante de la voie des caspases. Lorsque la LMP est très importante, les cellules meurent par nécrose. (Guicciardi et coll., 2004; Jäättelä et coll., 2004). La LMP peut être à l'origine de la perméabilisation mitochondriale mais aussi à l'issue de celle-ci. A titre d'exemple, le peroxyde d'hydrogène issu de la mitochondrie, peut réagir avec des molécules de fer présentes dans les lysosomes. Au cours de cette réaction, appelée également réaction de Fenton, il y a production de radicaux hydroxyles, qui sont les plus délétères du stress oxydatif et attaquent aussi bien les membranes lysosomiales que les membranes des autres organites cellulaires (Zhao et coll., 2003).

L'invasion tumorale et le processus métastatique sont parfois associés avec la surexpression de certains enzymes lysosomiaux, les cathepsines B, L et D, ainsi que l'altération de leur trafic. Les lysosomes peuvent également fusionner directement avec la membrane plasmique en sécrétant ainsi dans la matrice extracellulaire leurs enzymes. En association avec d'autres facteurs, ces enzymes peuvent digérer la matrice extracellulaire. Ce phénomène est souvent observé dans le cadre de la mobilité et invasion tumorales, ainsi qu'au cours de l'angiogénèse (Joyce et coll., 2004; Joyce et Hanahan, 2004).

MATERIELS ET METHODES

I. ETUDES *IN VITRO*

1. La lignée cellulaire Caco-2

Nous avons utilisé la lignée cellulaire Caco-2 comme modèle *in vitro* des entérocytes. C'est une lignée cellulaire issue d'un adénocarcinome colique humain, isolée dans les années '70 chez un homme de type caucasien de 72 ans. Les cellules présentent une phase exponentielle de croissance et entrent en différenciation spontanée dès qu'elles atteignent la confluence. Durant la phase de différenciation, elles acquièrent des caractéristiques morphologiques et biochimiques identiques à celles des entérocytes *in situ*. D'une part, la différenciation se caractérise par la polarisation cellulaire avec une morphologie cylindrique, apparition de *microvilli* sur la face apicale et de jonctions serrées entre les cellules adjacentes. D'autre part, durant la différenciation il y a l'expression des hydrolases intestinales telles que la saccharase-isomaltase, la lactase, l'aminopeptidase N et la dipeptidylpeptidase IV sur la face apicale des cellules dont l'activité est faible ou absente lors de la phase exponentielle de croissance.

Toutes les expériences sont réalisées au cours de la phase exponentielle de la croissance cellulaire car nous voulions étudier les effets des molécules testées sur la prolifération cellulaire.

2. Culture cellulaire

Les cellules Caco-2 proviennent de l'European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC, Salisbury, UK). Elles sont cultivées dans des flasques Falcon de 75 cm² contenant du milieu d'Eagle Modifié par Dulbecco (DMEM) supplémenté par 25 mM de glucose. Le milieu est complété avec 10% de sérum de cheval dont le complément est inactivé (56°C, 1 h), 100 U/ml pénicilline (1%), 100 µg/ml streptomycine (1%), et 1% acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France). Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% CO₂.

Les cellules sont étalées à 1.10^6 cellules/15 ml de milieu et elles sont cultivées pendant 7 jours ou jusqu'à la confluence. Lorsqu'elles arrivent à confluence, elles sont lavées avec du tampon versène (0,1 M PBS pH 7,2 - 2,6 mM EDTA) et détachées par trypsinisation (0.5% trypsine/2,6 mM EDTA). La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 4 volumes de milieu DMEM enrichi à 20% de sérum-100 U/ml pénicilline (1%), 100 µg/ml streptomycine (1%). Le nombre de cellules est déterminé à l'aide de la cellule de Malassez. Pour la réalisation des expériences, les cellules sont remises en culture dans du DMEM à 3% de sérum, 10 µg/ml d'insuline, 5 µg/ml de transferrine, 5 ng/ml de sélénium, 100 U/ml pénicilline (1%), 100 µg/ml streptomycine (1%) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco, France). Le nombre de passages est limité à 10 car il a été démontré que le nombre de passages peut influencer différentes activités et fonctions cellulaires (Lu et coll., 1996; Briske-Anderson et coll., 1997). Même si la plupart de ces études sont focalisées sur les différences observées au niveau de facteurs impliqués pendant la différenciation, il est évident qu'un grand nombre de passages peut contribuer à l'hétérogénéité et à l'expression de caractéristiques différents par rapport à la culture des cellules Caco-2 initiale (Briske-Anderson et coll., 1997; Walter et Kissel, 1994; Yu et coll., 1997) Tous les 10 passages de nouvelles cellules sont décongelées. Afin d'étudier les mécanismes cellulaires de populations cellulaires relativement identiques, nous avons réalisé les expériences avec des cellules du même lot (P₁₁) et pour le même nombre de passages.

3. Molécules testées

Le 7β-OH sitostérol (C₂₉H₅₁O₂, MM:430,71) et le 7β-OH cholestérol (C₂₇H₄₇O₂, MM:403,65) sont obtenus suite à l'oxydation du β-sitostérol (C₂₉H₅₀O, MM:414,71) et du cholestérol (C₂₇H₄₆O, MM:386,65) (Sigma, Allemagne) selon la méthode Zhang et coll. (2005). Le β-sitostérol est purifié par chromatographie d'adsorption à partir d'une mixture commerciale de phytostérols (fraction non saponifiée de l'huile de Soja). La pureté du β-sitostérol était >95%. Les échantillons purifiés contenaient de traces de campestérol. Les hydroxystérols sont dissous dans de l'éthanol 100% et la concentration finale de l'éthanol dans le milieu de culture ne dépassait pas 0,5% (v/v).

Pour la réalisation des différentes expériences nous avons testés en absence ou en présence des hydroxystérols d'autres molécules chimiques :

-les β-cyclodextrines, 45% (w/v) en H₂O) (Sigma, Allemagne) en tant que véhicule de solubilisation du β-sitostérol ;

-l'inhibiteur de pan-caspases Z.VAD-fmk ((N-CBZ-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone, $C_{22}H_{30}N_3O_7F$, MM: 467,5) (Sigma, Allemagne) pour l'étude du processus apoptotique;

-le MDL 72527 (N^1, N^4 -bis(2,3-butadienyl)-1,4-butanediamine dihydrochloride, MM :210) a été offert par le Pr. Seiler Nikolaus (INSERM-U682, IRCAD) et il a été synthétisé selon le protocole décrit par Bey et coll. (1985). La N^1 -acétyl spermidine a été synthétisée au laboratoire du Dr. André Mann (CNRS-ULP UMR 7081, Faculté de Pharmacie, Lab. de Pharmacochimie Moléculaire, Illkirch, France), la putrescine ($NH_2(CH_2)_4NH_2$, MW : 88,15) la spermidine ($NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2$, MM : 145,25) et le DFMO ((2-(difluorométhyl)ornithine, $C_6H_{12}F_2N_2O_2$ HCl, MM : 218,63) (Sigma, Allemagne) ont été utilisés dans le cadre de l'étude du métabolisme des polyamines ;

-la vitamine C ($C_6H_8O_6$, MM:176,12) et la *N*-acétyl-L-cysteine ($HSCH_2CH(NHCOCH_3)CO_2H$, MM:163,19) (Sigma, Allemagne) ont été utilisées dans les études du stress oxydatif ainsi que de la variation du potentiel mitochondrial.

4. Croissance cellulaire

4.1. Test à la sulforhodamine B

Il s'agit d'une méthode basée sur la coloration de protéines cellulaires par la sulforhodamine B (SRB) (Skehan et coll., 1990). L'absorbance est mesurée à 490 nm et les valeurs obtenues suivent une relation linéaire avec le nombre de cellules (protéines/puits) pour 0 à 200.000 cellules/puits.

Les cellules sontensemencées à 4500 cellules/puits sur des plaques de culture à 96-puits et incubées plusieurs jours en absence ou présence des molécules à tester. Toutes les 24 ou 48 h (en fonction de l'expérience) les cellules sont fixées avec 50% v/v d'acide trichloracétique (TCA) pendant 1 h à 4°C. Après rinçage à l'eau, les protéines cellulaires sont colorées par une solution de SRB (100 μ l/puits, 0,4%, w/v) diluée dans l'acide acétique 1%. Elles sont incubées 30 min à RT, puis rincées plusieurs fois avec de l'acide acétique 1% et reprises dans 200 μ l de Tris-HCl 10 mM, pH 10,5. Après une agitation de 20 min, la lecture de D.O. 490 nm est effectuée au densitomètre.

4.2. Comptage des cellules

Les cellules sontensemencées à 1.10^6 /boite de Pétri de 10 cm² et incubées pour différentes périodes en absence ou présence des molécules à tester. Les cellules sont collectées par trypsinisation (0.5% trypsin/2,6 mM EDTA) et reprises dans un petit volume de PBS 0,1 M pH 7,2. Pour l'estimation de la survie cellulaire, les cellules sont colorées avec une solution de Trypan Blue Dye (1/1, v/v) (Gibco, France) et comptées à l'aide de la cellule de Malassez au microscope optique. Ce colorant marque les cellules mortes en bleu.

5. Cytométrie en flux

5.1. Généralités

La cytométrie en flux consiste à analyser les signaux optiques émis par une cellule coupant le faisceau lumineux d'un laser (Figure 12).

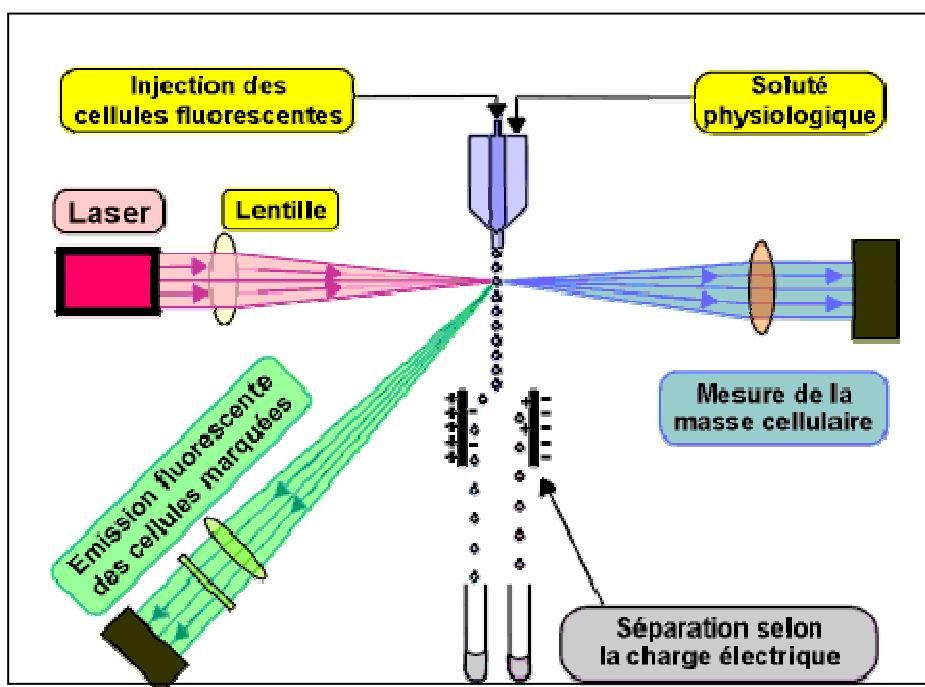


Figure 12 : Cytométrie en flux

Les signaux détectés donnent des informations sur les propriétés physiques intrinsèques des cellules, telles que la taille (FSC-forward scatter) et la granularité (SSC-side scatter) (Figure 13), ainsi que des informations relatives aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou fonctions cellulaires. L'ordinateur analyse les données statistiques et représente sous forme d'histogramme ou de « dot plots » (nuages de points) la population cellulaire dont les propriétés sont évaluées.

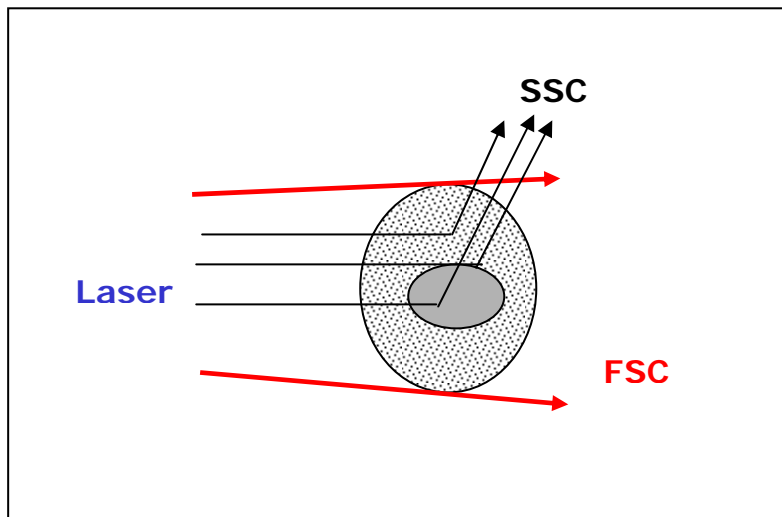


Figure 13 : Mesure de la taille (FSC) et de la granularité (SSC) cellulaire par le cytomètre.

Toutes les expériences sont réalisées à l'aide du cytomètre FACScan avec un laser de longueur d'onde de 488 nm (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) et la fluorescence émise par stimulation du fluorochrome marqueur est analysée par une cellule photoélectrique. Des filtres lumineux et dichroïques permettent l'analyse simultanée de 3 couleurs, en plus de la lumière blanche : FL-1, FL-2, FL-3 (Tableau 4). Les données sont traitées et analysées à l'aide du logiciel CellQuest ou ModFit pour le cycle cellulaire (Becton Dickinson, USA).

Laser	Paramètres	Filtres (nm)	Exemple de Fluorochrome
488nm	FL-1	515/30	FITC
	FL-2	585/42	IP, PE
	FL-3	650	F. Rouge, IP

Tableau 4 : Laser et filtres du cytomètre en flux Becton Dickinson.

5.2 Cycle cellulaire et mesure des particules hypodiploïdes

La cytométrie en flux permet de caractériser la distribution des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, à savoir les phases G_0/G_1 , S, G_2/M en mesurant 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. Lors du processus apoptotique, il y a fragmentation de l'ADN et les cellules apoptotiques contiennent alors une quantité d'ADN inférieure à $2n$. Le cytomètre détecte une fluorescence émise réduite et la population cellulaire s'accumule dans une région inférieure à G_0/G_1 , appelée $subG_0/G_1$ (Figure 14).

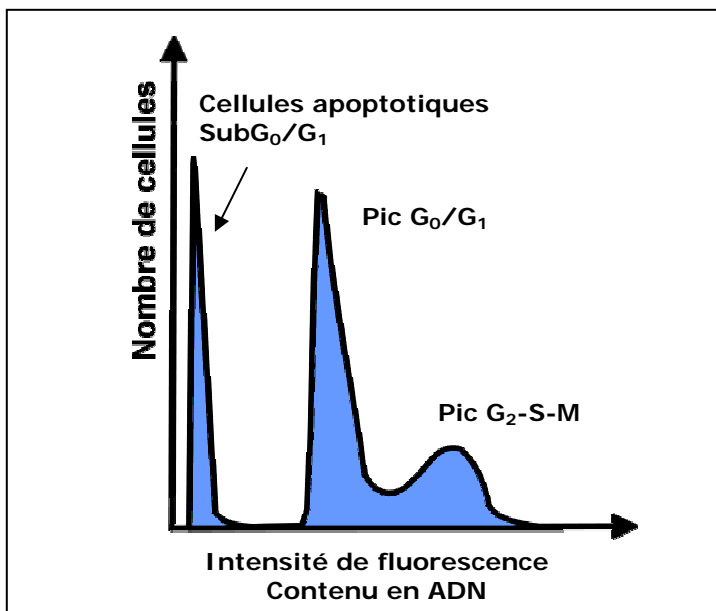


Figure 14 : Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

Pour l'analyse du cycle cellulaire nous avons utilisé l'iodure de propidium (IP) qui est un intercalant de l'ADN. Suite à une excitation à 488nm, la fluorescence émise par l'IP est capturée et les populations cellulaires présentes à une phase donnée sont triées.

La méthode utilisée est basée sur la technique utilisée par Nicoletti et coll. (1991). De $0,5$ à 1.10^6 cellules sontensemencées, traitées avec les molécules d'intérêt, prélevées par trypsination à différents points de temps et centrifugées à 900 g 5 min à 4°C . Après un lavage au PBS $0,1\text{ M}$ $\text{pH } 7,2$ et une centrifugation dans les mêmes conditions, les cellules sont perméabilisées dans 1 ml de PBS : méthanol ($1/9$, v/v) et placées à -20°C pour 30 min minimum. Le méthanol fragilise les membranes cellulaires et facilite le passage de l'IP dans les cellules (Figure 15).

Avant l'analyse au cytomètre, les cellules sont lavées au PBS, centrifugées et le culot est repris dans 200 μl de PBS contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ IP et 250 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (Sigma, Allemagne). Après incubation à l'obscurité et à 37°C pendant 30 min, les cellules sont analysées par cytométrie en flux (canal FL-2). Après exclusion des débris, l'analyse de la fluorescence est réalisée sur 10.000 évènements.

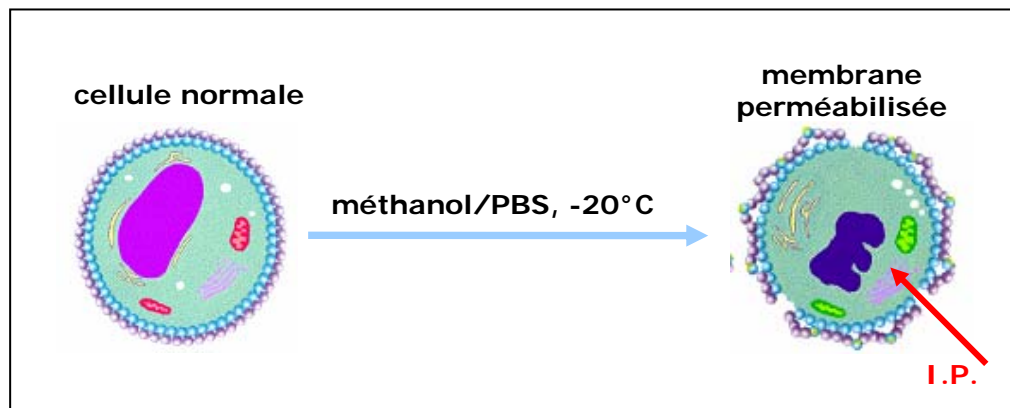


Figure 15 : Perméabilisation de la membrane cellulaire par le méthanol et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (I.P.).

5.3 Marquage à l'Annexine-V /IP : distinction nécrose-apoptose

Le processus apoptotique s'accompagne de modifications morphologiques dont parmi elles, la formation des fragments cytoplasmiques et nucléaires : les corps apoptotiques. Suite à ces remaniements structuraux, il y a exposition des phosphatidylsérines (PS) vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Figure 16).

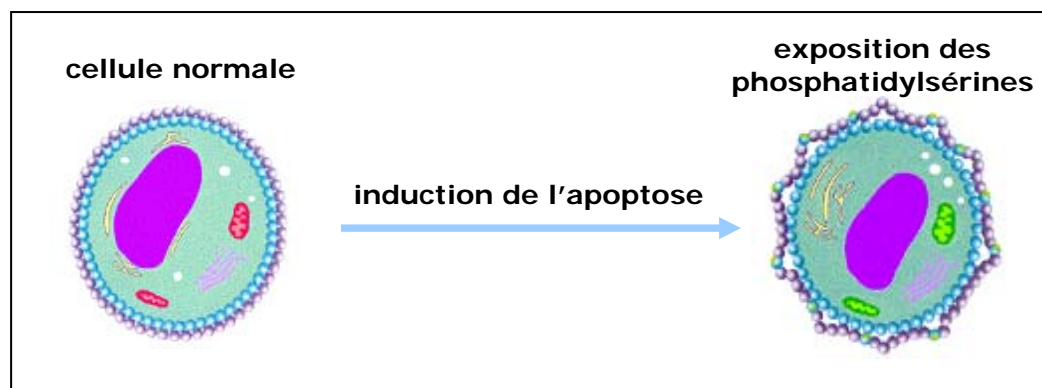


Figure 16 : Externalisation des phosphatidylsérines au cours de l'initiation de l'apoptose.

Ces phospholipides anioniques sont présents dans le feuillet interne de la membrane plasmique, ainsi lors de la formation des corps apoptotiques, ils sont exposés à la face externe par translocation. Il est possible de détecter l'externalisation des PS par marquage des cellules à l'annexine-V couplée à la fluorescéine isothiocyanate-5 (FITC) (Koopman et coll., 1994; Vermes et coll., 1995). L'annexine-V en présence de Ca^{2+} reconnaît et fixe spécifiquement les PS.

L'externalisation des PS est mesurée à l'aide du kit de marquage Annexine-V-FLUOS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne). Les cellules nécrotiques peuvent également exposer les PS suite à la perte de l'intégrité membranaire. Afin de distinguer l'apoptose de la nécrose, nous avons réalisé un marquage en parallèle à l'IP sans perméabilisation au préalable de la membrane cellulaire. De $0,5$ à 1.10^6 cellules sont ensemencées, traitées avec les molécules d'intérêt, prélevées par trypsination à différents points de temps et centrifugées à 900 g, 5 min à 4°C . Elles sont ensuite lavées dans du PBS, centrifugées et pour chaque échantillon, 0.5×10^6 cellules sont reprises dans 100 μl de tampon de réaction (20 μl Annexine-V-FITC, 1 ml tampon de marquage) ou 100 μl de tampon de réaction (20 μl IP, 1 ml tampon de marquage). Après 15 min d'incubation à l'obscurité/ RT, les cellules sont analysées par le cytomètre. Le canal FL-2 (filtre 515 nm) permet la détection de la FITC et le canal FL-3 (filtre >600 nm) l'IP. L'analyse est réalisée sur 10.000 évènements.

5.4. Production du stress oxydatif

Il y a plusieurs méthodes pour mesurer les radicaux libres ou espèces réactives d'oxygène (ERO ou ROS) dans les cellules (Curtin et coll., 2002). L'utilisation en cytométrie en flux des dérivés du diacétate de 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) est une technique efficace dans l'évaluation de l'état d'oxydoréduction de la cellule. Des estérases cellulaires transforment le $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ en 2',7'-dichlorodehydrofluorescéine (H_2DCF) par clivage de groupes d'acétate. L'oxydation de ce dernier en 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) par les peroxydases, le cytochrome *c* ou le Fe^{2+} peut se réaliser en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Tammariello et coll., 2000) (Figure 17).

Selon Curtin et coll., 2002

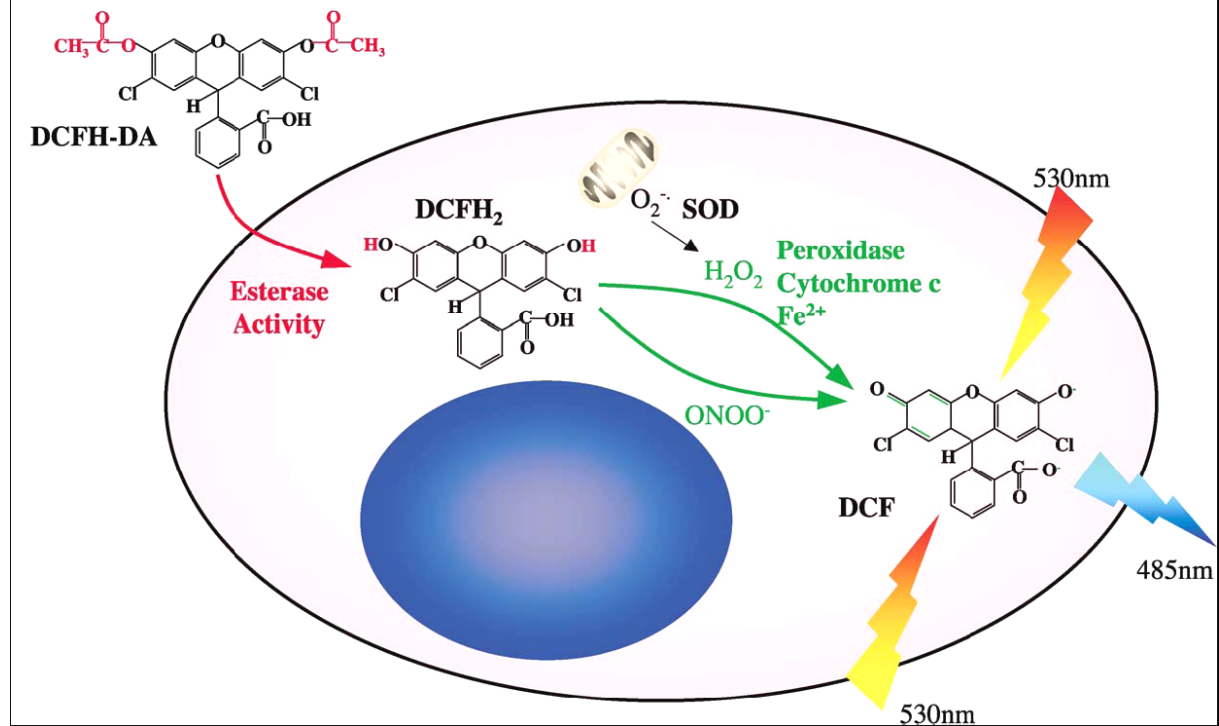


Figure 17 : Mécanisme d'action du 2',7'-dichlorohydrofluorescéine (HDCF-DA).

La cellule est perméable au HDCF-DA qui est un précurseur du 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF) non fluorescent. Ce précurseur est utilisé comme marqueur du stress oxydatif produit par les cellules. Des estérases cellulaires clivent le HDCF-DA au niveau de deux liaisons ester et produisent une molécule relativement polaire qui reste à l'intérieur de la cellule. Il y a ainsi accumulation de molécules non fluorescentes au sein de la cellule qui peuvent être oxydées en dichlorofluorescéine (DCF) par des peroxydases au cours de l'oxydation mitochondriale. La DCF fluoresce et l'état d'oxydoréduction cellulaire peut être visualisé grâce à la détection de la fluorescence émise.

Nous avons mesuré la production de deux produits importants du stress oxydatif, l'anion ou radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'aide du marqueur fluorescent : le CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (C₂₇H₁₉Cl₃O₈; MM : 577,8) Molecular Probes, Invitrogen, France)) selon le protocole proposé par Chen et coll. (2003a). De 0,5 à 1.10⁶ cellules sontensemencées, traitées avec les molécules d'intérêt, prélevées par trypsinisation à différents points de temps et centrifugées à 900 g, 5 min à 4°C. Après un lavage au PBS 0,1 M pH 7,2, les cellules sont remises en suspension dans du PBS préchauffé à 37°C contenant 8,5 µM du CM-H₂DCFDA (dilution 1/200 du stock 1,7 mM/éthanol) et mises en incubation 30 min à l'obscurité/RT. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le H₂O₂. Le H₂O₂ est ajouté à 0,3% (v/v) dans le milieu de culture d'un groupe non traité, 30 min avant l'étape de la trypsinisation. La fluorescence verte émise (FL-1) suite à l'oxydation du DCF, est détectée par cytométrie en flux et analysée pour 10.000 cellules/échantillon.

5.5. Mesure de l'intégrité membranaire des lysosomes

Les lysosomes sont des corpuscules cellulaires riches en hydrolases, telles que des nucléases, phosphatases, lipases, phospholipases, glycosidases etc. Le pH lysosomal chez une cellule normale est proche de 5. Ils interviennent dans l'homéostasie cellulaire et dans les phénomènes de la digestion cellulaire. Au cours des étapes précoces du processus apoptotique, ils déversent leur contenu enzymatique dans le milieu suite à la perméabilisation de la membrane lysosomiale (Guicciardi et coll., 2004). La déstabilisation lysosomiale est déterminée par cytométrie en flux grâce à l'utilisation de l'acridine orange (AO) (Acridine Orange hydrochloride hydrate, C₁₇H₁₉N₃ClH, MM : 265,36, Sigma, Allemagne) qui fluoresce suite à une excitation de lumière de longueur d'onde de 488 nm (Yuan et al. 2002). L'AO s'accumule dans les lysosomes et le faible pH influence le spectre d'émission de la fluorescence de la molécule (passage du vert vers le rouge). Lorsque le pH des lysosomes change et/ou la membrane lysosomiale est perturbée, l'AO diffuse dans le cytosol et il y a ainsi une augmentation de la fluorescence verte émise.

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sontensemencées et l'AO ($5 \mu\text{g/ml}$) est ajoutée dans le milieu de culture 15 min avant le traitement aux hydroxystérols. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu 3% et remises en culture en absence/présence des hydroxystérols. Comme contrôle positif, nous avons utilisé la chloroquine ($0,15 \text{ mM}$) qui est une molécule lysosomotropique connue. La concentration de la chloroquine est optimisée selon l'effet de cette molécule sur la croissance cellulaire et selon ses propriétés lysosomotropiques. A différentes périodes, les cellules sont collectées de la même façon que pour les autres expériences en cytométrie de flux. Le culot est repris dans $200 \mu\text{l}$ de PBS $0,1 \text{ M}$ pH $7,2$ pour l'analyse au cytomètre. Les fluorescences verte et rouge émises sont capturées par FL-1 et FL-3 respectivement pour 10.000 cellules/échantillon.

5.6. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) établi au niveau de la membrane interne charge la chambre interne ou matrice négativement et la chambre externe positivement. La perturbation du potentiel membranaire peut conduire à l'ouverture des canaux mitochondriaux, qui a pour conséquence l'établissement de l'équilibre des ions entre la matrice et la chambre externe et entraîner ainsi la chute du $\Delta\Psi_m$ (Poncet et coll., 2003). La mesure du potentiel membranaire mitochondrial est réalisé par cytométrie en flux grâce au fluorochrome : 3,3'-diethyloxcarbocyanine iodide (DiOC₂(3)) (C₂₁H₂₁IN₂O₂, MM : 460,31, Molecular Probes, Invitrogen, France). Il s'agit d'une molécule cationique lipophile qui pénètre dans le cytosol des cellules eucaryotes et fluoresce en vert (530 nm , FL-1) ou rouge (650 nm , FL-3) suite à une excitation à 488 nm . A des concentrations inférieures à 100 nM , le marqueur s'accumule dans les mitochondries dont le potentiel est actif (Shapiro et coll., 1979) et l'émission de la fluorescence est importante. Dans les cellules apoptotiques ou lorsque le potentiel membranaire est perturbé, l'intensité de la fluorescence du fluorochrome diminue.

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sont ensemencées et traitées avec ou sans les hydroxystéroïls pendant différentes périodes de temps. Elles sont collectées par trypsinisation classique et lavées au PBS $0,1$ M pH $7,2$. Le culot est remis en suspension dans du PBS préchauffé à 37°C et le $\text{DiOC}_2(3)$ est ajouté à concentration finale de 50 nM. Pour le contrôle positif, le constructeur fournit la molécule CCCP (cyanure de 3-chlorophényl hydrazone carbonyle, $\text{C}_9\text{H}_5\text{ClN}_4$, MM : $204,62$) qui perturbe la membrane mitochondriale, en inhibant le gradient électrochimique mitochondrial. Elle est ajoutée à 50 μM en présence du $\text{DiOC}_2(3)$. Suite à une incubation de 30 min à 37°C et à l'obscurité, les cellules sont lavées avec du PBS préchauffé et centrifugées à 900 g, 5 min à 4°C . Le culot est repris dans 200 μl du PBS pour l'analyse au cytomètre. Les fluorescences verte et rouge émises sont capturées par FL-1 et FL-3 respectivement pour un échantillon de 10.000 cellules.

5.7. Mesure de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax

Les protéines Bcl-2 et Bax font partie de la famille des protéines Bcl-2 qui sont des régulateurs de l'apoptose (Lucken-Ardjomande et coll., 2005). Les taux d'expression des deux protéines peut déterminer l'état physiologique d'une cellule : la survie ou l'apoptose. La surexpression de la protéine Bcl-2 peut inhiber l'apoptose, alors que la surexpression de la protéine Bax peut la favoriser (Aggarwal, 2004). La détection de leur expression est réalisée par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps spécifiques couplés au FITC.

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sont ensemencées et traitées avec ou sans les hydroxystéroïls pour différentes périodes de temps. La détection des protéines intracellulaires nécessite la fixation et la perméabilisation des cellules. Pour ceci, le kit de fixation/perméabilisation BD Cytotfix/Cytoperm™ (Pharmingen, BD Biosciences, San Jose, USA) est utilisé. Les cellules sont récupérées par trypsinisation, lavées dans du PBS $0,1$ M pH $7,2$ et centrifugées 5 min à 900 g, 4°C . Le culot est remis en suspension dans 250 μl de la solution de fixation/perméabilisation fournie par le kit et incubé pendant 20 min à 4°C . Suite à deux lavages dans du tampon $1\times\text{BD Perm/Wash}^{\text{TM}}$ et centrifugées 5 min, 900 g à 4°C , les cellules sont incubées avec des anticorps spécifiques. Les dilutions nécessaires sont réalisées dans le tampon $1\times\text{BD Perm/Wash}^{\text{TM}}$:

-Pour la détection de la protéine Bcl-2 : 20 µl de l'anticorps monoclonal de souris anti-hBcl-2 couplé à la FITC (clone Bcl-2/100, BD Pharmingen, USA) sont incubés avec les cellules pendant 30 min à 4°C et à l'obscurité. Pour le contrôle de l'isotype, l'immunoglobuline de souris IgG₁ couplée à la FITC (clone MOPC-21, BD Pharmingen, USA) est utilisée dans les mêmes conditions que l'anti-Bcl-2 ;

-Pour la détection de la protéine Bax : l'anticorps polyclonal de lapin anti-hBax (BD Pharmingen, USA) (10 µl, dil. 1/100) et le fragment F(ab')₂ de porc anti-immunoglobuline de lapin couplé à la FITC (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) (10 µl, dil. 1/10) sont utilisés dans les mêmes conditions que pour la détection de la protéine Bcl-2. Entre le premier et le second anticorps, il y a une étape de deux lavages dans du tampon 1x BD Perm/Wash™.

A la fin des incubations avec les anticorps couplés à la FITC, les cellules sont lavées avec le tampon 1x BD Perm/Wash™. Pour l'analyse au cytomètre, le culot est repris dans 200 µl du même tampon ou PBS préchauffé. La fluorescence verte émise est détectée par FL-1 pour un échantillon de 10.000 cellules.

6. Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH)

La LDH est une enzyme cytosolique ubiquitaire et son apparition dans le milieu extracellulaire est un bon marqueur de la lyse cellulaire. Grâce au dosage de son activité enzymatique, nous pouvons évaluer la mort cellulaire et ainsi déterminer la cytotoxicité d'un produit (Decker et Lohmann-Matthes, 1988). Nous avons évalué l'activité de la LDH par le kit cyto Tox R (Promega, Madison, USA), qui est un test colorimétrique. Nous pouvons ainsi mesurer la LDH libérée dans le milieu de culture par les cellules lysées. Cette méthode est basée sur la conversion de L-lactate en pyruvate par oxydation et la réduction simultanée du NAD⁺ en NADH. L'apparition du NADH dans le milieu entraîne une réaction enzymatique par la LDH et la conversion du sel de tetrazolium en formazan (produit rouge). L'intensité de la réaction enzymatique dans le milieu est proportionnelle au nombre des cellules lysées.

Les cellules sontensemencées dans des boites de Pétri (1.10^6 cellules/boite) en présence ou absence des hydroxystérols à tester. Elles sont incubées plusieurs jours et à différents points de temps, 500 μ l de milieu de culture sont prélevés, centrifugés à 900 g, 5 min /RT. 50 μ l de chaque surnageant sont déposés sur une plaque de 96 puits (Falcon, France). Le DMEM 3% est utilisé comme contrôle. La réaction enzymatique démarre après l'ajout de 50 μ l de substrat, elle se déroule à l'obscurité et pour une durée de 30 min. Après ajout de 50 μ l d'une solution STOP, l'activité de la LDH est révélée par la lecture de l'absorbance à 490 nm. Ce test reste qualitatif et nous ne pouvons pas faire une corrélation entre le nombre de cellules lysées et l'activité de la LDH mesurée. Avec cette technique, nous avons souhaité visualiser uniquement la cytotoxicité des produits. Plusieurs protocoles sont valables pour déterminer également le type de mort cellulaire induit mais leur application sur les cellules adhérentes reste difficile. Pour la détermination de la mort cellulaire, nous avons choisi de réaliser d'autres types d'expériences.

7. Biosynthèse et catabolisme des polyamines

Les cellules sontensemencées ($0,6 \cdot 10^6$ /boite) et incubées en présence ou absence des hydroxystérols d'intérêt. A différents points de temps, les cellules sont collectées par grattage, lavées 2 fois avec du PBS 0,1 M pH 7,2 (centrifugation à 900 g, 5 min 4°C) et les culots sont stockés à -80°C jusqu'à la réalisation de l'expérience. Avant le dosage enzymatique, les culots sont repris dans du tampon Tris-HCl pH :7,4 (100 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) auxquels sont rajoutés des inhibiteurs de protéases (0,5 µM Leupeptine, 0,5 mM PMSF). Les échantillons sont homogénéisés par sonication et après une ultracentrifugation de 25 min, 4°C à 33.000 g, les surnageants sont récupérés et le dosage des activités enzymatiques est réalisé immédiatement. Le dosage de la quantité des protéines est également réalisé par la méthode Lowry sur les mêmes échantillons.

7.1 Ornithine Décarboxylase (ODC)

La méthode utilisée pour la mesure de l'activité de l'ODC est basée sur la méthode utilisée par Richmann et coll. (1971). Les échantillons (250 µl) sont incubés dans un mélange de 250 µl (0,5 µCi) de [1-¹⁴C]L-Ornithine 18 µM (55 mCi/mmmole, Amersham Pharmacia Biotech, UK) et 50 µM de phosphate de pyridoxal à 37°C pendant 30 min. L'activité de l'ODC est déterminée par le taux de formation de ¹⁴CO₂ suite à la décarboxylation de l'ornithine marquée. Le ¹⁴CO₂ libéré est absorbé par un filtre imprégné de NaOH 2 N. La réaction est stoppée par l'injection de 500 µl d'acide citrique 1 N. Les filtres sont séchés et le taux de radioactivité est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à scintillation liquide.

7.2 S-Adénosyl Méthionine Décarboxylase (AdoMetDC)

Le dosage de l'activité de l'AdoMetDC suit le même principe que le dosage de l'activité de l'ODC sauf que nous mesurons le taux de ¹⁴CO₂ libéré suite à la formation de la S-adénosyl méthionine décarboxylée à partir de la S-adénosyl méthionine (Persson et coll., 1986). Les échantillons (200 µl) sont incubés dans un mélange de 0,2 µCi de [1-¹⁴C]S-adénosyl-L-méthionine (60 mCi/mmmol, Amersham Pharmacia Biotech, UK) et de 2,2 mM de putrescine (Sigma, Steinheim, Allemagne) 30 min à 37°C. Les étapes suivantes sont les mêmes que pour l'ODC. Les résultats sont exprimés en pmoles de ¹⁴CO₂ produit par heure et mg de protéines.

7.3 Dosage de : Putrescine, Spermidine, Spermine & formes acétylées

La mesure du contenu intracellulaire en polyamines est réalisée par chromatographie liquide à haute performance selon la méthode de Seiler et Knödgen (1980). Les cellules traitées ($0,6 \cdot 10^6$ cellules/ boîte) sont collectés par grattage puis lavées avec du PBS 0,1 M pH 7,2, (centrifugation 900g, 5 min à 4°C) et homogénéisés par sonication dans de l'acide perchlorique 0,2 M. Les échantillons sont centrifugés à 3000 g pendant 10 min après une incubation de 16 h à 4°C. Les culots sont utilisés pour le dosage protéique. Pour la détermination de la concentration de putrescine, spermidine, spermine, N¹-acétyl spermidine et N¹-acétyl spermine, les surnageants sont dilués (1/2, v/v) dans 0,2 M d'acide perchlorique et 0,5 µM d'héptanediamine. Des aliquotes de 200 µl sont alors injectées dans la colonne de la chromatographie.

Les caractéristiques de la colonne de garde et de la colonne analytique sont les suivantes :

- colonne de garde : L 5 cm, Pell ODS/C18, billes en verre de taille de 30 à 38 µm (Whatman Inc., UK)
- colonne analytique : L 12,5 cm, Ø 4,5 cm, filtre Supersher-RP18 / pores Ø 5 µm (Macherey-Nagel, France).

Les polyamines sont séparées par chromatographie de paires d'ions formées avec l'ophthalaldéhyde et du 2-mercaptoéthanol (1 : 1, v/v). Les groupes amines primaires forment des dérivés fluorescents dont l'intensité est mesurée à 455 nm. Les résultats sont représentés en pmoles/mg de protéines. Le programme de l'élution est décrit par le Tableau 5.

Temps d'élution (min)	% d'éluant		
	A	B	C
0	100	0	0
5	82	18	0
10	63	37	0
20	35	65	0
36	10	90	0
45	0	90	10
53	100	0	0

Tableau 5 : Programme d'élution des polyamines.

A : 0,1 M d'acétate de potassium pH 4,75 contenant 2,18 g/l d'acide n-octanesulfonique

B : éluant A 0,2 M contenant de l'acétonitrile avec un rapport 10 :3 (v/v)

C : acétonitrile

La vitesse de l'élution est de 1,5 ml.min⁻¹ à 25°C et la colonne de la chromatographie est équilibrée avant chaque dépôt avec de l'éluant A pendant 5 min.

Un échantillon standard contenant des concentrations connues de différentes polyamines, dont l'héptanediamine qui sert de standard interne. Le standard interne est également rajouté dans tous les échantillons ce qui permet de déterminer la concentration de chaque polyamine (Figure 18).

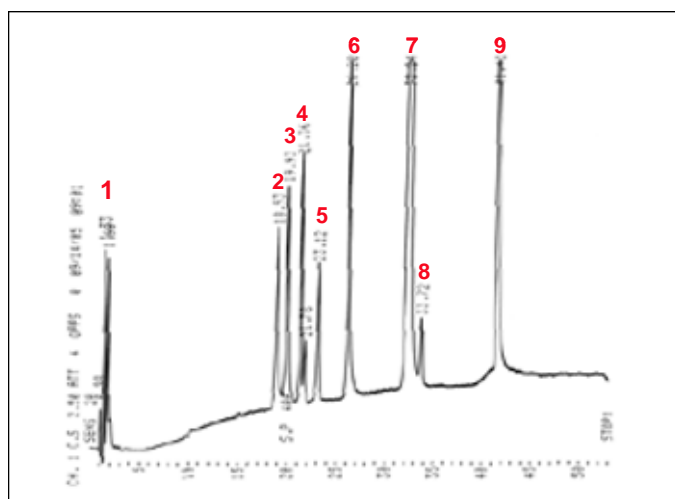


Figure 18 : Echantillon standard des polyamines (chromatographie HPLC).

1 : Putrescine ; 2 : Cadavérine ; 3 : Histamine ; 4 : N1 Acétyl Spermidine ; 5 : N8 Acétyl Spermidine ; 6 : Héptanediamine ; 7 : Spermidine ; 8 : N1 Acétyl Spermine ; 9 : Spermine.

8. Fragmentation d'ADN

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sontensemencées en présence ou en absence des hydroxystérois pendant différents points de temps. Les cellules sont collectées par grattage et lavées au PBS $0,1M$ pH $7,2$ ($900g$, $5min$ à $4^{\circ}C$). Le Suicide-Track™ DNA Isolation Kit (Oncogene Research Products, San Diego, CA) est utilisé pour la mise en évidence de la fragmentation d'ADN. L'extraction d'ADN total est réalisée selon la procédure décrite par le fabricant et les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse (100 Volt, $30min$). Elles sont visualisées à l'aide d'un UV transilluminator Gel Doc 2000 et analysées à l'aide du logiciel Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France).

9. Mesure de l'activité des caspases : -3, -8 et -9

La mesure de l'activité spécifique de ces enzymes est réalisée par des tests colorimétriques sur des plaques de 96-puits. Le principe est le même pour chaque dosage excepté l'utilisation des substrats qui sont propres à chaque caspase :

-Caspase-3 : l'essai colorimétrique est réalisé avec le Caspase 3 Assay kit (Sigma, Allemagne). Cette expérience est basée sur l'hydrolyse du substrat Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroaniline (Ac-DEVD-pNA) par la caspase-3 présente dans les lysats cellulaires. Cette réaction conduit à la libération de p-nitroaniline (pNA) dont sa concentration est déterminée après mesure de la densité optique à 405 nm. Les valeurs obtenues sont ajustées à l'aide d'une courbe standard avec des concentrations données de pNA ;

-Caspase-8 : le substrat utilisé est l' Acétyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline (Ac-IETD-pNA) (Sigma Aldrich, Allemagne) ;

-Caspase-9 : le substrat pour cet essai est le N-Acétyl-Leu-Glu-His-Asp-p-nitroaniline (Ac-LEDH-pNA) (R&D Systems, Lille, France).

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sont cultivées en absence ou en présence des hydroxystérols. A différentes périodes, les cellules sont récupérées par grattage, lavées avec du PBS $0,1$ M, pH $7,2$, (900 g, 5 min, 4°C). Les culots sont lysés dans le tampon de lyse suivant : 50 mM Hepes, pH $7,4$, 5 mM CHAPS et 5 mM DTT. Le déroulement de chacune de ces expériences est réalisé selon les instructions de chaque fabricant. Pour la caspase-9, le taux d'activité enzymatique dans les lysats cellulaires est directement proportionnel à l'intensité de la coloration de la réaction. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité au sein des différents échantillons traités par rapport au groupe contrôle. L'activité spécifique pour la caspase-3 et -8 est exprimée en nmoles de pNA libérés / min / mg de protéines. La concentration des protéines extraites est déterminée par la méthode de Lowry (1951).

10. Libération du cytochrome *c*

Le cytochrome *c* est libéré dans le cytosol suite à une perturbation de la membrane mitochondriale, événement souvent lié avec l'initiation de l'apoptose (Mathews, 1985). Le cytochrome *c* est indispensable dans l'activation d'autres facteurs apoptotiques, tels que les caspases (Li et coll., 1997; Cho et coll., 2002). La méthode « ELISA sandwich » est utilisée pour détecter et quantifier le cytochrome *c* libéré lors d'un processus apoptotique (Figure 19). L'antigène possède deux épitopes différents et il est reconnu par deux anticorps différents. Un des deux anticorps est fixé au fond des puits de la plaque de microtitration (96-puits) alors que l'autre est couplé à la peroxydase. La révélation consiste à mesurer l'activité catalytique de l'enzyme après addition de son substrat (H_2O_2 + diamine orthophénylène). Cette réaction libère un produit coloré dont la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm.

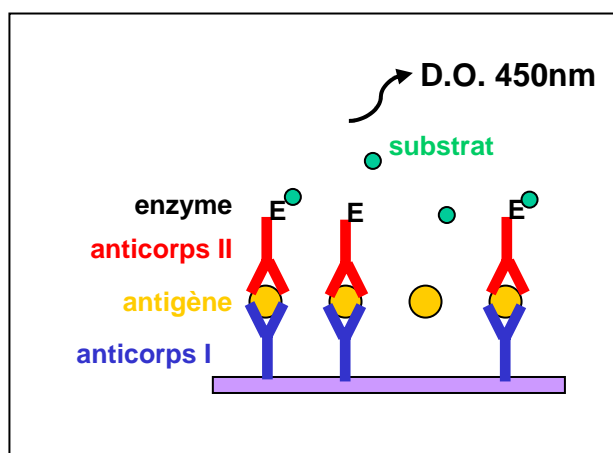


Figure 19 : Schéma de méthode « Sandwich ELISA ».

De $0,5$ à 1.10^6 cellules sont cultivées en absence ou en présence des hydroxystérols. A différentes périodes, les cellules sont récupérées par grattage, lavées avec du PBS $0,1$ M, pH $7,2$ (900 g, 5 min, 4°C). La détection et la quantification du cytochrome *c* sont réalisées à l'aide des deux kits : Active Motif's Extract Kit pour la séparation de la fraction mitochondriale et cytosolique, et FunctionELISA™ Cytochrome *c* kit (Active Motif, Rixensart, Belgique) pour la quantification du cytochrome *c* dans chacune de ces fractions. La concentration protéique dans chaque fraction est déterminée par la méthode de Lowry. Les expériences sont réalisées selon les instructions du fabricant. Les résultats obtenus sont exprimés en nmoles de cytochrome *c* / mg des protéines.

11. Mesure de l'activité enzymatique des protéines kinases MAPK

Les protéines kinases MAPK pour Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) sont des protéines qui permettent la transmission des signaux perçus par des récepteurs extracellulaires vers des cibles intracellulaires. Ces protéines font partie des voies responsables du contrôle et de la régulation de la prolifération, la différenciation, l'apoptose ou les réactions inflammatoires. L'activation des kinases MAPK aboutit à des réactions en cascade faisant intervenir plusieurs facteurs cellulaires. Chez les vertébrés, il existe trois sous-familles des kinases MAPK : les protéines ERK 1 et 2 (Extracellular signal-Regulated Kinases ou p44 et p42 MAPK), JNK (c-Jun N-terminal Kinase) et p38 MAPK. La signalisation initiée par les protéines ERK1/2 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, alors que JNK participe à l'induction de la mort cellulaire. Les deux protéines sont activées par phosphorylation (Morrison et coll., 2003; Weston et coll., 2002; Robinson et coll., 1997).

La détection et la quantification des protéines ERK1/2 et JNK phosphorylées ainsi que leurs formes inactives sont réalisées à l'aide d'une technique d'immunodétection colorimétrique ou dosage indirect d'un antigène. Elle suit le même principe que la méthode de «ELISA sandwich» sauf que l'anticorps est fixé au fond des puits de la plaque de microtitration et l'anticorps à doser est pris en « sandwich » entre l'antigène et l'anticorps secondaire couplé à un enzyme (ex. peroxydase) (Figure 20).

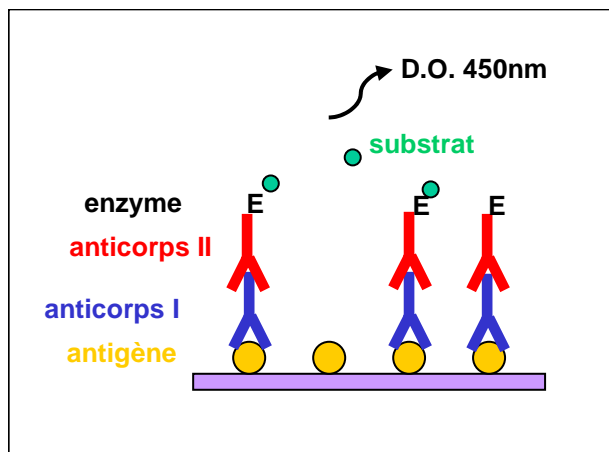


Figure 20: Schéma de la technique du dosage indirect d'un antigène.

Les kits FACE™ERK1/2 et FACE™JNK (Active Motif, Belgique) sont utilisés afin de déterminer le taux de phosphorylation des protéines ERK1/2 et JNK par rapport aux protéines ERK1/2 et JNK totales détectées dans les cellules. Les cellules sontensemencées dans des plaques de microtitration à l'ordre de 10.000 cellules/puit, en présence ou absence des hydroxystérols. A différentes périodes et selon les instructions du fabricant, les cellules sont fixées et traitées avec des anticorps anti-JNK phosphorylé, anti-JNK total ou anti-ERK phosphorylé, anti-ERK total ainsi qu'avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase. La densité optique du produit coloré suite à la réaction enzymatique entre la peroxydase et son substrat est mesurée par lecture différentielle à 450nm et à 655nm. Le nombre relatif des cellules/puit est déterminé grâce à une coloration au cristal violet qui est un colorant vital. La densité optique est mesurée à 595nm. Les résultats obtenus sont exprimés en tant que rapport de la D.O. ERK ou JNK/ densité cellulaire.

12. Extraction protéique et Western Blot

Les cellules sont extraites des boîtes de Pétri par grattage, lavées dans du PBS 0,1 M pH 7,2 (900 g, 4°C, 5 min), puis reprises dans du tampon de lyse contenant Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM, Triton X-100 1% pendant au moins 30 min à 4°C et centrifugées à 10.000 g à 4°C pendant 20 min. Les surnageants cellulaires sont récupérés et sur une petite fraction, nous avons dosé la quantité protéique cellulaire (méthode Lowry).

Entre 10 et 20 μg de protéines sont déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 12% (électrophorèse : 100 V, 2 h) puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (BioRad, France) (transfert : 200 mA, 2 h 30). Les membranes sont incubées dans du tampon TBST (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%) contenant 3% de BSA pendant 1 h/RT et sous agitation. Elles sont ensuite incubées avec du tampon TBST contenant les anticorps primaires à des dilutions adéquates durant toute la nuit à 4°C et sous agitation. Le lendemain, elles sont lavées 3 fois 10 min dans du tampon TBST avant d'être incubées pendant 1 h à température ambiante avec du tampon TBST contenant les anticorps secondaires spécifiques aux anticorps primaires et couplés à la peroxydase. Les anticorps utilisés pour la détection des différentes protéines humaines ainsi que leur facteur de dilution sont :

Anticorps Primaires

-L'anticorps monoclonal de lapin anti-Endonucléase G dilué à 1 :5000 (0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Calbiochem, Merck Biosciences, Allemagne) ;

-L'anticorps monoclonal de souris anti- β -actine à 1 :2000 (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Chemicon Int., Hampshire, G.Bretagne).

Anticorps Secondaires

-L'anticorps monoclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase à 1 :50.000 (0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Calbiochem, Allemagne) ;

-L'anticorps monoclonal de chèvre anti IgG de souris couplé à la peroxydase à 1 : 2000 (0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Pierce, France).

Après 3 lavages de 10 min dans du tampon TBST et 2 lavages de 5 min dans du tampon TBS sans Tween 20, la révélation chimioluminescente est réalisée avec le kit SuperSignal[®] West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Perbio Science, Brebières, France). L'intensité des bandes est mesurée à l'aide de l'analyseur d'images GelDoc et le logiciel Quantity One 1-D Analysis Software (BioRad Laboratories, France).

13. Microscopie Optique : Coloration de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342

Les noyaux des cellules Caco-2 sont marqués à l'aide du fluorochrome Hoechst 33342 (350-450 nm). Il s'agit d'un marqueur vital qui se fixe sur l'ADN. Il peut être ainsi utilisé aussi bien pour des observations par microscopie optique que par cytométrie en flux car l'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN présent. De $0,5$ à 1.10^6 cellules, sontensemencées dans des boîtes de Pétri contenant 4 lames en verre stériles. Les lames sont récupérées après différentes périodes de traitement avec les hydroxystéroïls et les cellules qui y ont adhérentes sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4%-PBS 0,1 M pH 7,2 pour une durée minimale de 30 min/RT. Elles sont ensuite lavées au PBS et les cellules sont incubées avec la solution PBS- Hoechst 33342 (25 µg/ml) pendant 15 min à l'obscurité/RT. Les lames sont observées au microscope optique à fluorescence (Axiophot Zeiss, Germany).

14. Analyse des ultrastuctures cellulaires par microscopie électronique

De $0,2$ à $0,5 \cdot 10^6$ cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 5 cm^2 . A différentes périodes de traitement en absence et en présence des hydroxystérols, les cellules sont rincées au PBS $0,1 \text{ M}$ pH $7,2$ et fixées par le glutaraldéhyde à $2,5\%$ (v/v) dans du tampon cacodylate de sodium $0,075 \text{ M}$, pH $7,4$ pour une durée minimale de 24 h . Le glutaraldéhyde est un dialdéhyde très réactif ($\text{HOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{COH}$) qui fixe les protéines par une réaction de réduction entre ses groupements aldéhydiques et les groupements amines. Le glutaraldéhyde pénètre très rapidement et stabilise la structure fine des cellules. De plus, il augmente la perméabilité de l'échantillon au milieu d'inclusion et évite la formation de grandes distorsions. En revanche, le glutaraldéhyde ne réagit pas avec les lipides et ces derniers n'étant pas fixés peuvent être solubilisés par les solvants organiques utilisés lors de l'inclusion. Pour éviter cet inconvénient, une étape de post-fixation au tétr oxyde d'osmium à 1% (v/v) est réalisée dans de l'eau déminéralisée pendant 1 h à 4°C . Le tétr oxyde d'osmium interagit avec les lipides insaturés par oxydation et permet la bonne conservation des membranes. Afin d'obtenir un meilleur contraste, les échantillons sont lavés dans un bain d'acétate d'uranyle à 2% (w/v) dans de l'éthanol à 50% pendant 40 min . L'acétate d'uranyle ainsi préparé interagit avec les groupements phosphates des phospholipides. Les échantillons sont ensuite soumis à une déshydratation progressive par des bains successifs d'éthanol à 70% ($3 \times 20 \text{ min}$), 90% ($3 \times 20 \text{ min}$) et absolu ($3 \times 20 \text{ min}$). Les échantillons sont recouverts par des demi-gélules de gélatine remplies de résine époxy (LX 112, Ladd Research Industries, Burlington, USA). Après une étape de polymérisation à 65°C pendant 48 h , les demi-gélules qui portent à leur extrémité la monocouche cellulaire, sont récupérées. Des coupes fines de l'ordre de $\sim 100 \text{ nm}$ sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Reichert Ultracut E et déposées sur des grilles de microscopie électronique à transmission (MET). Après contraste avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb, les coupes sont observées au MET Philips EM-410 (Eindhoven, Pays Bas).

Pour les échantillons analysés par microscopie électronique à balayage (MEB), une étape de déshydratation suit l'étape de la fixation décrite précédemment. Les préparations à déshydrater, sont amenées dans l'éthanol absolu et mises en contact pendant 15min avec chacun des bains suivants : éthanol 100%/ hexaméthylsilazane (HMDS, Merck, Allemagne) : 3v/1v ; 2v/2v ; 1v/3v puis avec du HMDS pur (2x15min). Le produit est ensuite enlevé et les préparations sont placées sous une Sorbonne pendant une nuit. Les échantillons dessèchent rapidement et avec peu de distorsions. Les bords des boites de Pétri à 5cm² contenant les monocouches cellulaires sont ensuite coupés et les fonds des boites sont fixés sur des porte-objets à l'aide d'une colle au carbone (Leit C). Le MEB exige que les échantillons biologiques soient conducteurs pour l'électricité. Pour ce faire, les préparations sont recouvertes d'une fine couche métallique de l'ordre de 15nm d'un alliage or-palladium (60% or -40% palladium) à l'aide d'un évaporateur cathodique (Balzers, Lichtenstein). Les préparations sont ensuite observées au MEB Hitachi-S-800 (Tokyo, Japan).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

Différents mécanismes apoptotiques sont impliqués dans les effets antiprolifératifs du 7 β -hydroxysitostérol et du 7 β -hydroxycholestérol sur les cellules cancéreuses coliques humaines

1. Résumé

Les stérols des plantes sont retrouvés dans les fruits et les légumes. Leurs effets sur la baisse du taux de cholestérol sont bien documentés. Notre étude a visé à comparer les effets antiprolifératifs du 7 β -hydroxystostérol (7 β -OHSito) par rapport à ceux du 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OHchol) sur la lignée cellulaire cancéreuse colique humaine, Caco-2. Quand les cellules sont exposées au 7 β -OHSito 60 μ M ou au 7 β -OHchol 30 μ M pendant 32 h, les deux molécules provoquent une inhibition de croissance de l'ordre de 50%. Les cellules traitées avec le 7 β -OHSito montrent une augmentation de l'activité de la caspase-9 et de la caspase-3 suivie par la fragmentation de l'ADN. A l'opposé, le 7 β -OHchol n'a pas activé la caspase-3 alors que l'activation de la caspase-9 et la fragmentation d'ADN sont retardées. Le traitement des cellules avec l'inhibiteur des pancaspases Z.VAD-fmk a retardé le processus apoptotique induit par le 7 β -OHSito, mais non celui induit par le 7 β -OHchol. Nos résultats indiquent que les deux molécules, malgré leurs similitudes structurales, ciblent différentes voies cellulaires qui conduisent à la mort cellulaire.

2. Introduction

Les stérols des plantes sont abondants dans les fruits et les légumes. Parmi les phytostérols, le sitostérol, le campestérol et le stigmastérol sont les plus importants. Ce sont des analogues structuraux du cholestérol. Des nombreuses études scientifiques sont basées sur le potentiel de ces molécules à réduire l'absorption du cholestérol au niveau de l'intestin grêle (Tapiero et coll., 2003; Igel M et coll., 2003; Christiansen et coll., 2001; Miettinen et Gylling, 2003) ainsi que la prise en charge du cholestérol par les LDL (De Jong et coll., 2003; Plat et coll., 2000; Clifton et coll., 2004). De plus, il a été démontré que les phytostérols préviennent les maladies cardiovasculaires (Moghadasian, 2000; Plat et Mensink, 2001; Ostlund et coll., 2002; Koziowska-Wojciechowska et coll., 2003). Cependant, leur potentiel de réduire le risque de cancer demeure controversé (Awad et Fink, 2000; Normen et coll., 2001; De Jong et coll., 2003; Fahy et coll., 2004). Plusieurs études ont mis en évidence les propriétés antiprolifératives des stérols des plantes sur les cellules du cancer du sein (Awad et coll., 2000; 2003), les cellules du cancer de la prostate (Awad et coll., 2001), les cellules cancéreuses coliques HT-29 (Awad et coll., 1996; 1998) et HCT116 (Choi et coll., 2003). Il a été suggéré que ces effets sont apparentés à l'activation du cycle de la sphingomyéline, à l'arrêt du cycle cellulaire et/ou à la stimulation de l'apoptose (Awad et coll., 1996; 1998). L'induction de l'apoptose par le β -sitostérol semble associée à l'augmentation du taux d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et à l'activation des caspases (Choi et coll., 2003).

Les phytostérols subissent l'oxydation au cours du stockage et des préparations culinaires. Cependant, il existe très peu de travaux sur les activités biologiques des oxydes des phytostérols (Daly et coll., 1983; Lutjohann, 2004). Il a été démontré que ces molécules altèrent les macrophages en culture (Adcox et coll., 2001) et que l'hydroxysitostérol induit le processus apoptotique dans les cellules U937 accompagné par une réduction du taux du glutathion intracellulaire (Maguire et coll., 2003).

En outre, de nombreuses études ont démontré les propriétés athérogéniques (Witztum et Steinberg, 1991; Biasi et coll., 2004) et cytotoxiques (Lizard et coll., 1999; Ji et coll., 1990; Lim et coll., 2003; Miguet-Alfonsi et coll., 2002) des oxydes du cholestérol, conduisant à l'apoptose ou à la nécrose dans un grand nombre de lignées cellulaires (Maguire et coll., 2003; Miguet et coll., 2001; Guardiola et coll., 1996; O'Callaghan et coll., 2002). Ils exercent également leurs effets en diminuant la disponibilité du cholestérol nécessaire à la formation des membranes cellulaires, par l'inhibition de l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol, la HMG-CoA reductase (Schroepfer, 2000). Les oxydes du cholestérol se fixent sur des récepteurs membranaires spécifiques ou sur des protéines cytosoliques qui interviennent dans la perturbation de la synthèse du cholestérol (Theunissen et coll., 1986; Thompson et Ayala-Torres, 1999; Olkkonen et Levine, 2004). Il a été aussi démontré que le 7 β -OHchol et le 7-ketocholestérol peuvent initier une mort non apoptotique sur les cellules U937 (Monier et coll., 2003). L'ensemble de ces données décrit la multitude des effets biologiques des oxydes du cholestérol. Pourtant, le mécanisme par lequel l'hydroxyphytostérol et l'hydroxycholestérol induisent la mort cellulaire, reste à déterminer.

Dans ce chapitre, notre but est de comparer les propriétés antiprolifératives du 7 β -OHsito et du 7 β -OHchol sur les cellules cancéreuses coliques humaines, Caco-2. Des effets cytotoxiques du 7 β -OHchol ainsi que d'autres oxystérols ont été rapportés sur les lignées cellulaires HT-29 et SW620 (Maier et coll., 1999). Puisqu'il a été démontré que le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol sont les hydroxystérols les plus abondants dans l'alimentation suite au stockage et à la préparation culinaire (Schroepfer, 2000; Clifton, 2002), il était intéressant de comparer leurs effets cytotoxiques. Nos résultats montrent que les deux composants sont cytotoxiques, mais que les voies activées qui contrôlent la mort cellulaire sont différentes.

3. Résultats : PUBLICATION n° 1

Different apoptotic mechanisms are involved in the anti-proliferative effects of 7 β -hydroxysterol and 7 β -hydroxycholesterol in human colon cancer cells

S Roussi, A Winter, F Gossé, D Aoudé-Werner, X Zhang, E Marchioni, P Geoffroy, M Miesch, F Raul. Cell Death and Differentiation, 2005; 12:128-135



[Ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abstractplus&list_uids=15550935

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

4. Résultats complémentaires

La coloration Hoechst 33342 est une technique qui permet de visualiser la morphologie des cellules par marquage de leur noyau (Miguet et coll., 2001). Différents temps sont considérés : 12, 24, 32, 48, 56, 72 h. Les résultats sont présentés sur la Figure 21.

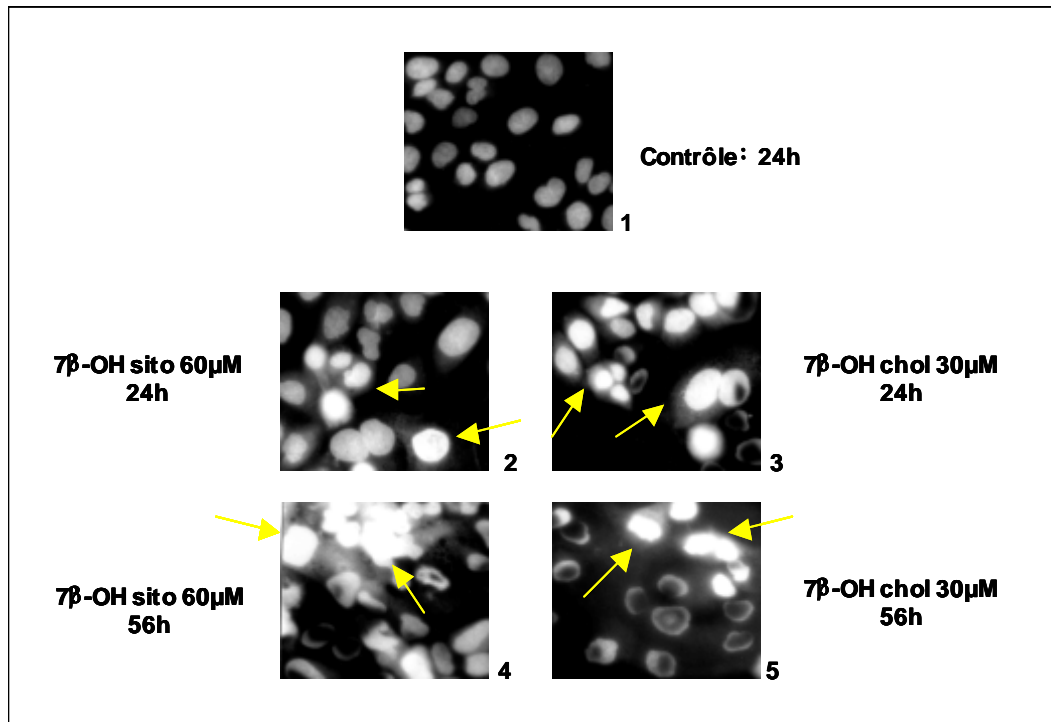


Figure 21 : Marquage de l'ADN cellulaire par Hoechst 33342

Nous avons constaté que les cellules du groupe contrôle gardent le même aspect durant toute l'expérience (photo 1). Après 24 h de traitement avec le 7 β -OHsito à 60 μ M et le 7 β -OHchol à 30 μ M, les cellules augmentent de volume par rapport au groupe contrôle. Elles présentent également une forme moins régulière et présentent une condensation nucléaire (photos 2 et 3). Après 56 h de traitement, les cellules perdent leur adhérence, leur noyau est toujours fortement marqué et leur aspect devient de plus en plus irrégulier (photos 4 et 5). Pour des périodes de temps plus tardives (à partir de 56 h), les résultats sont inexploitable car les cellules sont dans un stade avancé d'apoptose avec un fort taux de mortalité (~80%).

5. Conclusion

Nos résultats apportent des informations originales sur les effets cytotoxiques comparatifs du 7 β -OHsito et du 7 β -OHchol. La sensibilité cellulaire est différente face à ces deux composés. Les deux molécules provoquent des changements morphologiques et induisent la fragmentation de l'ADN. L'inhibition de la croissance cellulaire est caractérisée par l'activation des voies de l'apoptose. Les deux hydroxystéroïls ciblent des voies de signalisation intracellulaires différentes malgré leur similitude structurale. Le 7 β -OHsito active la voie apoptotique dépendante des caspases, alors que l'effet du 7 β -OHchol reste indépendant de l'activation de celles-ci. Le processus apoptotique activé par le 7 β -OHchol semble être plus complexe et des facteurs indépendants des caspases pourraient être impliqués.

CHAPITRE II

La perturbation mitochondriale, le stress oxydatif et la déstabilisation lysosomiale interviennent dans l'apoptose initiée par le 7 β -hydroxysitostérol et le 7 β -hydroxycholestérol

1. Résumé

Nous avons rapporté auparavant que le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol induisent l'apoptose dans les cellules Caco-2. L'apoptose déclenchée par le 7 β -OHsito, mais non par le 7 β -OHchol, est liée à un processus dépendant des caspases. Dans le présent travail, nous avons comparé les effets des deux molécules sur l'intégrité mitochondriale et sur d'autres médiateurs de l'apoptose. Quand les cellules sont exposées aux deux hydroxystérols, aucun changement du taux d'expression des protéines Bcl-2 et Bax n'est détecté, ce qui est en faveur de l'existence d'une voie apoptotique indépendante des protéines Bcl-2/Bax, tandis qu'une perte du potentiel membranaire de la mitochondrie et une libération du cytochrome *c* (cyt *c*) dans le milieu intracellulaire sont observées. La stimulation de l'expression de l'endonucléase G (Endo G) et des produits du stress oxydatif (ROS) est observée dans les cellules traitées au 7 β -OHchol, mais non dans celles traitées avec le 7 β -OHsito. La perte du potentiel mitochondrial et la mort cellulaire produites par les deux molécules sont inhibées par la vitamine C. Enfin, l'intégrité de la membrane lysosomiale est altérée par les deux hydroxystérols. Toutefois, le 7 β -OHsito provoque une déstabilisation de la membrane lysosomiale significativement plus importante que celle produite par le 7 β -OHchol.

2. Introduction

Deux voies apoptotiques majeures sont identifiées au sein de la cellule : la voie extrinsèque caractérisée par l'activation de récepteurs extracellulaires (extracellular death-receptor or extrinsic pathway) et la voie intrinsèque régulée par la mitochondrie (mitochondrial or intrinsic pathway). La voie intrinsèque ou mitochondriale implique la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MMP) qui conduit à la mort cellulaire dépendante ou indépendante des caspases (Kroemer et Martin, 2005). Plusieurs *stimuli* : les agents oxydants (ROS), la perméabilisation de la membrane lysosomiale (LMP), la réduction des facteurs de croissance, l'hypoxie et les molécules cytotoxiques peuvent être à l'origine de la rupture de la membrane mitochondriale (Kroemer et Jäättelä 2005; Armstrong, 2006) sous le contrôle de la modulation des facteurs pro- et anti-apoptotiques telles que les protéines de la famille Bcl-2 (Antonsson, 2004).

La membrane mitochondriale présente un gradient électrochimique ($\Delta\Psi_m$) et la chute de celui-ci conduit à la MMP qui à son tour favorise la libération du cyt *c* dans le cytoplasme provoquant ainsi la mort cellulaire dépendant ou indépendante des caspases (Henry-Mowatt et coll., 2004). Le dysfonctionnement mitochondrial conduit également à la production des ROS qui peuvent endommager des protéines, l'ADN et d'autres organites cellulaires, favorisant ainsi la mort cellulaire (Fleury et coll., 2002). Plusieurs études ont démontré le lien entre la rupture de la membrane lysosomiale et MMP, ce qui a pour conséquence la libération de médiateurs qui sont impliqués dans l'apoptose dépendante ou indépendante des caspases et dans la nécrose (Kroemer et Jäättelä, 2005).

Afin de mieux comprendre les mécanismes apoptotiques ciblés par le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol, nous avons comparé leurs effets sur l'intégrité mitochondriale et sur plusieurs facteurs modulateurs de l'apoptose (Bcl-2, Bax, cyt *c*, Endo G). De plus, nous avons étudié l'impact de ces hydroxystéroïls sur la production des ROS et sur l'intégrité de la membrane lysosomiale.

3. Résultats : PUBLICATION n° 2

Mitochondrial perturbation, oxidative stress and lysosomal destabilization are involved in 7 β -hydroxysterol and 7 β -hydroxycholesterol triggered apoptosis in human colon cancer cells

S Roussi, F Gossé, D Aoudé-Werner, X Zhang, E Marchioni, P Geoffroy, M Miesch, F Raul. Apoptosis, 2007, Vol. 12, Pages 87-96



[Ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abstractplus&list_uids=17136497

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

4. Résultats complémentaires

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le comportement cellulaire suite au traitement à l'éthanol et aux hydroxystérols, nous avons réalisé des études morphologiques par microscopie électronique à transmission (MET). Il s'agit d'une expérience préliminaire et les résultats obtenus sont représentés sur les Figures 22-26.

Groupe témoin (Figure 22 : photos A, B) : Les cellules Caco-2 forment un tapis cellulaire au bout de 48 h de culture. Les cellules contiennent dans leur cytosol beaucoup de vésicules lipidiques (L), visibles sur la photo B. Les cellules Caco-2 sont déjà utilisées comme modèle d'étude du métabolisme lipidique mais les données actuelles ne concernent que les cellules Caco-2 différenciées (Levy et coll., 1995 ; Meunier et coll., 1995). Il n'existe aucune donnée sur les cellules Caco-2 non différenciées ainsi qu'aucune observation morphologique par M/E.

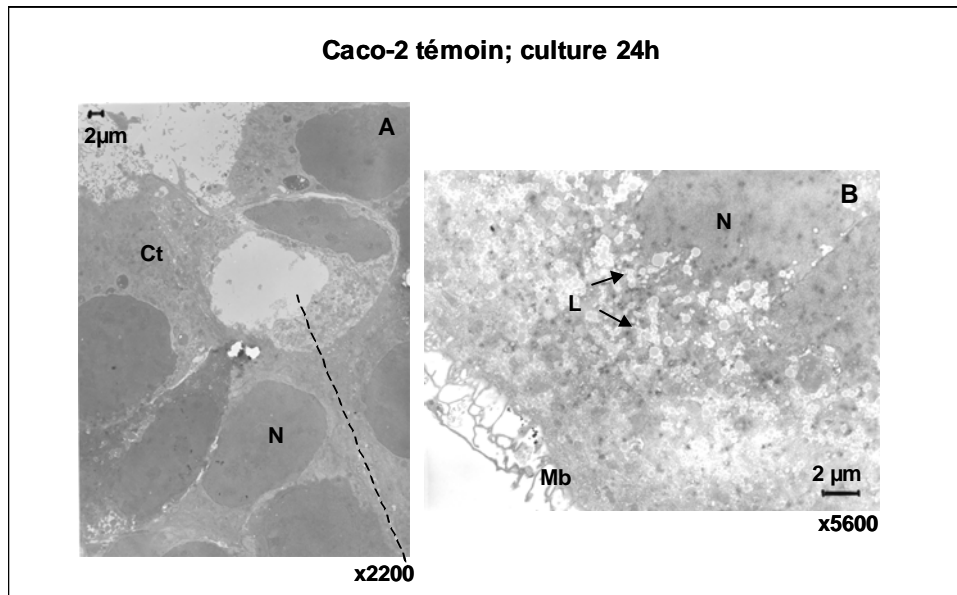


Figure 22 : Analyse par MET - groupe témoin.

Les cellules Caco-2 sont cultivées pendant 24 h dans du milieu de culture DMEM 3%. Elles n'ont subi aucun traitement. Ct : cytoplasme ; L : vésicules lipidiques ; Mb : membrane plasmique ; N : noyau. La ligne en pointillés délimite deux cellules. Les grossissements des photos sont indiqués et les barres correspondent à une échelle de taille réelle en μm . Expérience réalisée sur un échantillon.

Groupe contrôle (Figure 23 : photos A-C) : Les cellules sont traitées à l'éthanol 0,5% pendant 24 h. Il n'existe pas de différences morphologiques majeures en comparaison avec le groupe témoin.

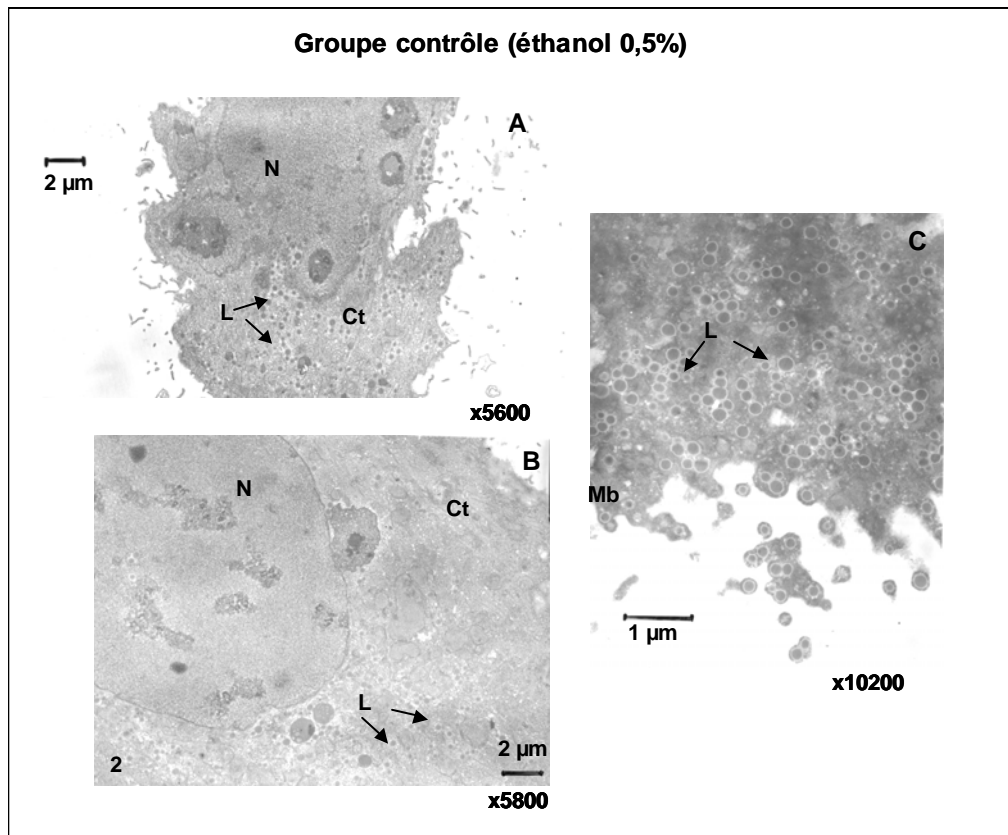


Figure 23 : Analyse par MET : groupe contrôle.

Les cellules sont traitées pendant 24 h avec de l'éthanol 0,5%. Ct : cytoplasme ; L : vésicules lipidiques ; Mb : membrane plasmique ; N : noyau. Les grossissements des photos sont indiqués et les barres correspondent à une échelle de taille réelle en µm. Expérience réalisée sur un échantillon.

Groupe 7 β -OHchol 24 et 32 h (Figure 24 : photos A-F) : les cellules sont cultivées en présence de 30 μ M de 7 β -OHchol pendant 24 et 32 h. Les photos prises uniquement à 24 h (A, B, C) et 32 h (D, E, F) sont illustrées car au delà de 32 h l'analyse était difficile faute du nombre et de l'état cellulaire. Les cellules présentent de vésicules lipidiques (L) de taille plus importante que celles du groupe contrôle. Cette différence est nettement visible lorsque nous comparons les photos B et D de la Figure 24 avec les photos de la Figure 23 dont les grossissements sont différents, et notamment avec la photo C de la Figure 23 (groupe contrôle) dont le grossissement est supérieur à ceux du groupe 7 β -OHchol. Nous constatons que le RE occupe une place importante au sein de la cellule (photos A, C, F). Une telle modification n'est pas observée pour les groupes témoin et contrôle. Sur la photo C, nous observons la présence de vacuoles contenant des structures myéliniques (My). Ce type de structure est également absent dans les groupes témoin et contrôle.

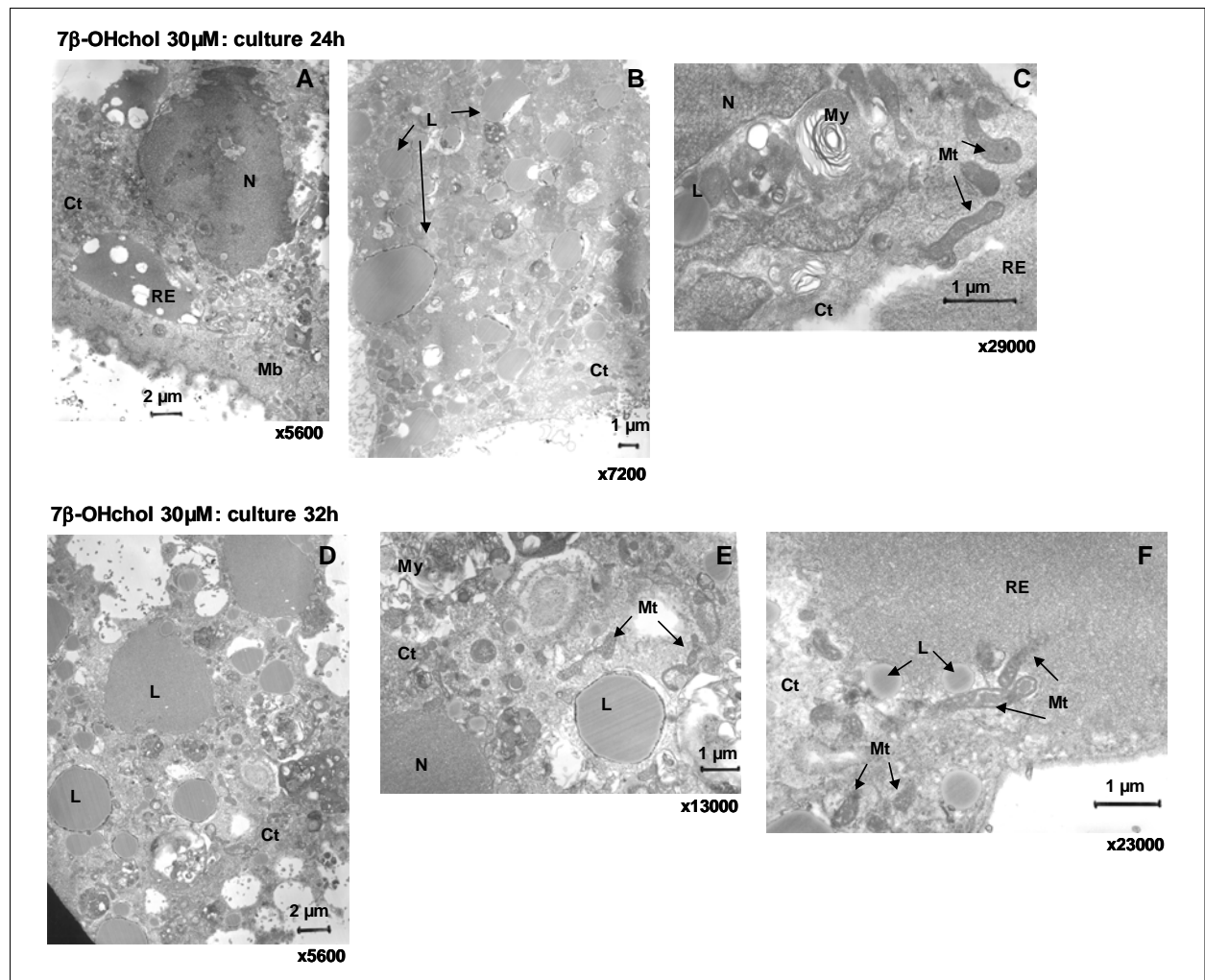


Figure 24 : Analyse par MET - groupe 7 β -OHchol 24 et 32 h.

Les cellules sont traitées pendant 24 (A-C) et 32h (D-F) avec du 7 β -OHchol à 30 μ M. Ct : cytoplasme ; L : vésicules lipidiques ; Mb : membrane plasmique ; Mt : mitochondries ; My : structures myéliniques ; N : noyau ; RE : réticulum endoplasmique. Les grossissements des photos sont indiqués et les barres correspondent à une échelle de taille réelle en μ m. Expérience réalisée sur un échantillon.

Groupe 7 β -OHsito 24 et 32 h (Figure 25 : photos A-F) : les cellules sont traitées avec du 7 β -OHsito à 60 μ M pendant 24 et 32 h. Elles contiennent des vésicules lipidiques (L) de taille importante. Les différences par rapport aux groupes témoin et contrôle sont visibles lorsque nous comparons les photos A B D et E de la Figure 25 avec la photo C de la Figure 23 (groupe contrôle). Il y a également apparition de structures myéliniques (My) au sein du cytoplasme (Ct). Contrairement au groupe du 7 β -OHchol, pour le groupe 7 β -OHsito, nous n'avons pas observé de modifications au niveau du RE.

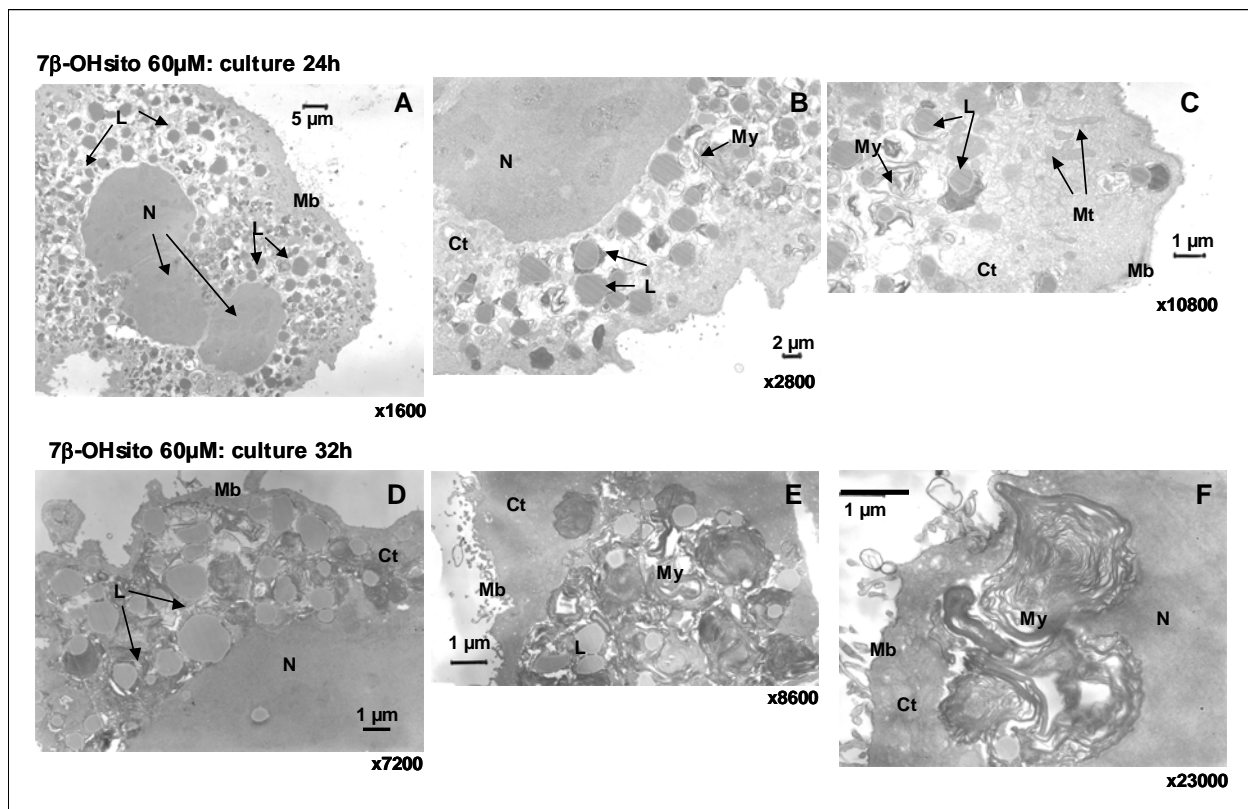


Figure 25 : Analyse par MET - groupe 7β-OHsito 24 et 32 h.

Les cellules sont traitées pendant 24 (A-C) et 32h (D-F) avec du 7β-OHsito à 30 μM. Ct : cytoplasme ; L : vésicules lipidiques ; Mb : membrane plasmique ; Mt : mitochondries ; My : structures myéliniques ; N : noyau ; RE : réticulum endoplasmique. Les grossissements des photos sont indiqués et les barres correspondent à une échelle de taille réelle en μm. Expérience réalisée sur un échantillon.

Selon nos résultats, il est évident que les hydroxystérois provoquent des changements morphologiques au sein des cellules Caco-2. L'augmentation de la taille des vésicules lipidiques, ainsi que l'apparition de structures myéliniques contenues dans des vacuoles sont les caractéristiques communes qui apparaissent suite au traitement avec les deux hydroxystérois. En revanche, le 7β -OHchol perturbe le RE, ce qui est traduit par l'augmentation de son volume.

5. Conclusion

Nos résultats apportent des informations supplémentaires sur les mécanismes qui contrôlent l'apoptose activée par le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol. Au cours de ce travail, nous avons confirmé que le 7 β -OHchol active l'apoptose indépendamment des caspases, ceci étant confirmé par l'activation de l'expression de l'Endo G. Ce facteur provoque la fragmentation de l'ADN indépendamment des caspases. Nous avons également comparé les effets des deux hydroxystéroïls sur l'intégrité des membranes mitochondriale et lysosomiale. Les deux molécules perturbent la membrane mitochondriale. En effet, ils induisent la chute du potentiel membranaire et par conséquent la perméabilisation mitochondriale. Cette perturbation est associée avec la libération dans le milieu cytoplasmique du cyt *c*, qui est un événement plus tardif dans le cas du 7 β -OHchol. La membrane lysosomiale est également perturbée par les deux molécules. Toutefois, l'altération lysosomiale est plus importante et rapide avec le 7 β -OHsito. Un autre facteur, souvent associé à la perturbation mitochondriale, est la production du stress oxydatif. Le 7 β -OHchol en favorise la formation alors que le 7 β -OHsito inhibe la production basale par les cellules Caco-2. La perte du potentiel membranaire ainsi que le taux des corps apoptotiques sont inhibés par le co-traitement avec la vitamine C, ce qui suggère l'importance de la mitochondrie dans l'initiation de l'apoptose. La vitamine C piège les radicaux oxygénés avant qu'ils initient la peroxydation lipidique en protégeant ainsi les biomembranes et les lipoprotéines (Delattre et coll., 2005). Enfin, nous avons déterminé que la perturbation mitochondriale est indépendante des protéines de la famille Bcl-2, la protéine pro-apoptotique Bax et la protéine anti-apoptotique Bcl-2.

Des résultats supplémentaires et préliminaires obtenus suite à l'analyse morphologique des cellules Caco-2 par microscopie électronique, ont fourni de nouveaux éléments sur l'activité des deux hydroxystéroïls. Suite aux deux traitements, nous avons observé l'augmentation de la taille des vésicules lipidiques ainsi que l'apparition de structures myéliniques contenues dans des vacuoles. De plus, le 7 β -OHchol provoque des perturbations ultrastructurales du RE. Cette structure augmente de taille et occupe une place importante dans le cytoplasme en comparaison avec les cellules traitées au 7 β -OHsito et les groupes témoin ou contrôle.

CHAPITRE III

Perturbation du métabolisme des polyamines et son implication dans l'apoptose induite par le 7 β -hydroxycholestérol et le 7 β -hydroxysitostérol dans les cellules cancéreuses coliques humaines

1. Résumé

Notre étude a visé à comparer les effets du 7β -OHSito et du 7β -OHchol sur le métabolisme des polyamines et sa relation avec l'apoptose. Quand les cellules cancéreuses coliques humaines sont traitées par le 7β -OHSito et par le 7β -OHchol à des concentrations permettant une inhibition similaire de la prolifération cellulaire, les deux hydroxystéroïls inhibent l'activité des enzymes de la voie de biosynthèse des polyamines et provoquent une diminution de la concentration intracellulaire des polyamines. Conjointement, nous observons une activation du catabolisme des polyamines comme l'atteste l'augmentation de la concentration de N¹-acétyl spermidine. Le traitement des cellules par une polyamine exogène, la putrescine, inhibe la mort cellulaire induite par le 7β -OHchol, mais pas celle provoquée par le 7β -OHSito. Le MDL 72527, qui est un inactivateur spécifique de la polyamine oxydase (PAO), une enzyme clé de la voie catabolique des polyamines, favorise les effets apoptotiques du 7β -OHchol par le biais de l'augmentation de la concentration intracellulaire en N¹-acétyl spermidine. A l'opposé, le MDL 72527 ne modifie pas les effets apoptotiques du 7β -OHSito. Ces résultats indiquent que seules les perturbations du métabolisme des polyamines provoquées par le 7β -OHchol, mais non par le 7β -OHSito, semblent être liés à la mort cellulaire.

2. Introduction

Les polyamines sont des composants naturels de la cellule qui accomplissent une multitude de fonctions et sont essentielles pour la vie cellulaire. Elles interviennent en tant que médiateurs de la croissance et de la division cellulaire. Parmi les cibles fonctionnelles des polyamines, nous citons les acides nucléiques, certaines protéines et des lipides constitutifs de la membrane chargés négativement (Catros-Quemener et coll., 1999; Wallace, 2004). Les polyamines sont de petites molécules polycationiques que nous détectons dans la majorité des cellules animales et végétales. Elles ont été mises en évidence pour la première fois au XVII^e siècle dans le liquide séminal humain. Parmi les polyamines identifiées, les plus importantes sont : la putrescine, la spermidine et la spermine. Il existe également une autre polyamine, la cadavérine ou 1,5-pentadianemine mais elle n'est présente dans l'organisme qu'occasionnellement et provient principalement de la flore bactérienne (Seiler, 1986; Gerner et Meyskens, 2004). La structure des principales polyamines est représentée sur la Figure 26.

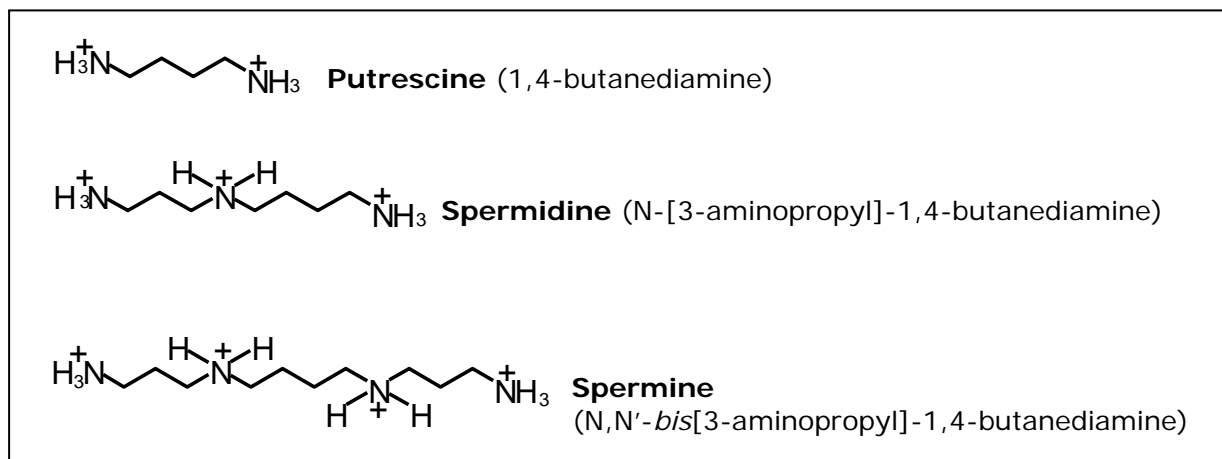


Figure 26 : Structure des principales polyamines.

Pour les cellules eucaryotes, les polyamines peuvent soit provenir du milieu extracellulaire soit être synthétisées au sein de la cellule. Le mécanisme d'importation des polyamines exogènes n'est pas encore défini (Milovic, 2001). La biosynthèse se réalise au niveau du cytoplasme et le cycle métabolique est caractérisé par un équilibre entre la biosynthèse et le catabolisme. La phase de synthèse consiste à la formation de la putrescine, spermidine et spermine *via* l'action des enzymes spécifiques. La putrescine se forme suite à la décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC) (Figure 27).

Pour les cellules de mammifères, la voie de décarboxylation de l'ornithine semble être la voie exclusive de la synthèse *de novo* des polyamines (Seiler et coll., 1998; Urdiales et coll., 2001).

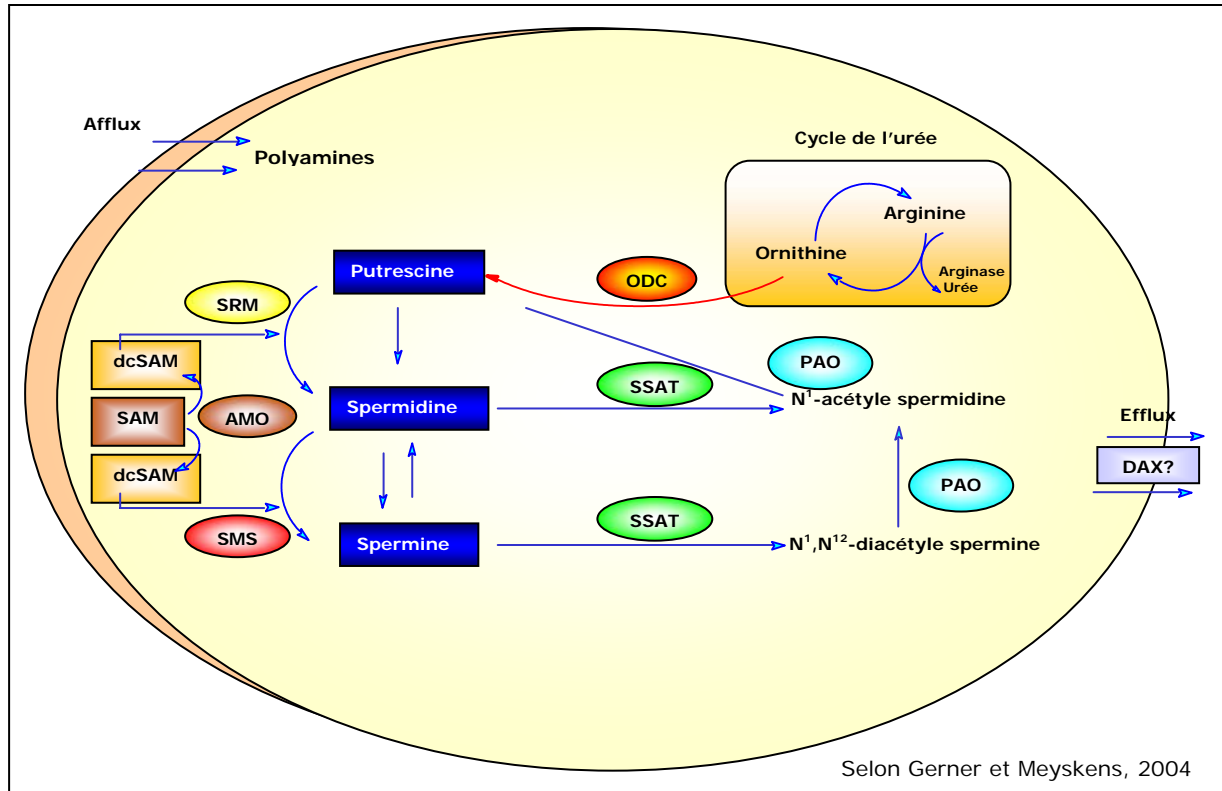


Figure 27 : Métabolisme des polyamines : Biosynthèse et Catabolisme.

L'ornithine est produite à partir de l'arginine au cours du cycle de l'urée. La décarboxylation de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (ODC) produit la putrescine. La décarboxylation de la S-adénosyl méthionine (SAM, dcSAM) en présence de la S-adénosyl méthionine décarboxylase (AdoMetDC, AMD) fournit les groupes aminopropyl nécessaires pour la synthèse de la spermidine et de la spermine en présence de la spermidine synthase (SRM) et spermine synthase (SMS). La spermidine/spermine N¹-acétyl transférase (SSAT) est une aminopropyl acétyl transférase qui favorise la mono-acétylation de la spermidine et la mono-ou di-acétylation de la spermine. Les diamines et les polyamines acétylées peuvent servir en tant que substrats d'un transporteur de diamines (DAX) pour être éliminées dans l'urine. Elles sont également les substrats naturels d'une oxydase dépendante des flavines, la polyamine oxydase (PAO) qui intervient dans le catabolisme et catalyse leur conversion en spermidine et putrescine.

Ce qui caractérise le métabolisme des polyamines, c'est sa régulation très sophistiquée et toute perturbation peut conduire au dysfonctionnement et à la mort cellulaires. En dehors des polyamines, des facteurs de croissance et des hormones régulent l'activité des enzymes clés, aussi bien de la voie de la biosynthèse que de la voie du catabolisme des polyamines (Babbar et Gerner, 2003). Il existe de nombreuses études qui montrent que des molécules interférant avec le métabolisme des polyamines sont des médicaments anticancéreux potentiels (Wallace et Fraser, 2004). Toute approche thérapeutique consiste à réduire l'apport des polyamines dans les cellules tumorales en combinant l'inhibition des voies de biosynthèse intracellulaire et la réduction des sources exogènes (Seiler, 1991). Toutefois, il existe de nombreux résultats contradictoires sur la relation entre le métabolisme des polyamines et la mort cellulaire programmée. Dans certaines situations, l'apoptose peut s'activer suite à la déplétion sélective du contenu en polyamines dans la cellule (Seiler, 2003). La déplétion des polyamines peut être aussi obtenue par l'utilisation d'analogues structuraux qui entrent en compétition et inhibent le fonctionnement régulateur des celles-ci (Porter et coll., 1987). A l'opposé, il existe des travaux qui décrivent que l'activation de l'apoptose peut survenir suite à une augmentation de la concentration en polyamines ou à la surexpression des enzymes de la biosynthèse (Poulin et coll., 1995; Erez et coll., 2002). Il existe des relations claires entre les polyamines endogènes et les voies et facteurs qui contrôlent l'apoptose (Pignatti et coll., 2004; Seiler et Raul, 2005).

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les mécanismes impliqués dans les propriétés pro-apoptotiques des deux hydroxystérols, nous nous sommes intéressés à leur impact sur les voies intracellulaires qui sont liées à l'apoptose et au métabolisme des polyamines.

3. Resultats : PUBLICATION n° 3

Perturbation of polyamine metabolism and its relation to cell death in human colon cancer cells treated by 7 β -hydroxycholesterol and 7 β -hydroxysitostérol

S Roussi, F Gossé, D Aoudé-Werner, X Zhang, P Geoffroy, M Miesch, E Marchioni, F Raul.
Int J Oncol 2006; 29:1549-54



[Ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?itool=abstractplus&db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=abstractplus&list_uids=17088995

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

4. Résultats complémentaires

L'activation de la voie des protéines MAPK est essentielle pour la signalisation cellulaire en réponse aux divers *stimuli* tels que le dommage de l'ADN, les cytokines, la lumière UV, le stress oxydatif, les médicaments anticancéreux etc. (Cobb et Goldsmith, 1995). Pourtant le rôle et l'implication de ces protéines dans la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire restent ambigus et semblent être dépendants du système cellulaire et du type du *stimulus*. L'activation des protéines ERK1/2 est souvent associée à la survie et différenciation cellulaires (Wang et coll., 1998), alors que dans certains cas leur phosphorylation est nécessaire pour un déclenchement de l'apoptose (Wang et coll., 2000). De manière similaire, la phosphorylation des protéines JNK et p38 MAPK peut affecter soit la prolifération soit la mort cellulaire (Liu et coll., 1996; Lee et coll., 1998). Il existe de nombreuses études qui ont mis en évidence l'implication des polyamines dans l'expression et l'activation des protéines MAPK, mais la relation exacte reste à élucider (Chen et coll., 2003; Hu et coll., 2005b). Les protéines MAPK peuvent s'activer aussi bien suite à une augmentation de la concentration des polyamines (Manni et coll., 1997) qu'à une réduction de celles-ci (Ray et coll., 1999).

Etant donné que les hydroxystérols affectent le métabolisme des polyamines et induisent l'apoptose, nous avons souhaité déterminer s'il y a une relation entre le métabolisme des polyamines et la mort programmée par le biais des protéines MAPK. Les cellules sont cultivées en absence et en présence des hydroxystérols pendant 24 et 48 h et la quantité des protéines ERK1/2 et JNK, phosphorylées et totale est mesurée. Les résultats obtenus sont représentés par la Figure 28. Les hydroxystérols ne modifient ni l'expression des protéines totales ni leur état de phosphorylation par rapport aux cellules contrôles.

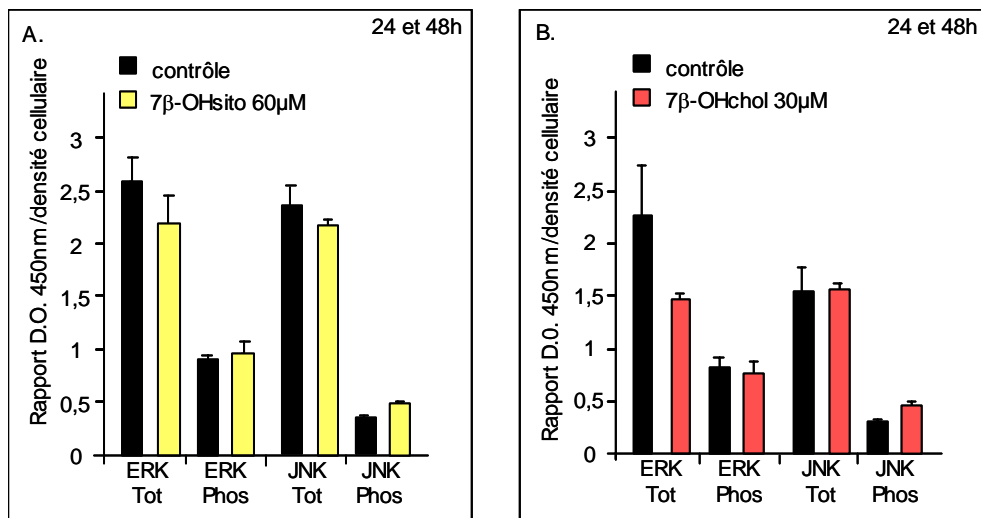


Figure 28 : Expression intracellulaire des protéines ERK et JNK : totales et phosphorylées.

5. Conclusion

Cette étude démontre que le 7β -OHsito et le 7β -OHchol influent sur la voie de la biosynthèse des polyamines. Toutefois, les deux molécules présentent des effets différents. Le 7β -OHsito inhibe l'activité des deux enzymes : ODC et AdoMetDC. La diminution de leur activité ne semble pas être associée directement à l'inhibition de la croissance cellulaire induite par cet hydroxystérol, compte tenu du fait que la putrescine exogène n'a pas conduit au rétablissement de la croissance cellulaire. En revanche, le 7β -OHchol inhibe uniquement l'activité de l'AdoMetDC et l'addition de la putrescine exogène a permis de réduire le taux de corps apoptotiques formés. Il est ainsi possible que la perturbation du métabolisme des polyamines provoquée par le 7β -OHchol soit directement liée à l'induction de l'apoptose. Les deux hydroxystérols agissent également sur le catabolisme des polyamines en favorisant son activation par la synthèse de N^1 -acétyl spermidine. L'utilisation du MDL 72527, l'inactivateur de la PAO qui est l'enzyme clé du catabolisme, a permis de différencier l'effet de deux hydroxystérols. En effet, le nombre des corps apoptotiques et la concentration de la N^1 -acétyl spermidine augmentent lorsque cet inhibiteur est utilisé uniquement en combinaison avec le 7β -OHchol. L'implication des formes acétylées accumulées suite à l'inactivation de la PAO pourrait être à l'origine de l'augmentation du taux des corps apoptotiques au cours du traitement avec le 7β -OHchol.

Parmi les protéines de la machinerie cellulaire qui contrôlent aussi bien la prolifération que la mort cellulaires, et qui sont souvent associées aux perturbations du métabolisme des polyamines, il y a les protéines kinases MAPK : ERK1/2 et JNK. Leur implication dans les divers processus a lieu suite à leur phosphorylation. Les deux hydroxystérols, n'influent pas sur l'état de phosphorylation de ces protéines en excluant ainsi toute implication de celles-ci dans la perturbation du métabolisme des polyamines et la mort cellulaire.

DISCUSSION GENERALE

Dans le premier chapitre, nous avons montré que les deux hydroxystérols inhibent la croissance cellulaire mais les cellules sont plus sensibles face au 7 β -OHchol. En effet, le même taux d'inhibition de la croissance cellulaire est observé pour une concentration du 7 β -OHsito deux fois supérieure à celle du 7 β -OHchol (60 et 30 μ M respectivement). Cette inhibition de la croissance est liée à l'activation de l'apoptose, confirmée par la fragmentation de l'ADN et l'augmentation du taux des corps apoptotiques produits. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes susceptibles d'être activés en amont de la fragmentation de l'ADN. Nous avons montré que la caspase effectrice -3 est activée uniquement par le 7 β -OHsito alors que la caspase initiatrice -9 est activée par les deux hydroxystérols, mais plus tardivement avec le 7 β -OHchol. L'inhibition des caspases par l'utilisation de l'inhibiteur à large spectre d'action, le Z-VAD.fmk, a pour conséquence l'arrêt de la mort cellulaire provoquée spécifiquement par le 7 β -OHsito. Ceci démontre que l'apoptose activée par le 7 β -OHsito est dépendante des caspases. Pour le 7 β -OHchol, nous avons cherché à déterminer si l'apoptose activée par cette molécule est indépendante des caspases.

Dans le deuxième chapitre nous avons pu montrer que d'une part, le 7 β -OHchol provoque l'expression d'une protéine mitochondriale, l'endonucléase G. Cette protéine est liée à la voie apoptotique indépendante des caspases. D'autre part, nos résultats démontrent que les deux hydroxystérols perturbent la membrane mitochondriale, comme l'indique la chute de son potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$). La perturbation mitochondriale caractérise la voie apoptotique intracellulaire ou mitochondriale. La perte du $\Delta\Psi_m$ est souvent associée à l'ouverture de canaux qui permettent la libération du cytochrome *c* dans le cytoplasme. Le cytochrome *c* est responsable de l'activation de la caspase majeure de la voie mitochondriale, la caspase-9. Les deux hydroxystérols conduisent ainsi à la libération du cytochrome *c* avec une cinétique plus tardive pour le 7 β -OHchol. Ceci est en accord avec les résultats obtenus sur l'activité spécifique de la caspase-9, qui atteint également sa valeur maximale tardivement pour le 7 β -OHchol. Un autre paramètre souvent associé à la perturbation de la membrane mitochondriale est la production des ROS. Malgré l'altération de la membrane mitochondriale par les deux molécules, le 7 β -OHchol augmente le taux basal de production des ROS dans les cellules alors que le 7 β -OHsito l'inhibe.

Ainsi le stress oxydatif pourrait être impliqué dans l'apoptose induite par le 7 β -OHchol comme l'indique le co-traitement avec la vitamine C, un antioxydant connu, qui conduit à la diminution du taux des corps apoptotiques produits par le 7 β -OHchol. Cependant, le co-traitement de la vitamine C avec les hydroxystérols diminue également le taux des corps apoptotiques produits chez les cellules traitées avec le 7 β -OHsito, mais la variation est moins importante que celle pour les cellules traitées avec le 7 β -OHchol. De plus, il est important de noter que le co-traitement avec la vitamine C empêche la chute du $\Delta\Psi_m$ pour les deux molécules utilisées. Ceci suggère que dans le cas des deux hydroxystérols, la perturbation de la membrane mitochondriale est un processus majeur dans l'activation de l'apoptose alors que la voie apoptotique activée suite à cette altération diverge en fonction de l'hydroxystérol utilisé. La perturbation mitochondriale, ainsi que la production du stress oxydatif, peuvent également être liés à la perturbation d'autres organites tels que les lysosomes. La perturbation lysosomiale peut être révélée par l'altération de la membrane. Nous avons constaté que les deux hydroxystérols agissent sur l'intégrité membranaire des lysosomes, le 7 β -OHsito étant plus actif dans ce processus que le 7 β -OHchol.

Enfin, nous avons souhaité déterminer si d'autres facteurs interviennent dans l'apoptose, et plus précisément les facteurs qui agissent en amont de la mitochondrie. Nous avons ainsi mesuré la variation du taux d'expression des deux protéines de la famille Bcl-2, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et la protéine pro-apoptotique Bax. Ces deux protéines régulent la perméabilisation mitochondriale et le rapport de leur taux d'expression détermine l'avancement de la cellule vers l'apoptose ou la survie. Dans le cas des deux hydroxystérols, aucune variation n'est détectée laissant ainsi supposé que l'apoptose est indépendante des protéines Bcl-2 et Bax.

Dans la mesure où les polyamines (putrescine, spermidine et spermine) sont d'importants régulateurs de la croissance et de la mort cellulaire (Seiler et Raul, 2005), il nous a semblé important d'étudier les effets des deux hydroxystérols sur le métabolisme des polyamines et nous avons essayé de déterminer s'il existait une relation avec l'activation du processus apoptotique. Nos résultats montrent que les deux molécules perturbent le métabolisme des polyamines en diminuant leur taux intracellulaire. De plus, le 7 β -OHsito inhibe l'activité des deux enzymes clés de la biosynthèse des polyamines : l'ODC et l'AdoMetDC, alors que le 7 β -OHchol perturbe uniquement l'activité de l'AdoMetDC.

Cette inhibition de la biosynthèse est renforcée par l'activation du catabolisme des polyamines, confirmée par l'accumulation intracellulaire du dérivé acétylé N¹-acétyl spermidine, qui est un des marqueurs de l'activité catabolique. En ce qui concerne la relation entre la perturbation du métabolisme des polyamines et l'apoptose, la putrescine exogène ajoutée lors du traitement par les hydroxystéroïls empêche l'inhibition de la croissance cellulaire induite par le 7β-OHchol, mais reste sans effets lors du traitement avec le 7β-OHsito. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la PAO, qui est une enzyme clé du catabolisme, favorise les effets pro-apoptotiques du 7β-OHchol. Enfin, l'addition de N¹-acétyl spermidine au milieu extracellulaire, favorise uniquement les effets antiprolifératifs du 7β-OHchol. Nous pouvons ainsi déduire que la perturbation du métabolisme des polyamines pourrait être à un facteur impliqué directement dans l'activation de l'apoptose induite par le 7β-OHchol mais pas dans l'activation de l'apoptose par le 7β-OHsito. Toutefois, les deux hydroxystéroïls altèrent le métabolisme des polyamines indépendamment des protéines kinases MAPK dont leur relation avec les polyamines est établie et dépend du modèle expérimental.

CONCLUSION GENERALE

L'ensemble de nos résultats montre que les propriétés biologiques du 7 β -OHchol et du 7 β -OHsito divergent, et ceci malgré leur forte similarité structurale. Les travaux de Maguire et coll. (2003) sur les macrophages U937 ont montré que les deux hydroxysterols présentent la même cytotoxicité mais à des concentrations différentes. Les hydroxyphytostérols étant moins actifs que les oxydes du cholestérol. De façon similaire, Adcox et coll. (2001) ont comparé les effets des oxydes du cholestérol et des oxydes des phytostérols en mélange sur des cellules dérivées des macrophages (C57BL/6), et ont démontré que la cytotoxicité des oxydes des phytostérols était moins importante que celle des oxydes du cholestérol.

Il existe un grand nombre de travaux qui sont focalisés sur les propriétés cytotoxiques et pro-athérogènes des oxydes du cholestérol (Schroepfer, 2000). Une grande partie parmi eux est consacrée aux propriétés de ces molécules en tant que ligands des récepteurs spécifiques du métabolisme du cholestérol. En effet, les oxydes du cholestérol sont des régulateurs potentiels de ce métabolisme. Ils sont reconnus par les protéines OBP ou le récepteur LXR (Olkkonen et Levine, 2004). Cette interaction peut conduire à la régulation du métabolisme du cholestérol et notamment à l'inhibition de l'enzyme clé, la HMG-CoA réductase. Une telle inhibition peut provoquer la diminution de la biodisponibilité du cholestérol pour la croissance cellulaire en dirigeant les cellules vers la mort apoptotique. Ceci a déjà été démontré en utilisant des inhibiteurs spécifiques de la HMG-CoA réductase telle que la lovastatine (Rabkin et Kong, 2003). Il est ainsi possible que le 7 β -OHchol agisse sur les cellules Caco-2 par le biais de cette voie mais, il reste à le démontrer car il n'existe aucune donnée sur une telle activité.

En ce qui concerne le 7 β -OHsito, il existe peu de travaux qui se sont basés sur ses propriétés et nous ignorons les effets de cette molécule sur le métabolisme du cholestérol. En revanche, le β -sitostérol n'a aucun effet négatif sur l'activité de l'HMG-CoA réductase (Berger et coll., 2004). Il a été démontré que le groupement alkyl additionné sur la chaîne latérale du cholestérol pour la formation des phytostérols, prévient toute interaction avec les sites de l'HMG-CoA réductase responsables de la rétro-régulation de son activité (Kakis et Kuksis, 1984).

Dans le cas de l'apoptose et de la perturbation mitochondriale provoquées par le 7 β -OHchol, il existe de nombreuses études qui ont démontré que ce composé exerce ses effets pro-athérogènes et cytotoxiques en agissant sur l'intégrité de la membrane mitochondriale de diverses lignées cellulaires (Lemaire-Ewing et coll., 2005; Ryan et coll., 2005). En revanche, rien n'est démontré pour le 7 β -OHsito. La perte de l'intégrité mitochondriale, traduite par la chute du potentiel membranaire provoquée par les deux hydroxystérols à des stades précoces du processus apoptotique, peut être interprétée comme un évènement précoce et spontané. Selon nos résultats, la chute du potentiel membranaire mitochondrial diminue dans le temps et en plus, les protéines de la famille Bcl-2, Bax et Bcl-2 nécessaires pour le maintien du signal pro-apoptotique sont absentes.

L'absence d'implication des protéines Bax et Bcl-2 peut être expliquée par la forme mutante et non fonctionnelle de la protéine p53 chez les cellules Caco-2 (Karczewski et coll., 2000). Les tumeurs peuvent devenir résistantes à un traitement suite à la modification du taux d'expression ou de la fonction des protéines régulatrices de l'apoptose. La protéine p53 est un facteur de transcription régulant l'expression de multiples facteurs pro-apoptotiques : des inhibiteurs de la progression du cycle cellulaire, des régulateurs de sa propre activité, des médiateurs du stress oxydatif, des composants de la voie extrinsèque d'apoptose, des activateurs des caspases, des membres de la famille Bcl-2 (Yu et Zhang, 2005). Elle peut également interagir directement avec la membrane mitochondriale et induire la perméabilisation mitochondriale (Zamzami et Kroemer, 2005). Pour les cellules Caco-2, la protéine p53 présente des mutations au niveau de la région qui se lie à l'ADN. De plus, la partie C-terminale qui est responsable de l'oligomérisation de la protéine est tronquée en empêchant ainsi sa fixation aux simples brins d'ADN ou ARN (Karczewski et coll., 2000). Etant donné l'importance de ces mutations, il est possible que p53 n'intervienne pas dans l'apoptose des cellules Caco-2. De plus, les deux hydroxystérols induisent l'apoptose indépendamment de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax, ce qui pourrait s'expliquer en partie par l'absence d'une protéine p53 fonctionnelle.

La perturbation mitochondriale est souvent associée à la production du stress oxydatif. Le rôle du stress oxydatif dans la cancérogenèse reste controversé. Les ROS peuvent agir aussi bien en tant que molécules pro-apoptotiques (England et Cotter, 2005; Valko et coll., 2005) que facteurs pro-cancérogènes (Behrend et coll., 2003). Les propriétés oxydatives du 7 β -OHchol sont largement décrites, toujours dans le cadre de ses propriétés pro-athérogènes (Monier et coll., 2003). En revanche, il n'existe aucune étude qui décrit le pouvoir pro-oxydatif du 7 β -OHsito. Selon un travail réalisé avec un mélange des oxydes des phytostérols, il a été suggéré que ces molécules exercent leur effet cytotoxique indépendamment du stress oxydatif (Ryan et coll., 2005). Notre étude montre que le 7 β -OHsito non seulement n'induit pas la production du stress oxydatif, mais il possède plutôt des propriétés anti-oxydantes en diminuant le taux de production basal des ROS par les cellules Caco-2.

En ce qui concerne la vitamine C et son action anti-oxydante, il semblerait dans notre étude que cette molécule possède un effet protecteur plus global sur la mitochondrie contre l'action des hydroxystérols. En effet, la vitamine C protège la mitochondrie contre la perméabilisation de sa membrane par les deux hydroxystérols. La vitamine C piège efficacement les radicaux oxygénés en protégeant ainsi les membranes des organites de la peroxydation lipidique (Delattre et coll., 2005).

La perte de l'intégrité de la membrane lysosomiale peut être à l'origine de l'apoptose ou d'autres types de la mort cellulaire (Guicciardi et coll., 2004; Erdal et coll., 2005). Plusieurs *stimuli* peuvent provoquer la rupture de la membrane lysosomiale, en conduisant ainsi à la libération des médiateurs qui peuvent interagir avec la mitochondrie pour activer le processus apoptotique (Zhao et coll., 2003; Fehrenbacher et Jäättelä, 2005). La membrane lysosomiale est perturbée par les deux hydroxystérols. En ce qui concerne le 7 β -OHchol, il est démontré que les lipoprotéines oxydées qui contiennent comme majeurs produits le 7 β -OHchol et le 7-cétocholestérol, provoquent chez les macrophages la déstabilisation lysosomiale et l'induction de l'apoptose (Yuan et coll., 2000). Cependant, nous ignorons l'effet du 7 β -OHchol à l'état isolé. Il n'existe aucune donnée également concernant l'effet du 7 β -OHsito sur les lysosomes. Nous constatons uniquement que dans notre étude, l'effet du 7 β -OHsito sur la rupture de l'intégrité membranaire des lysosomes est plus rapide et plus importante que celui du 7 β -OHchol.

Les perturbations mitochondriales et lysosomiales peuvent être expliquées par un effet direct des deux hydroxystérols sur la structure membranaire. Des travaux ont effectivement rapporté une forte interaction des oxydes du cholestérol sur les bicouches phospholipidiques des membranes. En effet, l'insertion des oxydes du cholestérol dans ces bicouches phospholipidiques provoque des modifications structurales pouvant expliquer l'activité cytotoxique de ces molécules (Massey, 2000; Massey et Pownal, 2006). Pour le 7 β -OHsito, il n'existe aucune preuve de son action sur les membranes cellulaires. En revanche, il est généralement admis que les groupements alkyls présents sur la chaîne latérale rendent la molécule plus hydrophobe, ce qui favorise son passage à travers la membrane plasmique, ce qui pourrait provoquer l'excitation de divers enzymes et facteurs liés à la mort cellulaire (Bloch, 1983; Awad et Fink, 2000). Awad et coll. (1996) ont également montré que le β -sitostérol altère les membranes lipidiques. Toutefois, l'existence de différences structurales mineures entre le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol pourrait expliquer les différences au niveau de leur activité biologique. Si les hydroxystérols perturbent les membranes des lysosomes et de la mitochondrie, ils pourraient ainsi favoriser la dégradation de ces organites.

L'analyse par microscopie électronique a fourni quelques éléments supplémentaires sur les effets des hydroxystérols étudiés. Certes, il s'agit d'une étude préliminaire réalisée sur une échelle très restreinte, néanmoins elle permet d'orienter le travail vers de nouvelles hypothèses. L'augmentation de la taille des corps lipidiques suite au traitement avec les deux hydroxystérols pourrait être liée à une perturbation du métabolisme lipidique. En effet, Li et coll. (2005) ont démontré que le 7 β -OHchol perturbe le métabolisme lipidique au sein des macrophages, en induisant l'accumulation de gouttelettes lipidiques. Pourtant il est difficile dans le cadre de notre étude d'attribuer une quelconque relation entre ce métabolisme et la mort cellulaire. Nous avons également constaté que dans les cellules traitées avec le 7 β -OHchol, le RE semble hypertrophié. Le RE est le lieu de synthèse de nombreux composants cellulaires et constitue le lieu de fabrication des stérols (Soccio et Breslow, 2004). Il est possible que ce changement morphologique reflète la perturbation du métabolisme du cholestérol par le 7 β -OHchol.

L'analyse ultrastructurale nous a également permis d'observer que les deux hydroxystéroïdes favorisent l'apparition de structures myéliniques. Miguet-Alfonsi et coll., (2002) ont réalisé une analyse morphologique des macrophages traités au 7β -OHchol par microscopie électronique, et ils ont constaté l'apparition de vacuoles contenant des structures myéliniques. Il semble que de telles structures apparaissent lors de l'inhibition de l'autophagie. L'autophagie est un processus de mort cellulaire qui est caractérisée par l'enveloppement du matériel cellulaire destiné à être renouvelé dans une vacuole entourée d'une double membrane. L'ensemble ainsi formé est appelé autophagosome et permet de "digérer" le matériel cellulaire. L'autophagosome passe en maturation en formant l'autolysosome suite à sa fusion avec les endosomes et/ou les lysosomes (Levine et Klionsky, 2004). L'autophagie est souvent une adaptation cellulaire suite à un stress nutritif et la survie cellulaire en dépend (Edinger et Thompson, 2004). Cependant, si au cours de l'étape de la maturation des autophagosomes, il y a inhibition de leur fusion avec les lysosomes par des agents lysosomotropiques qui perturbent les membranes lysosomiales, telle que la hydroxychloroquine, les cellules accumulent un grand nombre de vacuoles autophagiques contenant des composants cellulaires (Boya et coll., 2005). Cette accumulation est le signal biochimique de l'arrêt de l'autophagie. De plus, l'inhibition de l'autophagie peut favoriser la voie apoptotique avec perméabilisation mitochondriale et activation des caspases. Il reste à déterminer si les vacuoles contenant des structures myéliniques suite aux traitements avec le 7β -OHsito et le 7β -OHchol, correspondent effectivement à celles qui sont à l'origine de l'inhibition de l'autophagie.

Enfin, la diminution du contenu intracellulaire en polyamines et l'inhibition de l'activité enzymatique de la voie de biosynthèse par le 7β -OHsito ne semblent pas être en relation directe avec l'activation de l'apoptose étant donné que l'addition de la putrescine exogène n'a pas influencé l'inhibition de la croissance cellulaire. Contrairement au 7β -OHsito, l'apoptose induite par le 7β -OHchol pourrait être en relation directe avec le métabolisme des polyamines. Les deux hydroxystéroïdes favorisent l'activation du catabolisme, comme celle-ci est confirmée par la synthèse des produits acétylés. Deux enzymes clés sont impliquées dans la voie catabolique : la SSAT et la PAO. En utilisant la spermine et la spermidine comme substrats, la SSAT génère la formation des polyamines acétylés, qui à leur tour constituent les substrats de la PAO (Bolkenius et Seiler, 1981).

L'inactivation de la PAO par l'inhibiteur MDL 72527 est suivie par la diminution du taux de la putrescine et de la spermidine et l'augmentation des polyamines acétylées (Seiler et coll., 2002). La concentration de la N¹-acétyl spermidine et le taux des corps apoptotiques ont augmenté en présence du 7 β -OHchol et du MDL 72527 uniquement. Une telle variation peut être due au fait que le MDL 72527 inactive la PAO, inhibe la dégradation de la N¹-acétyl spermidine et favorise son accumulation dans les cellules. L'accumulation massive des polyamines acétylées peut avoir pour conséquence la déplétion de l'acétyl-CoA disponible conduisant ainsi à la mort cellulaire (Kee et coll., 2004; Babbar et coll., 2006). D'autre part, l'accumulation des polyamines acétylées pourrait affecter l'acétylation des histones par compétition avec l'enzyme acétyl-CoA : spermidine N⁸-acétyl transférase qui intervient dans l'acétylation des histones (Desiderio et coll., 1992). Les protéines kinases MAPK, ERK et JNK ne peuvent pas établir la relation entre l'apoptose et la modulation du métabolisme des polyamines par les hydroxystéroïls.

Le métabolisme du cholestérol contrôle la survie et la mort cellulaire et les polyamines jouent un rôle important dans le contrôle de la croissance cellulaire. Cependant, il n'existe aucune donnée actuellement établissant l'existence d'une interrelation entre ces deux métabolismes. Il n'est pas exclu que le 7 β -OHchol perturbe le métabolisme du cholestérol en affectant conjointement le métabolisme des polyamines. En ce qui concerne le 7 β -OHsito, nous considérons que la perturbation du métabolisme des polyamines n'est pas un événement direct dans l'activation de l'apoptose, mais est un événement associé.

Les mécanismes cellulaires communs et spécifiques activés par le 7 β -OHsito et le 7 β -OHchol mis en évidence au cours de ce travail, sont schématisés dans les Figures 29 et 30.

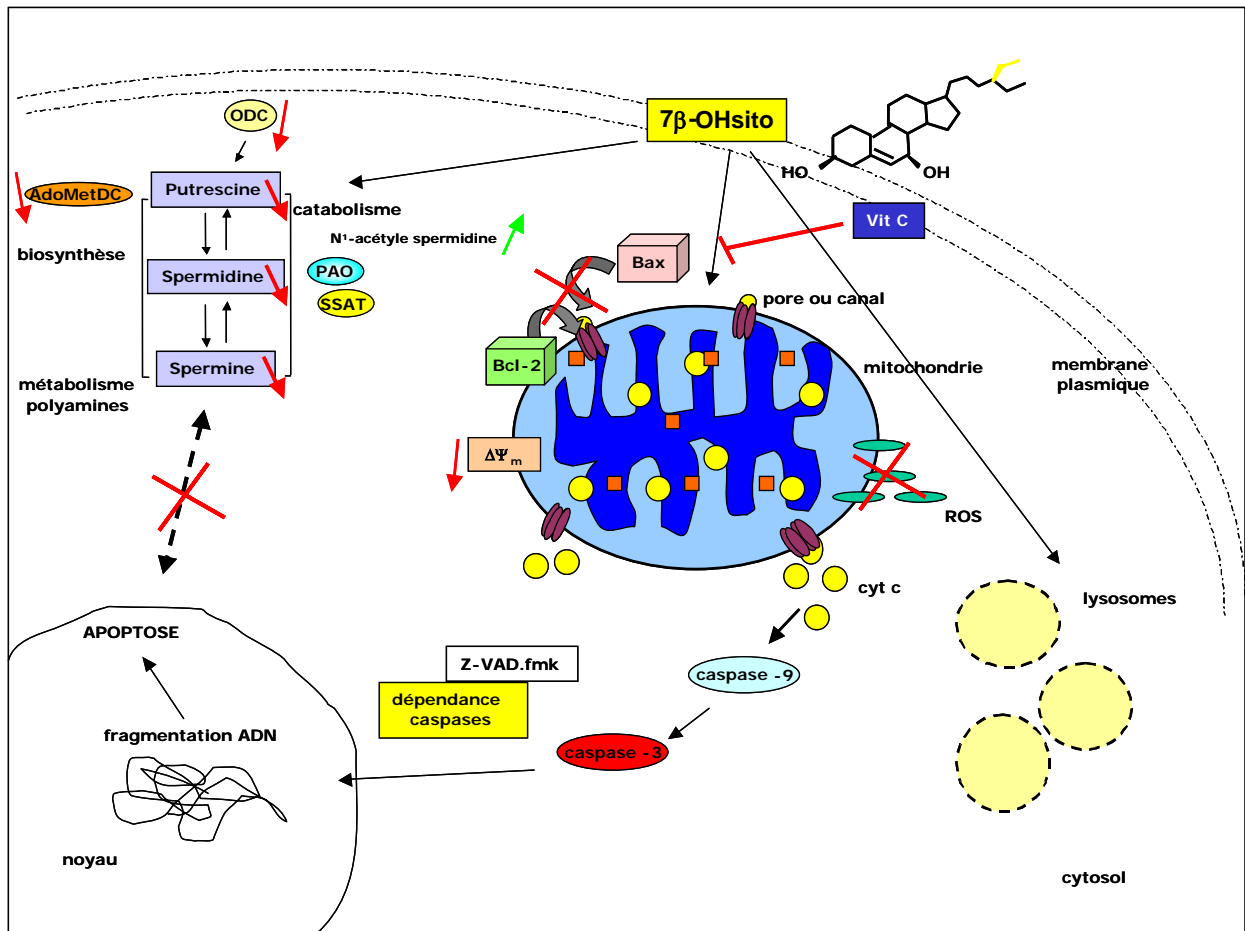


Figure 29 : Mécanismes cellulaires activés par le 7β-OHsitostérol (7β-OHsito).

Abréviations : AdoMetDC : S-adenosyl méthionine décarboxylase ; ODC : ornithine décarboxylase ; PAO : polyamine oxydase ; cyt *c* : cytochrome *c* ; $\Delta\Psi_m$: potentiel électrochimique mitochondrial ; ROS : stress oxydatif ; Vit C : vitamine C.

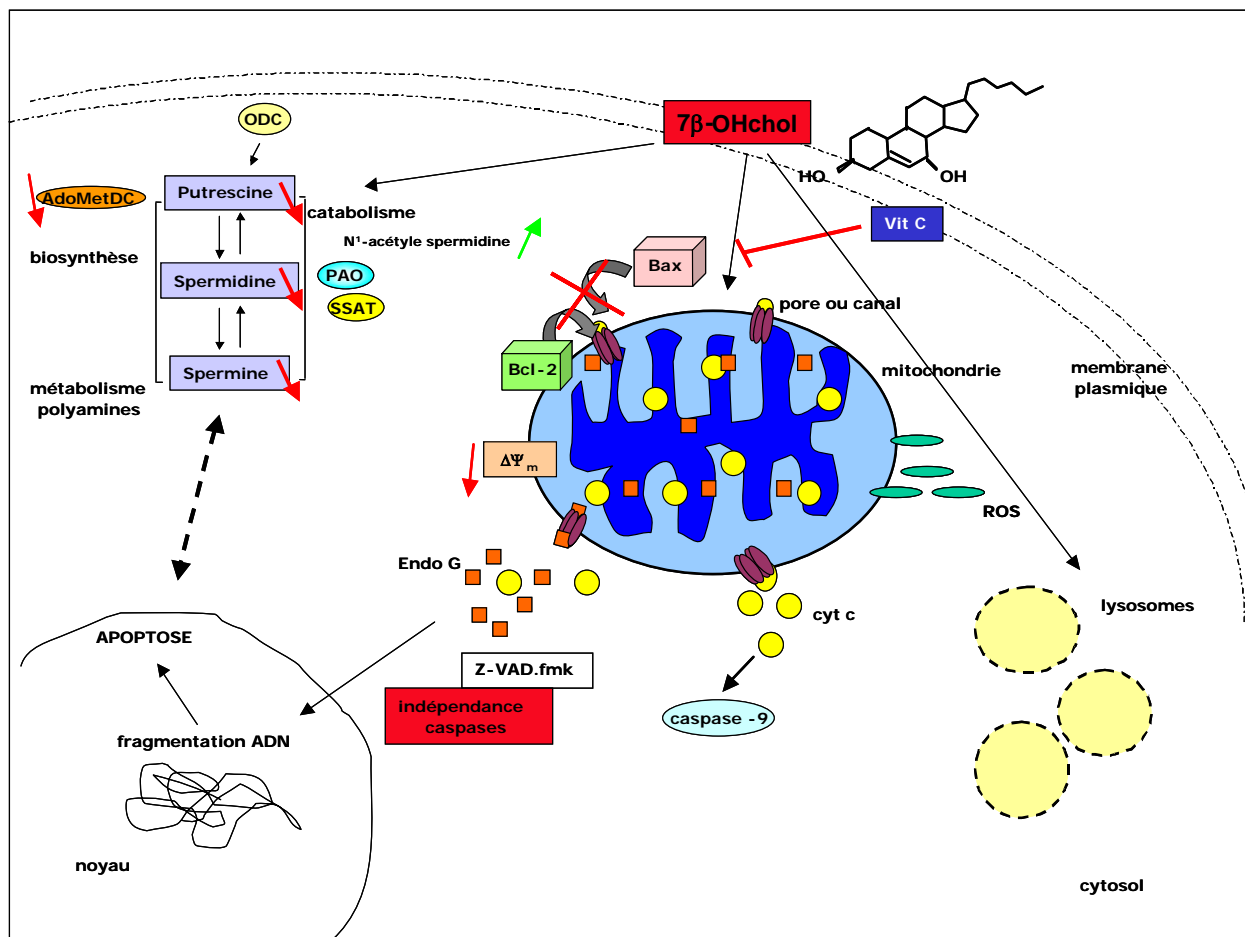


Figure 30 : Mécanismes cellulaires activés par le 7β-OHcholestérol (7β-OHchol).

Abréviations : AdoMetDC : S-adenosyl méthionine décarboxylase ; ODC : ornithine décarboxylase ; PAO : polyamine oxydase ; cyt *c* : cytochrome *c* ; $\Delta\Psi_m$: potentiel électrochimique mitochondrial ; Endo G : endonucléase G ; ROS : stress oxydatif ; Vit C : vitamine C.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- 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**:423-32
- Adcox C**, Boyd L, Oehrl L, Allen J, Fenner G (2001) Comparative effects of phytosterol oxides and cholesterol oxides in cultured macrophage-derived cell lines. *J Agric Food Chem* **49**:2090-95
- Aggarwal BB**, Ichikawa H (2005) Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives. *Cell Cycle* **4**:1201-15
- Amarente-Mendes**, Green DR (1999) The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res* **32**:1053-61
- Angulo AJ**, Romera JM, Ramirez M, Gil A (1997) Determination of cholesterol oxides in dairy products. Effect of storage conditions. *J. Agric Food Chem* **45**:4318-23
- Antonsson B** (2004) Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Mol Cell Biochem* **256**:141-55
- Antonsson B**, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**:370-72
- Antonsson B**, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC (2000) Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345**:271-78
- Ares MP**, Porn-Ares MI, Moses S, Thyberg J, Juntti-Berggren L, Berggren P, Hultgardh-Nilsson A, Kallin B, Nilsson J (2000) 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **153**:23-35
- Armstrong JS** (2006) Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* **28**: 253-60
- Awad AB**, Chen YC, Fink CS, Hennessey T (1996) beta-Sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res* **16**:2797-804

Awad AB, Downie AC, Fink CS (2000) Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by beta-sitosterol treatment of MDA-MB-231 human breast cancer cells in culture. *Int J Mol Med* **5**:541-45

Awad AB, Fink CS (2000) Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr* **130**:2127-30

Awad AB, Fink CS, Williams H, Kim U (2001) In vitro and in vivo (SCID mice) effects of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur J Cancer Prev* **10**:507-13

Awad AB, Roy R, Fink CS (2003) Beta-sitosterol, a plant sterol, induces apoptosis and activates key caspases in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Oncol Rep* **10**:497-500

Awad AB, von Holtz RL, Cone JP, Fink CS, Chen YC (1998) beta-Sitosterol inhibits growth of HT-29 human colon cancer cells by activating the sphingomyelin cycle. *Anticancer Res* **18**:471-73

B

Babbar N, Gerner EW (2003) Polyamines as modifiers of genetic risk factors in human intestinal cancers. *Biochem Soc Trans* **31**:388-92

Babbar N, Gerner E, Casero RA Jr (2006) Induction of spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) by aspirin in Caco-2 colon cancer cells. *Biochem J* **394**:317-24

Behr P, Kupferberg A, Leray C, Urban PF, Mersel M (1991) Effect of 7 beta-hydroxycholesterol on astrocyte primary cultures and derived spontaneously transformed cell lines. Cytotoxicity and cholesterologenesis. *FEBS Lett* **280**:202-06

Behrend L, Henderson G, Zwacka RM (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* **31**:1441-44

Berger A, Jones PJ, Abumweis SS (2004) Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis* **3**:5

Berliner JA, Heinecke JW (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* **20**:707-27

Bey P, Bolkenius FN, Seiler N, Casara P (1985) N-2,3-Butadienyl-1,4 butanediamine derivatives: potent irreversible inactivators of mammalian polyamine oxidase. *J Med Chem* **28**:1-6

- Biasi F**, Leonarduzzi G, Vizio B, Zanetti D, Sevanian A, Sottero B, Verde V, Zingaro B, Chiarotto E, Poli G (2004) Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation. *FASEB J* **18**:693-95
- Bingham S** (2006) The fibre-folate debate in colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc* **65**:19-23
- Bloch KE** (1983) Sterol structure and membrane function. *CRC Crit Rev Biochem* **14**: 47-92
- Bolkenius FN**, Seiler N (1981) Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism. *Int J Biochem* **13**:287-92
- Bouic PJ** (2001) The role of phytosterols and phytosterolins in immune modulation: a review of the past 10 years. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**:471-75
- Bouvier AM**, Remontet L, Jouglu E, Launoy G, Grosclaude P, Buemi A, Tretarre B, Velten M, Dancourt V, Menegoz F, Guizard AV, Mace Lesech J, Peng J, Bercelli P, Arveux P, Esteve J, Faivre J (2004) Incidence of gastrointestinal cancers in France. *Gastroenterol Clin Biol* **28**:877-81
- Boya P**, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**:1025-40
- Breuer O**, Björkhem I (1990) Simultaneous quantification of several cholesterol autoxidation and monohydroxylation products by isotope-dilution mass spectrometry. *Steroids* **55**:185-92
- Briske-Anderson MJ**, Finley JW, Newman SM (1997) The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **214**:248-57
- Brown AJ**, Jessup W (1999) Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142**:1-28
- Brown AJ**, Leong SL, Dean RT, Jessup W (1997) 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* **38**:1730-45
- Brown MS**, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**:331-40

C

- Cathcart MK**, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM (1989) Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol* **142**:1963-69
- Catros-Quemener V**, Chamaillard L, Bouet F (1999) Les polyamines: rôle diagnostique et cible thérapeutique en cancérologie. *Médecine/Sciences* **15**:1078-85
- Chen Q**, Chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM and Almasan A (2003a) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* **10**:323-34
- Chen Y**, Alm K, Vujcic S, Kramer DL, Kee K, Diegelman P, Porter CW (2003b) The role of mitogen-activated protein kinase activation in determining cellular outcomes in polyamine analogue-treated human melanoma cells. *Cancer Res* **63**:3619-25
- Cheng EH**, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ (2003) VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* **301**:513-17
- Cho SG**, Choi EJ (2002) Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol*. **35**:24-7
- Choi YH**, Kong KR, Kim YA, Jung KO, Kil JH, Rhee SH, Park KY (2003) Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. *Int J Oncol* **23**:1657-62
- Christiansen LI**, Lahteenmaki PL, Mannelin MR, Seppanen-Laakso TE, Hiltunen RV, Yliruusi JK (2001) Cholesterol-lowering effect of spreads enriched with microcrystalline plant sterols in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr* **40**:66-73
- Clifton P** (2002) Plant sterol and stanols--comparison and contrasts. Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference? *Atheroscler Suppl* **3**:5-9
- Clifton PM**, Noakes M, Sullivan D, Erichsen N, Ross D, Annison G, Fassoulakis A, Cehun M, Nestel P (2004) Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *Eur J Clin Nutr* **58**:503-09
- Cobb MH**, Goldsmith EJ (1995) How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**:14843-6
- Colles SM**, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM (2001) Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxysterols. *Trends Cardiovasc Med* **11**:131-38
- Cory S**, Huang DC & Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**:8590-607

Cregan SP, Dawson VL, Slack RS (2004) Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* **23**:2785-96

Curtin JF, Donovan M, Cotter TG (2002) Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* **265**:49-72

D

Daly GG, Finocchiaro E T, Richardson T (1983) Characterization of some oxidation products of sitosterol. *J Agric Food Chem* **31**:46-50

Danial NN, Korsmeyer S (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**:206-19

Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D (2003) Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* **39**:73-88

Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW (1994) Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **94**:437-44

De Jong A, Plat J, Mensink RP (2003) Metabolic effects of plant sterols and stanols. *J Nutr Biochem* **14**:362-69

Decker T, Lohmann-Matthes ML (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor activity. *J Immunol Methods* **115**:61-69

Degen WG, Pruijn GJ, Raats JM, van Venrooij WJ (2000) Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Differ* **7**:616-27

Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW (2006) Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim Biophys Acta* **1762**:191-201

Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D (2005) Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques *Editions Tec & Doc, Lavoisier*, pp : **45, 261-65, 475-92** Paris, France

Desiderio MA, Weibel M, Mamont PS (1992) Spermidine nuclear acetylation in rat hepatocytes and in logarithmically growing rat hepatoma cells: comparison with histone acetylation. *Exp Cell Res* **202**:501-506

Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy (1995) Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution mass spectrometry. *Anal Biochem* **225**:73-80

E

- Edinger AL**, Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* **16**:663-69
- Edwards PA**, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* **1529**:103-13
- England K**, Cotter TG (2005) Direct oxidative modifications of signalling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep* **10**:237-45
- Enoksson M**, Robertson JD, Gogvadze V, Bu P, Kropotov A, Zhivotovsky B, Orrenius S (2004) Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem* **279**:49575-78
- Erez O**, Goldstaub D, Friedman J, Kahana C (2002) Putrescine activates oxidative stress dependent apoptotic death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. *Exp Cell Res* **281**:148-56
- Erdal H**, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S (2005) Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:192-97
- 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**:929-35

F

- Fahy DM**, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2004) Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with beta-carotene uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Addit Contam* **21**:42-51
- Fehrenbacher N**, Jaattela M (2005) Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* **65**:2993-5
- Fleury C**, Mignotte B, Vayssiere JL (2002) Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie* **84**:131-41
- Fontana A**, Antoniazzi F, Cimino G, Mazza G, Trivellone E, Zanone B (1992) High resolution NMR detection of cholesterol oxides in spray-dried egg yolk. *J Food Sci* **57**:869-79
- Fontana A**, Antoniazzi F, Clavatta ML, Trivellone E, Cimino G (1993) ¹H-NMR study of cholesterol autooxidation in egg powder and cookies exposed to adverse storage. *J Food Sci* **58**:1286-90

G

- Garrido C**, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* **13**:1423-33
- Gerner EW**, Meyskens FL Jr (2004) Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* **4**:781-92
- Gluecksmann A** (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* **26**:59-86
- Gotow T**, Shibata M, Kanamori S, Tokuno O, Ohsawa Y, Sato N, Isahara K, Yayoi Y, Watanabe T, Leterrier JF, Linden M, Kominami E, Uchiyama Y (2000) Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells. *Cell Death Differ* **7**:666-74
- Gottlieb E**, Oren M (1998) p53 facilitates pRb cleavage in IL-3-deprived cells: novel pro-apoptotic activity of p53. *EMBO J* **17**:3587-96
- Grandgirard A**, Sergiel JP, Nour M, Demaison-Meloche J, Ginies C (1999) Lymphatic absorption of phytosterol oxides in rats. *Lipids* **34**:563-70
- Grandgirard A**, Demaison-Meloche J, Cordelet C, Demaison L (2004a) Incorporation of oxyphytosterols in tissues of hamster. *Reprod Nutr Dev* **44**:599-608
- Grandgirard A**, Martine L, Demaison L, Cordelet C, Joffre C, Berdeaux O, Semon E (2004b) Oxyphytosterols are present in plasma of healthy human subjects. *Br J Nutr* **91**:101-6
- Grandgirard A**, Martine L, Joffre C, Juaneda P, Berdeaux O (2004c) Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxycholesterol derivatives application to a phytosterol-enriched food. *J Chromatogr A* **1040**:239-50
- Grandgirard A**, Martine L, Juaneda P, Cordelet C (2004d) Sitostanetriol is not formed in vivo from sitosterol in the rat. *Reprod Nutr Dev* **44**:609-16
- Green DR**, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**:626-29
- Guardiola F**, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J (1996) Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol* **34**:193-211
- Guardiola F**, Bou R, Boatella J, Codony R (2004) Analysis of sterol oxidation products in foods. *J AOAC Int* **87**:441-66
- Guicciardi MA**, Leist M, Gores GJ (2004) Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**:2881-90

H

- Heinecke JW**, Rosen H, Chait A (1984) Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* **74**:1890-94
- Heinecke JW** (1997) Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **8**:268-74
- Hengartner MO** (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**:770-76
- Henriksen T**, Mahoney EM, Steinberg D Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**:149-59
- Henry-Mowatt J**, Dive C, Martinou JC, James D (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene* **23**:2850-60
- Higgins ME**, Ioannou YA (2001) Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes. *J Lipid Res* **42**:1939-46
- Hiramatsu K**, Rosen H, Heinecke JW, Wolfbauer G, Chait A (1987) Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* **7**:55-60
- Ho PK**, Hawkins CJ (2005) Mammalian initiator apoptotic caspases. *FEBS J* **272**:5436-53
- Ho SS**, Pal S (2005) Margarine phytosterols decrease the secretion of atherogenic lipoproteins from HepG2 liver and Caco2 intestinal cells. *Atherosclerosis* **182**:29-36
- Hu X**, Washington S, Verderame MF, Manni A (2005) Interaction between Polyamines and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in the Regulation of Cell Cycle Variables in Breast Cancer Cells. *Cancer Res* **65**:11026-33
- Hwang PL** (1990) High-affinity binding sites for oxygenated sterols in rat liver microsomes: possible identity with antiestrogen binding sites. *Biochim Biophys Acta* **1033**:154-61
- Hyun JW**, Holl V, Weltin D, Dufour P, Luu B, Bischoff P (2002) Effects of combinations of 7beta-hydroxycholesterol and anticancer drugs or ionizing radiation on the proliferation of cultured tumor cells. *Anticancer Res* **22**:943-48

I

Igel M, Giesa U, Lutjohann D, von Bergmann K (2003) Comparison of the intestinal uptake of cholesterol, plant sterols, and stanols in mice. *J Lipid Res* **44**:533-38

J

Jäättelä M, Cande C, Kroemer G (2004) Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ* **11**:135-36

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ (1999) Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:266-71

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ (1996) An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* **383**:728-31

Ji YH, Moog C, Schmitt G, Bischoff P, Luu B (1990) Monophosphoric acid diesters of 7 beta-hydroxycholesterol and of pyrimidine nucleosides as potential antitumor agents: synthesis and preliminary evaluation of antitumor activity. *J Med Chem* **33**:2264-70

Jiang X, Wang X (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**:87-106

Johnsson L, Dutta PC (2005) Separation of phytosterol oxidation products by combination of different polarity gas chromatography capillary columns. *J Chromatogr A* **1064**:213-17

Jones BA, Gores GJ (1997) Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol* **273**:1174-88

Joyce JA, Baruch A, Chehade K, Meyer-Morse N, Giraudo E, Tsai FY, Greenbaum DC, Hager JH, Bogyo M, Hanahan D (2004) Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* **5**:443-53

Joyce JA, Hanahan D (2004) Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* **3**:1516-619

K

- Kakis G**, Kuksis A (1984) Effect of intravenous infusion of Intralipid, cholesterol, and plant sterols on hepatic cholesterogenesis. *Can J Biochem Cell Biol* **62**:1-10
- Kandutsch AA**, Chen HW (1973) Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by 7alpha-hydroxycholesterol, 7beta-hydroxycholesterol, and 7-ketcholesterol. *J Biol Chem* **248**:8408-17
- Kandutsch AA**, Chen HW (1974) Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain. *J Biol Chem* **249**:6057-61
- Kandutsch AA**, Chen HW, Shown EP (1977) Binding of 25-hydroxycholesterol and cholesterol different cytoplasmic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:2500-03
- Kandutsch AA**, Thompson EB (1980) Cytosolic proteins that bind oxygenated sterols. Cellular distribution, specificity, and some properties. *J Biol Chem* **255**:10813-26
- Kang DH** (2002) Oxidative stress, DNA damage, and breast cancer. *AACN Clin Issues* **13**:540-49
- Kang KA**, Chae S, Lee KH, Park MT, Lee SJ, Lee YS, Hyun JW (2005) Cytotoxic effect of 7beta-hydroxycholesterol on human NCI-H460 lung cancer cells. *Biol Pharm Bull* **28**:1377-80
- Karczewski JM**, Vet JA, Hessels D, Noordhoek J (2000) p53-independent apoptosis induced by menadione in the human colon carcinoma cell line Caco-2. *Ann N Y Acad Sci* **15**:275-78
- Kataoka T**(2005) The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* **25**:31-58
- Kee K**, Vujcic S, Merali S, Diegelman P, Kisiel N, Powell CT, Kramer DL, Porter CW (2004) Metabolic and antiproliferative consequences of activated polyamine catabolism in LNCaP prostate carcinoma cells. *J Biol Chem* **279**:27050-58
- Keshavarzian A**, Zapeda D, List T, Mobarhan S (1992) High levels of reactive oxygen metabolites in colon cancer tissue: analysis by chemiluminescence probe. *Nutr Cancer* **17**:243-49
- Kim KM**, Kim PK, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Kim YM (2002) Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J Biochem Mol Biol* **35**:127-33
- Kim R**, Emi M, Tanabe K (2005) Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage. *Oncol Rep* **14**:595-99
- Kim R**, Emi M, Tanabe K (2006a) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* **57**:545-53

- Kim R**, Emi M, Tanabe K, Murakami S, Uchida Y, Arihiro K (2006b) Regulation and interplay of apoptotic and non-apoptotic cell death. *J Pathol* **208**:319-26
- Kim R**, Emi M, Tanabe K, Uchida Y, Arihiro K (2006c) The role of apoptotic or nonapoptotic cell death in determining cellular response to anticancer treatment. *Eur J Surg Oncol* **32**:269-77
- Kim YM**, Talanian RV, Billiar TR (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **272**:31138-48
- Klionsky DJ**, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**:1717-21
- Kochhar SP** (1983) Influence of processing on sterols of edible vegetable oils. *Prog Lipid Res* **22**:161-88
- Kondo Y**, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S (2005) The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* **5**:726-34
- Koopman BJ**, van der Molen JC, Wolthers BG, Vanderpas JB (1987) Determination of some hydroxycholesterols in human serum samples. *J Chromatogr* **416**:1-13
- Koopman G**, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH (1994) Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**:1415-20
- Korsmeyer SJ**, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* **7**:1166-73
- Kozłowska-Wojciechowska M**, Jastrzebska M, Naruszewicz M, Foltynska A (2003) Impact of margarine enriched with plant sterols on blood lipids, platelet function, and fibrinogen level in young men. *Metabolism* **52**:1373-78
- Krammer PH** (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**:789-95
- Kroemer G**, Jäättelä M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* **5**:886-97
- Kroemer G**, Martin SJ (2005) Caspase-independent cell death. *Nat Med* **11**:725-30

L

- Laffitte BA**, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz D, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P (2001) LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:507-12
- Laitinen S**, Olkkonen VM, Ehnholm C, Ikonen E (1999) Family of human oxysterol binding protein (OSBP) homologues. A novel member implicated in brain sterol metabolism. *J Lipid Res* **40**:2204-11
- Lala DS**, Syka PM, Lazarchik SB, Mangelsdorf DJ, Parker KL, Heyman RA (1997) Activation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by oxysterols. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:4895-900
- Lea LJ**, Hepburn PA, Wolfreys AM, Baldrick P (2004) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 8. Lack of genotoxicity and subchronic toxicity with phytosterol oxides. *Food Chem Toxicol* **42**: 771-83
- Lee LF**, Li G, Templeton DJ, Ting JP (1998) Paclitaxel (Taxol)-induced gene expression and cell death are both mediated by the activation of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK/SAPK). *J Biol Chem* **273**:28253-60
- Lee T**, Chau L (2001) Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**:C709-18
- Lehmann JM**, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM (1997) Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* **272**:3137-40
- Lemaire-Ewing S**, Prunet C, Montange T, Vejux A, Berthier A, Bessede G, Corcos L, Gambert P, Neel D, Lizard G (2005) Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol Toxicol* **21**:97-114
- Levanon D**, Hsieh CL, Francke U, Dawson PA, Ridgway ND, Brown MS, Goldstein JL (1990) cDNA cloning of human oxysterol-binding protein and localization of the gene to human chromosome 11 and mouse chromosome 19. *Genomics* **7**:65-74
- Levine B**, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**:463-77
- Levy E**, Mehran M, Seidman E (1995) Caco-2 cells as a model for intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *FASEB J* **9**:626-35

Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**:491-501

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**:479-89

Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM (2001) Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**:1124-30

Li W, Yuan XM (2004) Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **1030**:427-33

Li W, Hellsten A, Xu LH, Zhuang DM, Jansson K, Brunk UT, Yuan XM (2005) Foam cell death induced by 7beta-hydroxycholesterol is mediated by labile iron-driven oxidative injury: mechanisms underlying induction of ferritin in human atheroma. *Free Radic Biol Med* **39**:864-75

Lim HK, Kang HK, Yoo ES, Kim BJ, Kim YW, Cho M, Lee JH, Lee YS, Chung MH, Hyun JW (2003) Oxysterols induce apoptosis and accumulation of cell cycle at G(2)/M phase in the human monocytic THP-1 cell line. *Life Sci* **72**:1389-99

Ling WH, Jones PJ (1995) Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* **57**:195-206

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell* **87**:565-76

Lizard G, Monier S, Cordelet C, Gesquiere L, Deckert V, Gueldry S, Lagrost L, Gambert P (1999) Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**:1190-200

Lockshin RA and Williams CM (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *J Insect Physiol* **10**:643-49

Lockshin RA and Zakeri Z (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:545-50

Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* **6**:516-24

Lou Z, Chen J (2006) Cellular senescence and DNA repair. *Exp Cell Res* **312**:2641-46

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-75

Lu S, Gough AW, Bobrowski WF, Stewart BH (1996) Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J Pharm Sci* **85**:270-73

Lucken-Ardjomande S, Martinou JC (2005) Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. *C R Biol* **328**:616-31

Lutjohann D (2004) Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. *Br J Nutr* **91**:3-4

Lyons NM, Woods JA, O'Brien NM (2001) alpha-Tocopherol, but not gamma-tocopherol inhibits 7 beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in human U937 cells. *Free Radic Res* **35**:329-39

M

Maguire L, Konoplyannikov M, Ford A, Maguire AR, O'Brien NM (2003) Comparison of the cytotoxic effects of beta-sitosterol oxides and a cholesterol oxide, 7beta-hydroxycholesterol, in cultured mammalian cells. *Br J Nutr* **90**:767-75

Maier G, Bing G, Falken U, Wagner E, Unger C (1999) Antitumor activity and induction of apoptosis by water-soluble derivatives of 7beta-hydroxycholesterol in human colon carcinoma cell lines. *Anticancer Res* **19**:4251-56

Manni A, Wechter R, Gilmour S, Verderame MF, Mauger D, Demers LM (1997) Ornithine decarboxylase over-expression stimulates mitogen-activated protein kinase and anchorage-independent growth of human breast epithelial cells. *Int J Cancer* **70**:175-82

Martinon F, Tschopp J (2004) Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. *Cell* **117**:561-74

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* **281**:2027-31

Massey JB (2000) Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr Opin Lipidol* **17**:296-301

Massey JB, Pownall HJ (2006) Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry* **45**:10747-58

Mathews FS (1985) The structure, function and evolution of cytochromes. *Prog Biophys Mol Biol* **45**:1-56

- Meunier P**, Minaire Y, Lambert R (1988) La digestion *Editions SIMEP* pp: **120-28; 183-91**
2ème édition, Paris, France
- Miettinen TA**, Gylling H (2003) Non-nutritive bioactive constituents of plants: phytosterols. *Int J Vitam Nutr Res* **73**:127-34
- Miettinen TA**, Gylling H (2004) Plant stanol and sterol esters in prevention of cardiovascular diseases. *Ann Med* **36**:126-34
- Miguet-Alfonsi C**, Prunet C, Monier S, Bessede G, Lemaire-Ewing S, Berthier A, Menetrier F, Neel D, Gambert P, Lizard G (2002) Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. *Biochem Pharmacol* **64**:527-41
- Miguet C**, Monier S, Bettaieb A, Athias A, Bessede G, Laubriet A, Lemaire S, Neel D, Gambert P, Lizard G (2001) Ceramide generation occurring during 7beta-hydroxycholesterol- and 7-ketocholesterol-induced apoptosis is caspase independent and is not required to trigger cell death. *Cell Death Differ* **8**:83-99
- Milovic V** (2001) Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**:1021-25
- Milovic V**, Turchanowa L (2003) Polyamines and colon cancer. *Biochem Soc Trans* **31**:381-83
- Moghadasian MH** (2000) Pharmacological properties of plant sterols in vivo and in vitro observations. *Life Sci* **67**:605-15
- Mohamad N**, Gutierrez A, Nunez M, Cocca C, Martin G, Cricco G, Medina V, Rivera E, Bergoc R (2005) Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell* **29**:149-61
- Monier S**, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jurgens G, Negre-Salvayre A, Bessede G, Lemaire-Ewing S, Neel D, Gambert P, Lizard G (2003) Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochem Biophys Res Commun* **303**:814-24
- Moreau RA**, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog Lipid Res* **41**:457-500
- Moreira EF**, Jaworski C, Li A, Rodriguez IR (2001) Molecular and biochemical characterization of a novel oxysterol-binding protein (OSBP2) highly expressed in retina. *J Biol Chem* **276**:18570-78

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM (1984) Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**:357-64

Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**:91-118

N

Nelson TJ, Alkon DL (2005) Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *J Biol Chem* **280**:7377-87

Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**:1028-42

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**:271-79

Normen AL, Brants HA, Voorrips LE, Andersson HA, van den Brandt PA, Goldbohm RA (2001) Plant sterol intakes and colorectal cancer risk in the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. *Am J Clin Nutr* **74**:141-48

O

O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM (2001) Comparative study of the cytotoxicity and apoptosis-inducing potential of commonly occurring oxysterols. *Cell Biol Toxicol* **17**:127-37

O'Callaghan YC, Woods JA, O'Brien NM (2002) Characteristics of 7 beta-hydroxycholesterol-induced cell death in a human monocytic blood cell line, U937, and a human hepatoma cell line, HepG2. *Toxicol In Vitro* **16**:245-51

Ohshima T, Li N, Koizumi (1993) Oxidative decomposition of cholesterol in fish products. *J Am Oil Chem Soc* **70**:595-600

Olkkonen VM, Levine TP (2004) Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time? *Biochem Cell Biol* **82**:87-98

Ostlund RE Jr, Racette SB, Stenson WF (2002) Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutr Rev* **60**:349-59

O'Sullivan AJ, O'callaghan YC, O'brien NM (2005) Differential effects of mixtures of cholesterol oxidation products on bovine aortic endothelial cells and human monocytic U937 cells. *Int J Toxicol* **24**:173-79

Ovesna Z, Vachalkova A, Horvathova K (2004) Taraxasterol and beta-sitosterol: new naturally compounds with chemoprotective/chemopreventive effects. *Neoplasma* **51**:407-14

P

Parkin DM (2004) International variation. *Oncogene* **23**:6329-40

Patel NT, Thompson EB (1990) Human oxysterol-binding protein. I. Identification and characterization in liver. *J Clin Endocrinol Metab* **71**:1637-45

Peng SK, Taylor CB (1984) Cholestérol autoxydation, health and athéroscleriosis. A review on situations in developed countries. *World Rev Nutr Diet* **44**:117-54

Persson L, Holm I, Heby O (1986) Translational regulation of ornithine decarboxylase by polyamines. *FEBS Lett* **205**:175-8

Pignatti C, Tantini B, Stefanelli C, Flamigni F (2004) Signal transduction pathways linking polyamines to apoptosis. *Amino Acids* **27**:359-65

Piironen V, Lampi AM (2004) Occurrence and levels of phytosterols in foods. Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals. *Dutta PC (Ed)*, Marcel Dekker, Inc., NY, USA, pp 1-32

Plat J, Kerckhoffs DA, Mensink RP (2000) Therapeutic potential of plant sterols and stanols. *Curr Opin Lipidol* **11**:571-76

Plat J, Brzezinka H, Lutjohann D, Mensink RP, von Bergmann K (2001) Oxidized plant sterols in human serum and lipid infusions as measured by combined gas-liquid chromatography-mass spectrometry. *J Lipid Res* **42**:2030-38

Plat J, Mensink PP (2001) Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr Metab cardiovasc Dis* **11**:31-40

Poncet D, Boya P, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G (2003) Cytofluorometric quantitation of the apoptosis-induced mitochondrial inner membrane permeabilization. *Apoptosis* **8**:521-30

Ponz de Leon M, Percesepe A (2000) Pathogenesis of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* **32**:807-21

Porter CW, Berger FG, Pegg AE, Ganis B, Bergeron RJ (1987) Regulation of ornithine decarboxylase activity by spermidine and the spermidine analogue N1N8-bis(ethyl)spermidine. *Biochem J* **242**:433-40

Poulin R, Pelletier G, Pegg AE (1995) Induction of apoptosis by excessive polyamine accumulation in ornithine decarboxylase-overproducing L1210 cells. *Biochem J* **311**:723-27

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL (2003) Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* **283**:1-16

Prunet C, Lemaire-Ewing S, Menetrier F, Neel D, Lizard G (2005) Activation of caspase-3-dependent and -independent pathways during 7-ketocholesterol- and 7beta-hydroxycholesterol-induced cell death: a morphological and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol* **19**:311-26

Prunet C, Petit JM, Ecartot-Laubriet A, Athias A, Miguet-Alfonsi C, Rohmer JF, Steinmetz E, Neel D, Gambert P, Lizard G (2006) High circulating levels of 7beta- and 7alpha-hydroxycholesterol and presence of apoptotic and oxidative markers in arterial lesions of normocholesterolemic atherosclerotic patients undergoing endarterectomy. *Pathol Biol (Paris)* **54**:22-32

Q

Quilliot D, Boman F, Creton C, Pelletier X, Floquet J, Debry G (2001) Phytosterols have an unfavourable effect on bacterial activity and no evident protective effect on colon carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* **10**:237-43

R

Rabkin SW, Kong JY (2003) Lovastatin-induced cardiac toxicity involves both oncotic and apoptotic cell death with the apoptotic component blunted by both caspase-2 and caspase-3 inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**:346-55

Raju R, Cruz-Correa M (2006) Chemoprevention of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* **49**:113-25

Rathmell JC, Thompson CB (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* **109**:97-107

Ray RM, Zimmerman BJ, McCormack SA, Patel TB, Johnson LR (1999) Polyamine depletion arrests cell cycle and induces inhibitors p21(Waf1/Cip1), p27(Kip1), and p53 in IEC-6 cells. *Am J Physiol* **276**:C684-91

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* **14**:2819-30

- Riboli E**, Decloître F, Collet-Ribbing C (1996) Alimentation et cancer. Evaluation des données scientifiques. *Lavoisier Tec & Doc*, pp126-34, Paris, France
- Richert L**, Castagna M, Beck JP, Rong S, Luu B, Ourisson G (1984) Growth-rate-related and hydroxysterol-induced changes in membrane fluidity of cultured hepatoma cells: correlation with 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **120**:192-98
- Richmann RA**, Underwood LE, Van Wyk JJ, Voina SJ (1971) Synergistic effect of cortisol and growth hormone on hepatic ornithine decarboxylase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* **138**:880-84
- Ridgway ND**, Dawson PA, Ho YK, Brown MS, Goldstein JL (1992) Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol* **116**:307-19
- Robinson MJ**, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* **9**:180-86
- Rodriguez J**, Lazebnik Y (1999) Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**:3179-84
- Rodriguez-Estrada MT**, Costa A, Pelillo M, Caboni MF, Lercker G (2004) Comparison of cholesterol oxidation product preparation methods for subsequent gas chromatographic analysis. *JAOAC Int* **87**:474-80
- Rose-Sallin C**, Huggett AC, Bosset JO, Tabacchi R, Fay LB (1995) Quantification of cholesterol oxidation products in milk powders using [²H₇]cholesterol to monitor cholesterol autoxidation artifacts. *J Agric Food Chem* **43**:935-41
- Ryan E**, Chopra J, McCarthy F, Maguire AR, O'Brien NM (2005) Qualitative and quantitative comparison of the cytotoxic and apoptotic potential of phytosterol oxidation products with their corresponding cholesterol oxidation products. *Br J Nutr* **94**:443-51
- Ryan L**, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2004a) Comparison of the apoptotic processes induced by the oxysterols 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta, 6beta-epoxide. *Cell Biol Toxicol* **20**:313-23
- Ryan L**, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2004b) Generation of an oxidative stress precedes caspase activation during 7beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis in U937 cells. *J Biochem Mol Toxicol* **18**:50-9
- Ryan L**, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2005) The role of the mitochondria in apoptosis induced by 7beta-hydroxycholesterol and cholesterol-5beta,6beta-epoxide. *Br J Nutr* **94**:519-25

Ryan L, O'Callaghan YC, O'Brien NM (2006) Involvement of calcium in 7beta - hydroxycholesterol and cholesterol-5beta,6beta -epoxide-induced apoptosis. *Int J Toxicol* **25**:35-9

S

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenaabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**:2861-74

Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**:96-99

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF (2001) 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J Biol Chem* **276**:3054-59

Schafer ZT, Kornbluth S (2006) The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Dev Cell* **10**:549-61

Schmarr HG, Goross HB, Shibamoto T (1990) Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. *J Agric Food Chem* **44**:512-17

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH (2000) Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **32**:1123-36

Schroepfer GJ Jr (2000) Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev* **80**:361-554

Seiler N, Knödgen B (1980) High-performance liquid chromatographic procedure for the simultaneous determination of the natural polyamines and their monoacetyl derivatives. *J Chromatograph* **221**:227-35

Seiler N (1986) Polyamines. *J Chromatogr* **379**:157-76

Seiler N (1991) Pharmacological properties of the natural polyamines and their depletion by biosynthesis inhibitors as a therapeutic approach. *Prog Drug Res* **37**:107-59

Seiler N, Atanassov CL, Raul F (1998) Polyamine metabolism as target for cancer chemoprevention. *Int J Oncol* **13**:993-1006

Seiler N, Duranton B, Raul F (2002) The polyamine oxidase inactivator MDL 72527. *Prog Drug Res* **59**:1-40

Seiler N (2003) Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 2. Structural analogues and derivatives. *Curr Drug Targets* **4**:565-85

Seiler N, Raul F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* **9**:623-42

- Sevanian A**, Seraglia R, Traldi P, Rossato P, Ursini F, Hodis H (1994) Analysis of plasma cholesterol oxidation products using gas- and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* **17**:397-409
- Shapiro HM**, Natale PJ, Kamensky LA (1979) Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:5728-30
- Shimada K**, Nakamura M, Ishida E, Konishi N (2006) Molecular roles of MAP kinases and FADD phosphorylation in prostate cancer. *Histol Histopathol* **21**:415-22
- Shoda J**, Toll A, Axelson M, Pieper F, Wikvall K, Sjovall J (1993) Formation of 7 alpha- and 7 beta-hydroxylated bile acid precursors from 27-hydroxycholesterol in human liver microsomes and mitochondria. *Hepatology* **17**:395-403
- Siegel RM** (2006) Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **6**:308-17
- Skehan P**, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**:1107-12
- Smith LL**, Teng JI, Lin YY, Seitz PK, McGehee MF (1981) Sterol metabolism--XLVII. Oxidized cholesterol esters in human tissues. *J Steroid Biochem* **14**:889-900
- Soccio RE**, Breslow JL (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:1150-60
- Soupas L**, Juntunen L, Lampi AM, Piironen V (2004) Effects of sterol structure, temperature, and lipid medium on phytosterol oxidation. *J Agric Food Chem* **52**:6485-91
- Stennicke HR**, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS (1999) Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**:8359-62
- Szatrowski TP**, Nathan CF (1991) Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* **51**:794-98

T

Talanian RV, Quinlan C, Trautz S, Hackett MC, Mankovich JA, Banach D, Ghayur T, Brady KD & Wong WW (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J Biol Chem* **272**:9677–82

Tall AR, Costet P, Luo Y (2000) 'Orphans' meet cholesterol. *Nat Med* **6**:1104-05

Tammariello SP, Quinn MT, Estus S (2000) NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* **20**:RC53

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD (2003) Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother* **57**:321-25

Tardy C, Codogno P, Autefage H, Levade T, Andrieu-Abadie N (2006) Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta* **1765**:101-25

Taylor FR (1992) Correlation among oxysterol potencies in the regulation of the degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, the repression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase and affinities for the oxysterol receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **186**:182-89

Theunissen JJ, Jackson RL, Kempen HJ, Demel RA (1986) Membrane properties of oxysterols. Interfacial orientation, influence on membrane permeability and redistribution between membranes. *Biochim Biophys Acta* **860**:66-74

Thomas T, Thomas TJ (2003) Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* **7**:113-26

Thompson EB, Ayala-Torres S (1999) Oxysterols and apoptosis: evidence for gene regulation outside the cholesterol pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **34**:25-32

Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**:17907–11

Thornberry NA, Chapman KT, Nicholson DW (2000) Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol* **322**:100–10

Tikkanen MJ (2005) Plant sterols and stanols. *Handb Exp Pharmacol* **170**:215-30

Tinel A, Tschopp J (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* **304**:843-46

Tomoyori H, Kawata Y, Higuchi T, Ichi I, Sato H, Sato M, Ikeda I, Imaizumi K (2004) Phytosterol oxidation products are absorbed in the intestinal lymphatics in rats but do not accelerate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr* **134**:1690-96

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* **228**:1440-43

Tsujimoto Y (2003) Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* **195**:158-67

U

Uemura M, Manabe H, Yoshida N, Fujita N, Ochiai J, Matsumoto N, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T (2002) Alpha-tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. *Eur J Pharmacol* **456**:29-37

Ulrich S, Loitsch SM, Rau O, von Knethen A, Brune B, Schubert-Zsilavecz M, Stein JM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a molecular target of resveratrol-induced modulation of polyamine metabolism. *Cancer Res* **66**:7348-54

Urdiales JL, Medina MA, Sanchez-Jimenez F (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**:1015-19

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**:1-40

Van de Bovenkamp P, Kosmeijer-Shuil TG, Katan MB (1988) Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids* **23**:1079-85

Van Doormaal JJ, Smit N, Koopman BJ, van der Molen JC, Wolthers BG, Doorenbos H (1989) Hydroxycholesterols in serum from hypercholesterolaemic patients with and without bile acid sequestrant therapy. *Clin Chim Acta* **181**:273-79

Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12097-102

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* **184**:39-51

W

- Wallace HM** (2000) The physiological role of the polyamines. *Eur J Clin Invest* **30**:1-3
- Wallace HM**, Fraser AV (2004) Inhibitors of polyamine metabolism: review article. *Amino Acids* **26**:353-65
- Walter E**, Kissel T (1994) Transepithelial transport and metabolism of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): evidence for an active transport component? *Pharm Res* **11**:1575-80
- Wang C**, JeBailey L, Ridgway ND (2002) Oxysterol-binding-protein (OSBP)-related protein 4 binds 25-hydroxycholesterol and interacts with vimentin intermediate filaments. *Biochem J* **361**:461-72
- Wang X**, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J* **333**:291-300
- Wang X**, Martindale JL, Holbrook NJ (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* **275**:39435-43
- Weston CR**, Davis RJ (2002) The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev* **12**:14-21
- Wilson MR** (1998) Apoptotic signal transduction: emerging pathways. *Biochem Cell Biol* **76**:573-82
- Witztum JL**, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**:1785-92
- Wrzesien-Kus A**, Smolewski P, Sobczak-Pluta A, Wierzbowska A, Robak T (2004) The inhibitor of apoptosis protein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis* **9**:705-15
- Wyllie AH**, Kerr JFR, Curie AR (1980) Cell Death: The Significance of Apoptosis. *Int Rev Cytol.* **68**:251-306
- Wyllie AH** (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol* **73**:189-97

X

Xu Y, Liu Y, Ridgway ND, McMaster CR (2001) Novel members of the human oxysterol-binding protein family bind phospholipids and regulate vesicle transport. *J Biol Chem* **276**:18407-14

Y

Yan PS (1999) Cholesterol oxidation products. Their occurrence and detection in our foodstuffs. *Adv Exp Med Biol* **459**:79-98

Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Curbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H (2002) DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* **9**:680-84

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994) BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**:321-23

Yuan XM, Li W, Brunk UT, Dalen H, Chang YH, Sevanian A (2000). Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products. *Free Radic Biol Med* **28**:208-18

Yu H, Cook TJ, Sinko PJ (1997) Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* **14**:757-62

Yu J, Zhang L (2005) The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:851-58

Z

Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:67-71

Zamzami N, Kroemer G (2005) p53 in apoptosis control: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **331**:685-7

Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Geoffroy P, Raul F, Roussi S, Aoude-Werner D, Marchioni E (2005) Identification and quantitative analysis of beta-sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids* **70**:896-906

Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Raul F, Geoffroy P, Aoude-Werner D, Ennahar S, Marchioni E (2006) Quantitative Analysis of beta-Sitosterol Oxides Induced in Vegetable Oils by Natural Sunlight, Artificially Generated Light, and Irradiation. *J Agric Food Chem* **54**:5410-15

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem* **270**:3778-86

Zhivotovsky B (2003) Caspases: the enzymes of death. *Essays Biochem* **39**:25-40

Sites internet :

<http://www.ligue-cancer.asso.fr> rubrique Vivre avec un cancer/cancers

PUBLICATIONS

Seiler N, Chaabi M, **Roussi S**, Gosse F, Lobstein A, Raul F (2006) Synergism between apple procyanidins and lysosomotropic drugs: potential in chemoprevention. *Anticancer Res* **26**: 3381-86

Gossé F, **Roussi S**, Guyot S, Schoenfelder A, Mann A, Bergerat JP, Seiler N, Raul F (2006) Potentiation of apple procyanidin-triggered apoptosis by the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 in human colon cancer-derived metastatic cells. *Int J Oncol* **29**: 423-8

Zhang X, Cambrai A, Miesch M, **Roussi S**, Raul F, Aoude-Werner D, Marchioni E. (2006) Separation of Delta5- and Delta7-Phytosterols by Adsorption Chromatography and Semipreparative Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography for Quantitative Analysis of Phytosterols in Foods. *J Agric Food Chem* **54**:1196-1202

Seiler N, Renault J, Gosse F, **Roussi S**, Raul F. (2005) Cytotoxicity of the polyamine oxidase inactivator MDL 72527 to cancer cells: Comparison with a saturated structural analogue. *Int J Oncol* **27**:1669-76

Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Geoffroy P, Raul F, **Roussi S**, Aoude-Werner D, Marchioni E (2005) Identification and quantitative analysis of beta-sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Steroids* **70**:896-906

Gosse F, Guyot S, **Roussi S**, Lobstein A, Fischer B, Seiler N, Raul F (2005) Chemopreventive properties of apple procyanidins on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **26**:1291-5

Schneider Y, Fischer B, Coelho D, **Roussi S**, Gosse F, Bischoff P, Raul F. (2004) (Z)-3,5,4'-Tri-O-methyl-resveratrol, induces apoptosis in human lymphoblastoid cells independently of their p53 status. *Cancer Lett* **211**:155-61

Lieby P, Poindron V, **Roussi S**, Klein C, Knapp AM, Garaud JC, Cerutti M, Martin T, Pasquali JL. (2004) Pathogenic antiphospholipid antibody: an antigen-selected needle in a haystack. *Blood* **104**:1711-5

PARTICIPATIONS

-4th Swiss Apoptosis Meeting, Bern, Switzerland, 24-25 août, 2006

Poster

-Finaliste au concours Prix Meilleur Jeune Chercheur 2005 Alexandre Jöel et Prix de Meilleure Vulgarisation Scientifique Kerner, organisés par l'Association pour la recherche sur le Cancer (ARC), Paris, 15 octobre 2005

-3rd Meeting of the Doctoral Schools of Charles University (Prague) & Louis Pasteur University (Strasbourg), Strasbourg, 12-14 décembre 2005

Présentation orale

-1er Colloque Scientifique Francophone, Réseau NACRE, Paris, 8 novembre 2005

Poster

-7th International Conference of Anticancer Research Corfu, Greece, 24-31 octobre 2004

Poster