

---

# APOPTOSE INDUITE PAR LA BLEOMYCINE : INFLUENCE DU MODELE CELLULAIRE

S. BRAHIM-LOGHMARI<sup>1</sup> ET A. KENANI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> laboratoire de biochimie, UR-09/09, Faculté de Médecine de Monastir, 5019 Monastir, Tunisie.

\* Auteur correspondant : Tél: +21673462200 ; Fax: +21673460737; E-mail: raouf.kenani@fmm.rnu.tn.

---

## RESUME

La bléomycine est un antibiotique antitumoral de nature glycopeptidique, isolé à partir de *streptomyces verticillus*. Ce médicament, couramment utilisé en chimiothérapie anticancéreuse, a profondément modifié le pronostic des cancers germinaux des testicules. Son effet n'est également plus contesté dans le traitement de la plupart des lymphomes de Hodgkin. Malgré le fait que sa structure soit établie et que de nombreux travaux portant notamment sur son mode d'action vis à vis de l'ADN ont été réalisés, le mécanisme exact responsable de l'effet létal, *in vivo*, de cette molécule n'est pas encore établi. Récemment, l'étude de voies de signalisation apoptotique induites par la bléomycine a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche. De nombreuses données expérimentales suggèrent que la bléomycine induit dans plusieurs populations cellulaires, des voies de signalisation apoptotique différentes avec une amplitude dépendante de la cinétique et de la dose de cet agent anticancéreux. La sensibilité ou la résistance des cellules tumorales à la bléomycine pourrait être expliquée par une sensibilité ou une résistance à l'apoptose. Cette revue a pour but de décrire les mécanismes démontrés ou supposés qui sont activés ou qui sont bloqués au cours de l'apoptose induite par la bléomycine dans les cellules tumorales.

**Mots clés:** bléomycine, cellules cancéreuses, voies de signalisation apoptotiques, chimiorésistance.

---

## SUMMARY

Bleomycins are a family of glycopeptides isolated from *streptomyces verticillus* and exhibiting antibiotic properties. They are commonly included in chemotherapy regimens used to treat patients with Hodgkin's or non Hodgkin's malignant lymphoma, squamous-cell carcinoma or germ-cell tumor. The chemical structure and action mode of bleomycin have been extensively studied; in contrast, the molecular mechanisms of the cytotoxic effects of bleomycin, *in vivo*, remain poorly understood. Recently, the apoptotic signaling pathway induced by bleomycin was the object of study of many groups. In this sense, some studies suggested that bleomycin induce in some cells different apoptotic pathway in dose and time depending manner. The sensibility or the resistance to apoptosis induced by bleomycin may explain the sensibility or the resistance of tumor cells to bleomycin. The aim of this review was to describe the machinery of apoptosis induced by bleomycin in tumor cells.

**Key words:** bleomycin, cancer cells, apoptotic pathways, chemioresistance.

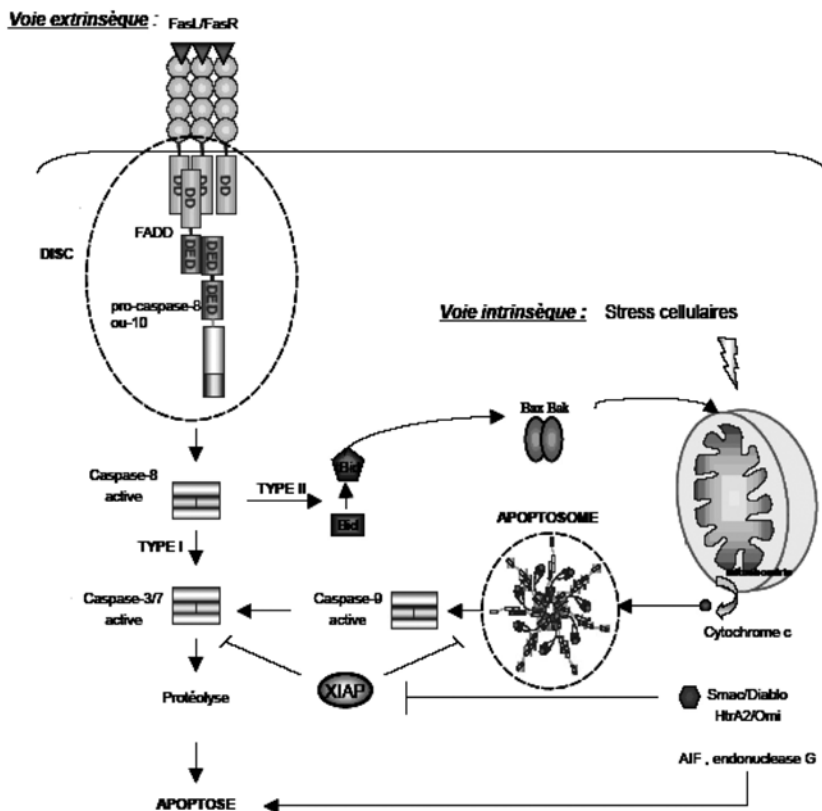
---

## INTRODUCTION

Pendant plusieurs décennies, il était communément admis que l'efficacité des médicaments anticancéreux était essentiellement conditionnée par le niveau des lésions générées, celui-ci étant lui-même fonction de l'amplitude de l'interaction du médicament avec sa ou ses cible(s) putative(s)<sup>1</sup>. Ainsi, l'effort principal des pharmacologistes a porté sur la caractérisation et la modulation des mécanismes de résistance potentiellement responsables d'une diminution de cette interaction (anomalie du transport, détoxication, modification de la cible). Pourtant, de nombreuses observations cliniques et expérimentales faisaient déjà supposer qu'un niveau similaire de lésions pouvait induire des réponses cellulaires différentes (mort rapide, effet cytostatique, voire absence d'effet), suggérant ainsi que l'engagement

vers la mort cellulaire était un processus contrôlé en aval de l'interaction du médicament avec sa cible<sup>1</sup>. Par ailleurs, il a été rapporté que la majorité des médicaments anticancéreux pouvaient induire dans certains systèmes cellulaires, mais pas dans d'autres, un phénomène d'apoptose<sup>2</sup>. De ce fait, l'inductibilité du phénomène d'apoptose est généralement corrélée avec un profil de chimio-sensibilité qui dépend de la nature de l'agent antitumoral et des modèles cellulaires considérés.

L'apoptose est un processus physiologique qui permet à l'organisme d'éliminer les cellules non désirées ou endommagées et potentiellement dangereuses<sup>3</sup>. Elle joue un rôle crucial dans le développement des organismes pluricellulaires et le maintien de l'homéostasie cellulaire qui résulte d'un équilibre contrôlé entre la prolifération et la mort cellulaire<sup>4</sup>.



**Figure 1 :** Deux voies d'induction des caspases (TypeI/TypeII). Deux voies d'induction de l'apoptose : voie des récepteurs de mort (voie extrinsèque) et voie mitochondriale (voie intrinsèque). La voie des récepteurs de mort tel que Fas induit l'activation de caspase-8 initiant la cascade d'activation protéolytique des caspases effectrices. La voie mitochondriale induit la libération du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol et conduit à l'activation de la caspase-9, via l'apoptosome conduisant à l'activation des caspases effectrices (Modifié d'après S. Cathelin<sup>60</sup>)

Cette mort est induite par des circonstances d'agression différentes telles que la privation en facteurs de croissance, le choc thermique, l'agression oxydative ou les agents anticancéreux<sup>5</sup>. L'apoptose est caractérisée par des altérations morphologiques et biochimiques spécifiques, essentiellement, une condensation du cytoplasme et du noyau qui conduit à la fragmentation de l'ADN et au démantèlement de la cellule. La fragmentation de l'ADN au cours de l'apoptose conduit à la formation de fragments oligonucléosomiaux multiples de 180 à 200 pb, donnant un profil électrophorétique caractéristique en "échelle" dans un gel d'agarose<sup>6</sup>.

L'apoptose implique d'autres événements biochimiques, notamment, l'activation de caspases (protéases à cystéines aspartate spécifiques, une famille de 15 enzymes) qui semble jouer un rôle crucial dans le déroulement du phénomène apoptotique<sup>7, 8, 9</sup>. Ces protéases sont activées principalement par deux voies de signalisation (Figure 1) : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque. La plus connue est la voie mitochondriale qui met en scène trois acteurs principaux, les caspases, les protéines de la famille Bcl-2, et la molécule adaptatrice APAF-1, autour de la mitochondrie<sup>10</sup>. L'autre voie d'induction du suicide cellulaire met en jeu les récepteurs de mort qui font partie de la superfamille des récepteurs au TNF tels que TNF-R1, Fas/CD95 ou TRAIL (DR4 et DR5)<sup>11</sup>. Ces voies d'activation de l'apoptose sont soumises à une étroite régulation négative faisant intervenir des protéines de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1)<sup>12</sup>, les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins)<sup>13</sup> ou c-FLIP (Flice Inhibitory Protein)<sup>14</sup>.

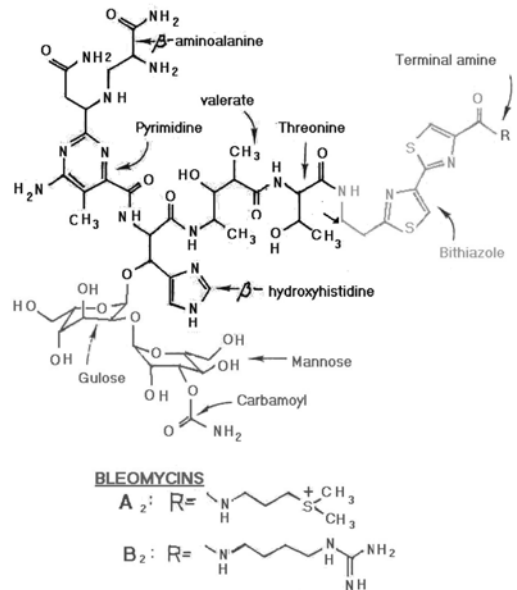
## APOPTOSE INDUITE PAR LA BLEOMYCINE : INFLUENCE DU MODELE CELLULAIRE

La plupart des agents antitumoraux peuvent induire un phénomène d'apoptose. Historiquement, le cisplatine a été le premier agent identifié comme inducteur d'apoptose<sup>15</sup>. Très rapidement, il a été démontré que les rayonnements ionisants, les radiations ultraviolettes et certains médicaments anticancéreux étaient susceptibles d'induire ce phénomène<sup>16</sup>. Parmi les médicaments anticancéreux actifs, on note les poisons de la topo-isomérase II (étoposide, téniposide, amsacrine, mitoxantrone), les poisons de la topo-isomérase I (camptothécine), l'aracytine, les anthracyclines, les antimétabolites (méthotrexate), les poisons

des tubulines (alcaloïdes de la Vinca et taxanes), les antibiotiques (les anthracyclines, l'actinomycine, la bléomycine) et récemment les médicaments à thérapie ciblée (l'herceptin, le glivec) (Tableau I).

La bléomycine (BLM) est un antibiotique antitumoral de nature glycopeptidique, isolé à partir de *Streptomyces verticillus*<sup>17</sup>. La bléomycine est le nom générique d'une série de composés de structure de base commune l'acide bléomycinique et qui ne diffèrent que par leur amine terminale<sup>18</sup> (Figure 2). La bléomycine est un médicament couramment utilisé en chimiothérapie anticancéreuse sous forme d'un mélange de différentes proportions de BLM : 60 à 70% de BLM-A2, 25 à 30% de BLM-B2 et moins de 10% d'autres bléomycines comme la BLM-B4 et BLM-B6<sup>19</sup>. La BLM s'est rapidement révélée active, seule ou en association essentiellement avec la vinblastine et le cisplatine. La BLM a profondément modifié le pronostic des cancers germinaux des testicules.

Son intérêt n'est également plus contesté dans le traitement de la plupart des lymphomes de Hodgkin où elle a été introduite, souvent en association dans des protocoles évitant la résistance croisée<sup>20</sup>.



**Figure 2** : Structure de la bléomycine. La structure chimique de la bléomycine peut être schématiquement décrite suivant quatre grandes parties : Une partie pseudopeptidique (hexapeptide), un noyau bithiazolique, une partie glycanique et une amine terminale. Cette figure présente l'amine terminale de la bléomycine-A2 et de la bléomycine-B2, composés majeurs du mélange utilisé en clinique.

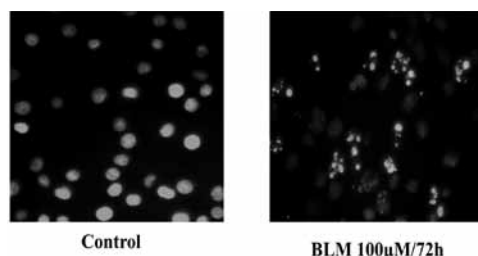
Le seul frein à son utilisation thérapeutique est, chez certains patients, l'induction d'une fibrose pulmonaire pouvant être fatale qui résulte de la production des radicaux libres par la BLM<sup>21</sup>.

Cependant, le mécanisme exact, responsable de l'effet léthal *in vivo* de la BLM n'est pas encore établi. Toutefois, il est généralement admis que l'ADN constitue la cible moléculaire privilégiée de la BLM et que l'action cytotoxique de la BLM est liée à sa capacité à dégrader l'ADN, et notamment de générer des coupures double-brin difficilement réparables<sup>22, 23</sup>. Le type de mort cellulaire serait directement lié à la fois au type et au nombre de coupures générées<sup>24</sup>. La bléomycine induit, dans presque la totalité des modèles cellulaires étudiés, une mort qui est le plus souvent de type apoptotique<sup>24, 25, 26, 27, 28</sup>, impliquant

l'activation des caspases. Ainsi, à l'aide de la lignée de cellules leucémiques aigues myéloïdes (U937), où la BLM induit une apoptose à des concentrations élevées (50 et 100  $\mu$ M) après 24 h d'incubation<sup>25</sup>, nous avons montré que ce phénomène apoptotique impliquait l'activation de caspases -3, -8 et -9 ainsi que la fragmentation de l'ADN en échelle, caractéristique de l'apoptose. De même, dans une deuxième étude nous avons également montré que le traitement des cellules épithéliales du carcinome du larynx (HEp-2) avec 100 $\mu$ M de la BLM induisait, après 72h d'incubation, une mort de type apoptotique de ces cellules (Figure 3) toujours avec l'activation des caspases -3, -8 et -9 et la fragmentation en "échelle" de l'ADN. Ces mêmes résultats ont été observés dans d'autres études réalisées sur plusieurs modèles cellulaires tels

**Table I: Classifications des médicaments anti-cancéreux en fonction de leur mode d'action cellulaire.**

Familles de médicaments anticancéreux	Modes d'action cellulaire	Exemples
<b>Les agents alkylants</b>	Agissent sur la duplication de l'ADN ou sur sa transcription en créant des ponts intra-moléculaires entre les deux chaînes d'ADN ce qui a pour conséquence : d'interdire leur duplication, de créer des altérations immédiates et des mutations géniques, de bloquer la mitose par agglutination de chromosomes. Ces produits ne sont pas spécifiques d'une phase spécifique, ils sont "phase indépendant".	- les Moutardes à l'azote (Cyclophosphamides : Endoxan, Ifosfamide : Holoxan) - les Nitroso-urées (Bicnu, Bélustine) - les dérivés du platine (Paraplatine, Cisplatyl)
<b>Les antimétabolites</b>	Inhibent la synthèse des acides nucléiques en se substituant aux bases puriques et pyrimidiques indispensables à cette synthèse. Ils agissent à la phase S du cycle cellulaire.	- les inhibiteurs des bases pyrimidiques (Méthotrexate, 5FU, Aracytine) - les inhibiteurs des bases puriques (Purinéthol, Lanvis)
<b>Les antibiotiques</b>	Inhibent la duplication de l'ADN ou à transcription en ARN messenger.	- les anthracyclines (Dauxorubicine : adriblastine, Daunorubicine ; Cérubidine, et leurs analogues : Epirubicine, Idarubicine, Mitoxantrone) - l'Actinomycine et la Bléomycine
<b>Les antifusoraux ou poisons du fuseau</b>	Agissent sur le fuseau cellulaire, provoquant des altérations du système microtubulaire en métaphase et donc bloquant la mitose. Ils sont spécifiques de la phase M et sont dites "phase dépendants".	- les dérivés alcaloïdes de la pervanche (Vinblastine, Vincristine, Vindésine) - les épipodophylotoxines, inhibiteurs de la topoisomérase II (Etoposide, Teniposide)
<b>L'asparaginase</b>	Utilisée dans les proliférations lymphoïdes. Dégrade l'asparagine, acide aminé essentiel, en acide aspartique	- L'asparaginase
<b>Les médicaments à thérapeutique ciblée</b>	Il s'agit d'un traitement dirigé contre une cible cellulaire des cellules cancéreuses. Ce peut être un anticorps contre un gène exprimé à la surface ou dans la cellule cancéreuse, ou encore une molécule capable de bloquer la transmission d'un signal de division cellulaire. Ce peut être aussi par exemple un anticorps dirigé contre les nouveaux vaisseaux fabriqués par la tumeur pour se nourrir. Ces médicaments sont administrés parfois seuls, parfois en association avec une chimiothérapie ou des rayons.	- L'herceptin - le glivec



**Figure 3 :** L'apoptose induite par la bléomycine est associée à la fragmentation d'ADN dans les cellules HEP-2. Les cellules HEP-2 sont traitées avec 100 µM de bléomycine pendant 72 h. L'apoptose est analysée par le colorant d'ADN, l'Hoechst 333 42 <sup>24</sup>.

que ceux des cellules alvéolaires épithéliales <sup>27</sup>, des cellules leucémiques humaines (HL-60) et des cellules fibroblastiques <sup>28</sup>. Il convient de souligner ici que, dans ces modèles cellulaires qui sont aptes à activer un phénomène d'apoptose suite à leurs expositions à la BLM, l'amplitude et la cinétique de ce phénomène étaient différentes en fonction de l'origine histogénétique des cellules. Ainsi, les cellules hématopoïétiques (physiologiques ou néoplasiques) exposées à

un agent anticancéreux présentent généralement une réponse apoptotique de plus grande amplitude que les cellules de tumeurs solides qui sont le plus souvent d'origine épithéliale. Il est intéressant de constater que cette hiérarchie correspond à la physiologie dans la mesure où l'apoptose est une modalité courante d'élimination physiologique des cellules hématopoïétiques, alors que ce phénomène n'est pas la règle pour les épithéliums <sup>29</sup>. Cependant, les voies par lesquelles les caspases sont activées au cours de l'apoptose induite par la BLM varient d'un modèle cellulaire à un autre (Tableau II).

### La voie Mitochondriale

La mitochondrie joue un rôle central dans l'apoptose induite par la BLM. En effet, lors de notre étude sur les cellules leucémiques, nous avons remarqué que l'apoptose induite par la BLM impliquait la voie mitochondriale (Figure 1). Cette apoptose est inhibée par la surexpression dans les cellules U937 de la protéine Bcl-2. De plus, la BLM induit l'oligomérisation au niveau de la mitochondrie de la protéine

**Table II: Voies d'induction de l'apoptose par la bléomycine dans différents modèles cellulaires.**

Type de cellules	Voies d'induction de l'apoptose par la bléomycine	Références
Cellules leucémiques myéloïdes humaines (U937)	- Activation de caspases -3, -8,-9 - Mitochondriale - Production des ROS - Activation de la MAPK, JNK - Indépendante des récepteurs de mort Fas et TRAIL-R2	[24]
Cellules épithéliales du carcinome du larynx humaines (HEp-2)	- Activation de caspases -3, -8,-9. - Mitochondriale - Production des ROS - Activation de la MAPK, JNK - Indépendante de Fas et TRAIL-R2	[25]
Cellules épithéliales de poumon typeII souris (MLE)	- Activation de caspases -3, -8,-9 - Mitochondriale - Production des ROS - Indépendante de FasL/Fas	[34]
Cellules alvéolaires épithéliales souris (MLE12)	- Mitochondrial - Activation de la MAPK, JNK - Indépendante de Fas	[31]
Les cellules leucémiques humaines (HL-60)	- Activation des caspases-3,-8,-9 - Mitochondrie	[28]
Les cellules épithéliales du poumon de souris	- Dépendant e Fas/FasL	[36]
Cellules alvéolaires épithéliales de souris	- Mitochondriale - Dépendant Fas/FasL	[37]
Cellules musculaires du rat	- Production des ROS	[43]
Cellules humaines du carcinome épidermoïde de la cavité buccale (KB)	- Activation de la MAPK, JNK	[44]

pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bax et le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol (Figure 4 A et B). De même dans les cellules épithéliales du carcinome du larynx, la BLM induit également l'oligomérisation de la protéine pro-apoptotique Bax, ainsi que le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytoplasme (publication en cours). Cela a aussi été démontré dans plusieurs autres modèles cellulaires comme les cellules pulmonaires de souris où la BLM induit une mort apoptotique avec activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bid<sup>30</sup>. Enfin, dans les cellules macrophagiques alvéolaires de rat, la bléomycine induit l'oligomérisation de Bax et la répression de l'activation de la protéine anti-apoptotiques Bcl2<sup>19</sup>. L'implication de Bax et Bak est confirmée par la résistance à la mort induite par la bléomycine chez des cellules de fibroblastes de souris Bax-/-, bak-/-<sup>31</sup>. Toutefois, dans d'autres modèles cellulaires, tels les cellules leucémiques humaines HL-60 p53-/-, la BLM induit une apoptose indépen-

dante de Bax et de Bcl-2<sup>32</sup>. Ces observations suggèrent que la BLM fait appel à l'activation de la voie mitochondriale dans l'induction de l'apoptose dans presque la totalité des modèles cellulaires comme c'est le cas pour la plupart des agents cytotoxiques.

### La voie de récepteurs de mort

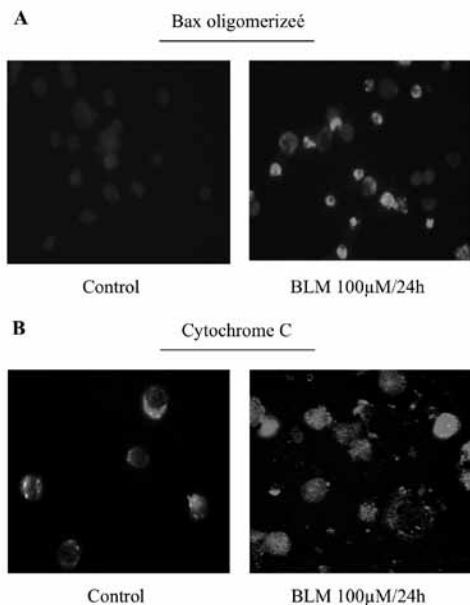
Dans les cellules leucémiques U937, nous avons montré que l'apoptose induite par la BLM était indépendante des récepteurs Fas/CD95 et des récepteurs TRAIL (DR4 et DR5). Cela est également le cas pour les cellules HEP-2 ainsi que chez d'autres modèles cellulaires comme les cellules épithéliales de poumon, humaines<sup>33</sup> ou de souris<sup>34</sup> où la BLM induit une apoptose indépendante de la voie de Fas.

Il faut signaler que, la BLM induit la clustérisation membranaire de récepteurs TRAIL et Fas dans les cellules U937 (Figure 5). Cette clustérisation ne modifie pas le taux d'expression de ces récepteurs sur la membrane plasmique. Il semble donc que, la redistribution de ces récepteurs soit indépendante de l'apoptose induite par la BLM. Toutefois, elle pourrait être à l'origine d'une sensibilisation des cellules leucémiques aux TRAIL au cours de l'apoptose induite par la BLM dans les cellules U937<sup>25</sup>. Dans les cellules épithéliales du carcinome du larynx (HEP-2), la BLM induit une apoptose indépendante des récepteurs de mort TRAIL et Fas/CD95. Cependant, on a observé aussi bien pour les cellules HEP-2 que pour les cellules U937, que l'agoniste de récepteur TRAIL sensibilise ces cellules à l'apoptose induite par la BLM (article en cours de publication). Toutefois, seules les cellules HEP-2 sont sensibilisées par l'agoniste de Fas au cours de la mort induite par la BLM. De ce fait les agonistes des récepteurs de mort, TRAIL et Fas, offrent une importante donnée sur la pharmacologie moléculaire de la bléomycine dans le sens où ils pourraient être utilisés en synergie avec la bléomycine pour augmenter son effet cytotoxique.

L'implication des récepteurs de mort TNF et plus particulièrement de Fas dans l'apoptose induite par la BLM est démontrée *in vivo* et *in vitro*, dans d'autres modèles cellulaires<sup>35, 36, 37, 38</sup>. Suite à la surexpression du récepteur de mort TNF/Fas, la BLM induirait une apoptose P53 dépendante<sup>39</sup>, comme dans le cas de la voie mitochondriale.

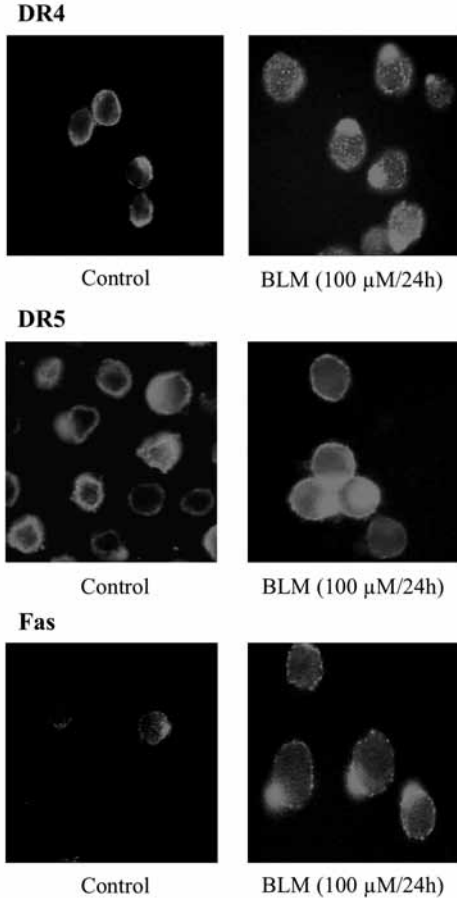
### La production des radicaux oxygénés

Le rôle de l'équilibre oxydatif dans le processus d'apoptose a été largement démontré<sup>40</sup>.



**Figure 4 :** La bléomycine-A2 induit l'apoptose de cellules leucémiques via la voie mitochondriale. (A) les cellules U937 traitées avec 100 µM de bléomycine pendant 24h, marquées avec l'anticorps anti-bax et observées au microscope à fluorescence, démontrent l'oligomérisation de la protéine pro-apoptotique bax. (B) les cellules U937 traitées avec 100µM de bléomycine, marquées avec l'anticorps anti-cytochrome c et observées au microscope à fluorescence, démontrent une diffusion de cytochrome c, signe de son relargage de la mitochondrie vers le cytosol<sup>25</sup>.





**Figure 5 :** Clustérisation des récepteurs de mort des cellules U937 au cours de l'apoptose induite par la BLM. Les cellules U937 sont traitées ou non par 100µM de bléomycine pendant 24 h. Les récepteurs de mort DR4, DR5, et Fas sont observés au microscope à fluorescence <sup>25</sup>.

D'après la littérature, il est démontré que la BLM produit des radicaux libres oxygénés (ROS) en présence d'oxygène moléculaire et de fer ferreux <sup>41</sup>. La BLM stimulerait aussi la production d'O<sub>2</sub> par les macrophages <sup>34, 42</sup>. Dans les cellules leucémiques, nous avons constaté que l'apoptose induite par la BLM est médiée en partie par les radicaux oxygénés puisqu'un inhibiteur de ces dérivés oxygénés, la N-acétylcystéine (NAC), réduit de moitié le pourcentage de cellules apoptotiques. La production de ROS a lieu à un stade précoce du processus apoptotique induit par la BLM puisque la NAC bloque l'oligomérisation du Bax, et le relargage du cytochrome c. De même, l'utilisation de la NAC, inhibe considérable-

ment l'apoptose induite par la BLM dans les cellules HEP-2 <sup>24</sup>. L'implication des ROS dans l'apoptose induite par la BLM est démontrée aussi, dans les cellules épithéliales de poumon du souris <sup>34</sup> et dans les cellules musculaires du rat <sup>43</sup>.

Dès lors, on conçoit que la production de ROS par la BLM contribue au signal de mort induit par cet agent, mais les mécanismes par lesquels les radicaux oxygénés activent l'apoptose induite par la bléomycine restent à définir.

### **L'activation de la voie de MAPK**

Des études récentes ont montré qu'une autre voie mitogène classique, dite voie des MAP Kinases, est activée en réponse à des agents anticancéreux tel que la bléomycine, et que cette activation favorisait l'apoptose <sup>31, 44</sup>. En effet, les études effectuées jusqu'à présent montrent que dans les cellules humaines du carcinome épidermoïde de la cavité buccale (KB) JNK joue un rôle important dans l'apoptose induite par la BLM <sup>44</sup>, la cytotoxicité de la BLM est fortement réduite lorsque les cellules primaires alvéolaires de type II du rat portent une version dominante négative de JNK <sup>31</sup>. Pour notre part, nous avons montré que la bléomycine était capable d'activer cette voie de MAPK, par l'activation de la protéine JNK, dans les cellules leucémiques ainsi que dans les cellules épithéliales du carcinome du larynx HEP-2. De plus, dans les cellules leucémiques, l'activation de cette protéine JNK joue un rôle important dans les voies de signalisation apoptotique induite par la BLM. L'inhibition de JNK diminue également la clustérisation de récepteurs de mort TRAIL et Fas, ce qui nous a amené à penser que ce médicament serait impliqué <sup>25</sup>.

Cependant, la cinétique et les voies de signalisations apoptotiques induite par la bléomycine, sont aussi influencées par des mécanismes de résistance à ce médicament qui pourraient être à l'origine de la variation de la réponse cellulaire vis à vis la bléomycine.

### **RESISTANCE A LA BLEOMYCINE**

Plusieurs ont montré que la résistance à la bléomycine est très complexe. Elle impliquerait plusieurs processus biochimiques tels que la diminution de l'accumulation de la molécule à l'intérieur de la cellule (limitation de l'influx), l'inactivation métabolique (BLM-ase), et la réparation de l'ADN <sup>45</sup>. Certains mécanismes sont déterminés génétiquement, d'autres sont liés à des conditions épigénétiques. Plusieurs travaux ont montré que la membrane plas-

mique est la principale barrière physique à franchir par la molécule de la BLM pour atteindre l'ADN puisqu'elle constitue un obstacle réel et un facteur limitant à l'accessibilité de la BLM au noyau <sup>46</sup>. En effet, l'état de la membrane, et notamment sa fluidité, jouerait un rôle très important dans la pénétration de la bléomycine dans la cellule <sup>47</sup>. Ceci expliquerait, entre autres, la sélectivité tissulaire de la BLM, comme il pourrait expliquer les différences de réponse des tumeurs à la BLM. Afin d'améliorer la pénétration de la BLM dans les cellules, plusieurs essais ont été réalisés pour modifier la fluidité membranaire et faciliter la traversée de la membrane plasmique. L'électroporéabilisation réversible des cellules vivantes est le procédé le plus connu. Cette technique a donné lieu à une nouvelle approche antitumorale, l'électro-chimiothérapie <sup>48</sup>.

Un autre facteur responsable de la résistance à la bléomycine est la bléomycine hydrolase. Il s'agit d'une protéase à cystéine définie comme inactivateur de la bléomycine dans des tissus normaux ou tumoraux <sup>49</sup>. *In vitro*, la BLM-ase hydrolyse la liaison carboxamide au niveau de la  $\beta$ -aminoalaninamide de la BLM. Il en résulte la formation de la déamido-BLM, cent fois moins cytotoxique, mais aussi qui n'entraîne pas des effets secondaires pulmonaires <sup>19, 49</sup>. Il semble même que le spectre d'action de la BLM soit relié au taux de BLM-ase présent dans un tissu tumoral donné <sup>49</sup>.

La résistance à la bléomycine peut aussi résulter de l'efficacité de réparation des dommages de l'ADN induites par la bléomycine. En effet, il est admis que la bléomycine génère deux types de coupures : des coupures simple-brin et des coupures double-brin <sup>22</sup>. Selon de récentes études, les protéines impliquées dans la réparation de ces lésions diffèrent selon le type de coupure <sup>19</sup>. La réparation des coupures simple-brin faisait appel à trois enzymes : apurinic/apyrimidique endonuclease 1 (APE1) <sup>50</sup>, la polymérase- $\beta$  (POL $\beta$ ) <sup>51</sup> et la tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) <sup>19</sup>. La réparation des coupures double-brin générées par la bléomycine impliquerait deux enzymes : non-homologous end joinin (NHEJ) <sup>52</sup> et homologous recombination repair (HRR) <sup>53</sup>. L'enzyme POL $\beta$  peut être impliquée dans ce processus en interagissant avec la protéine XRCC4 (facteur de l'enzyme (NHEJ)) <sup>19</sup>. Ainsi, la sensibilité relative de certaines cellules tumorales par rapport à d'autres au traitement par la bléomycine pourrait s'expliquer entre autre par l'efficacité de réparation des coupures d'ADN induites par cette molécule.

De ce fait, il est important de comprendre les voies de réparation de l'ADN dans les cellules saines et d'identifier les lésions de l'ADN, produites par la bléomycine qui sont difficiles à réparer par certaines cellules tumorales, provoquant ainsi une augmentation de la cytotoxicité de cet agent.

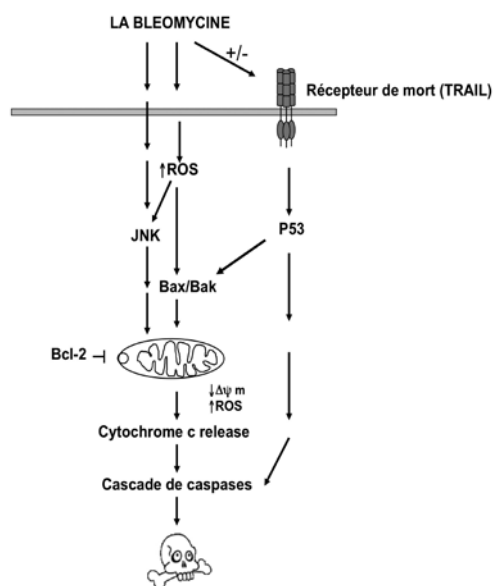
Deux importantes protéines sont impliquées dans le contrôle et la modulation de la réponse cellulaire vis à vis des dommages de l'ADN induits par la bléomycine : l'ATM et la p53. L'ATM est une phosphatidylinositol-3-kinase-like kinase qui joue le rôle d'un capteur (sensor) de dommages à l'ADN ainsi qu'un transducteur de signaux <sup>19</sup>. Plusieurs études suggèrent que l'ATM interviendrait principalement dans la réparation de l'ADN, comme réponse cellulaire aux dommages de l'ADN induits par la BLM dans les cellules de mammifères <sup>54, 55</sup>. La p53, protéine suppresseur de tumeurs connue comme « gardienne du génome », est impliquée dans la réparation de l'ADN, l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN induits entre autre par la BLM <sup>56</sup>. La fonction de p53 dépend du type cellulaire <sup>54, 55</sup>. Une étude sur les cellules leucémiques myéloïdes (U937), montre une mort apoptotique induite par la bléomycine après un délai prolongé et une augmentation de taux de p53 associées à un arrêt au point G1/S de contrôle du cycle cellulaire et/ou une apoptose <sup>57</sup>. Une autre étude, portant sur des lymphoblastes indique que la p53 est impliquée dans la réparation des coupures double-brin induites par la bléomycine <sup>54</sup>. Ainsi, le retard de réponse apoptotique semble avoir pour conséquence de permettre à la cellule de « gérer » les lésions générées par la bléomycine avec blocage de cycle cellulaire, réparation et survie. Cependant, d'autres études montrent que la mort induite par la bléomycine dans certaines lignées cancéreuses, est une apoptose p53-indépendante <sup>32, 58</sup>. L'apoptose apparaît ainsi comme une réponse cellulaire drastique, irréversible ne laissant à la cellule aucune possibilité de réparation et donc de survie. L'inactivation de p53 augmente la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par la bléomycine <sup>59</sup>.

Plus récemment, il a été démontré que le système de réparation de mésappariements après réplication (MMR) peut intervenir dans le contrôle de la réponse cellulaire vis à vis des dommages de l'ADN induits par la bléomycine. En effet, la perte de l'activité de ce système est associée à une augmentation de la résistance à l'apoptose induite par la bléomycine <sup>59</sup>.



## DISCUSSION

Bien que les voies de signalisation apoptotiques induites par la bléomycine soient complexes et font intervenir un réseau d'événements coordonnés et hautement contrôlés, constitué par des caspases, des MAP Kinase, des protéines de la famille de Bcl-2, des espèces réactifs d'oxygènes (ROS), il apparaît que la voie mitochondriale est préférentiellement activée par ce médicament quel que soit le type cellulaire utilisé. Alors que l'association de la voie des récepteurs de mort reste liée au modèle cellulaire utilisé (Figure 6).



**Figure 6 :** Les voies possibles d'induction de l'apoptose par la bléomycine. L'apoptose induite par la bléomycine peut suivre deux voies : dans certains cas, la voie de récepteur de mort TRAIL qui fait appel à la protéine P53, mais majoritairement, la voie mitochondriale. Par cette voie, la mitochondrie libère le cytochrome c et conduit à l'activation des caspases effectrices de l'apoptose, via l'apoptosome. Cette voie peut être contrôlée par la production des ROS, par l'activation de la MAPK, de JNK, ou par la famille des protéines de Bcl-2.

En enfin, bien que les avancées déterminantes décrites sur les voies de signalisation apoptotique induites par la bléomycine apportent des éléments de réponse essentiels pour le mécanisme d'action de cet agent dans la cellule, la résistance à la bléomycine reste un obstacle majeur pour l'utilisation thérapeutique de ce médicament. De ce fait, la détermination des mécanismes de résistance à l'apoptose

induite par la bléomycine serait un élément essentiel pour augmenter l'efficacité de ce médicament anticancéreux.

## REFERENCES

- 1- **A. Bettaieb et G. Laurent** (1997). Apoptose induite par les agents antitumoraux. *Hématologie*, **3**, 146-154.
- 2- **S. Fulda, E. Meyer et C. Friesen** (2001). Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene*, **20**, 1063-1075.
- 3- **J.F. Kerr, A.H. Wyllie et A.R. Currie** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.*, **26**, 239-257.
- 4- **C.B. Thompson** (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- 5- **A. Lawen** (2003). Apoptosis an introduction. *BioEssays*, **25**, 888-896.
- 6- **M.M. Compton** (1992) A biochemical hallmark of apoptosis: Internucleosomal degradation of the genome. *Cancer. Metastasis. Rev.*, **11**, 105-119.
- 7- **N.A. Thorneberry, T.A. Rano et E.P. Peterson** (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**, 7907-7911.
- 8- **M. Saleh, J.P. Vaillancourt et R.K. Graham** (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*, **429**, 75-79.
- 9- **L. Eckhart, C. Ballaun et A. Uthman** (2005). Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 35077-35080.
- 10- **G. Kroemer** (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **304**, 433-435.
- 11- **A. Bhardwaj et B.B. Aggarwal** (2003). Receptor-mediated choreography of life and death. *J. Clin. Immunol.*, **23**, 317-332.
- 12- **E.H. Cheng, T.V. Sheiko et J.K. Fisher** (2003). VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*, **301**, 513-517.
- 13- **A. Wrzesien-Kus, P. Smolewski et A. Sobczak-Pluta** (2004). The inhibitor of apoptosis pro-

- tein family and its antagonists in acute leukemias. *Apoptosis*, **9**, 705-715.
- 14- **W.C. Yeh, A. Itie et A.J. Elia** (2000). Requirement for Casper (c-FLIP) in regulation of death receptor-induced apoptosis and embryonic development. *Immunity*, **12**, 633-642.
  - 15- **M.A. Barry, C.A. Behnke et B.A. Eastman** (1990). Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Bio. Pharmacol.*, **40**, 2353-2362.
  - 16- **J.A. Hickman** (1992). Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer. Met. Rev.*, **11**, 121-139.
  - 17- **H. Umezawa, K. Maed et T. Takeuchi** (1966). New antibiotics; bleomycin A and B. *J. Antibiot.*, **19**, 200-209.
  - 18- **A. FUJII, T. TAKITA, K. MAEDA et H. UMEZAWA** (1973). Chemistry of bleomycin XI: the structures of the terminal amines. *J. Antibiot.*, **26**, 398-399.
  - 19- **J. Chen et J. Stubbe** (2005). Bleomycins: Towards better therapeutics. *Nature*, **5**, 102-112.
  - 20- **L.F. Povirk et M.J. Austin** (1991). Genotoxicity of bleomycin. *Mutation Research*, **257**, 127-143.
  - 21- **R.L. Comis** (1992). Bleomycin pulmonary toxicity: Current status and future directions. *Sem Oncol.*, **19**, 64-70.
  - 22- **O. Tounekti, A. Kenani et N. Foray** (2001). The ratio of single to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Brit. J. cancer*, **84**, 1272-1279.
  - 23- **E.A. Sausville, J. Peisach et S.B. Horwitz** (1978). Effect of chelating agents and metal ions on the degradation of DNA by bleomycin. *Biochemistry*, **17**, 2740-2746.
  - 24- **S. Brahimi** (2008). Deglycosylated bleomycin triggers apoptosis in laryngeal carcinoma cells in a caspase and reactive oxygen species independent manner. *J. Oral. Pathol. Med.*, **37**, 352-357.
  - 25- **S. Brahimi, L. Prévotat, S. Yatouji, A. Bettaieb et A. Kenani** (2007). Deglycosylated bleomycin induces apoptosis in lymphoma cell via c-jun NH2-terminal kinase but not reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.*, **74**, 1445-1455.
  - 26- **Y.C. Ho, K.W. Tai et Y.C.** (2007). Synergistic effects of verapamil on pingyangmycin-induced cytotoxicity and apoptosis in KB cells. *Oral. Dis.*, **13**, 40-44.
  - 27- **A. Linge, N. Morishima et M. Kasper** (2007). Bleomycin induces caveolin-1 and -2 expression in epithelial lung cancer A549 cells. *Anticancer. Res.*, **27**, 1343-1351.
  - 28- **M. Sasaki, M. Okamura et A. Ideo** (2006). Re-evaluation of tumor-specific cytotoxicity of mitomycin C, bleomycin and peplomycin. *Anticancer Res.*, **26**, 3373-3380.
  - 29- **J.M. Brown et L.D. Attardi** (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature*, **5**, 231-237
  - 30- **H.R. Kang, S.J. Cho et C.G. Lee** (2007). Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. *J. Biol. Chem.*, **282**, 7723-7732.
  - 31- **V.Y. Lee, C. Schroedl et J.K. Brunelle** (2005). Bleomycin induces alveolar epithelial cell death through JNK-dependent activation of the mitochondrial death pathway. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **289**, L521-L528.
  - 32- **D. Gimonet, E. Landais et H. Bobichon** (2004). Induction of apoptosis by bleomycin in p53-null HL-60 leukemia cells. *Int. J. Oncol.*, **24**, 313-319.
  - 33- **K. Aoshiba, S. Yasui et J. Tamaoki** (2000). The Fas/Fas-ligand system is not required for bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, **162**, 695-700.
  - 34- **S.B. Wallach-Dayana, G. Izibicki et P.Y. Cohen** (2006). Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, **290**, L790-L796.
  - 35- **T. Yamamoto, H. Yokozeki et K. Nishioka** (2007). Fas- and FasL-deficient mice are resistant to the induction of bleomycin-induced scleroderma. *Arch. Dermatol. Res.*, **298**, 465-468.
  - 36- **R. Golan-Gerstl, S.B. Wallach-Dayana et G. Amir** (2007). Epithelial cell apoptosis by fas ligand-positive myofibroblasts in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **36**, 270-275.
  - 37- **K. Kuwano, N. Hagimoto et M. Kawasaki** (1999). Essential roles of the Fas-Fas ligand pathway in the development of pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.*, **104**, 13-19.

- 38- **M.S. Wilder, D. Bannasch et D. Israeli** (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.*, **188**, 2033-2045.
- 39- **M. Muller, S. Strand et H. Hug** (1997). Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J. Clin. Invest.*, **99**, 403-413.
- 40- **T.M. Buttke et P.A. Sandstrom** (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, **15**, 7-10.
- 41- **A. Kenani** (1997). Bléomycine : rôles de la parie glycanique dans son activité biologique [Thèse], Université de Tunis II (Tunisie) 1-160.
- 42- **J.S. Hong, H.H. Ko et E.S. Han** (2003). Inhibition of bleomycin-induced cell death in rat alveolar macrophages and human lung epithelial cells by ambroxol. *Biochem. Pharma.*, **66**, 1297-1306.
- 43- **D. Caporossi, S.A. Ciafrè et M. Pittaluga** (2003). Cellular responses to H(2)O(2) and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free. Radic. Biol. Med.*, **5**, 1355-1364.
- 44- **L.C. Yang, S.H. Yang et K.W. Tai** (2004). MEK inhibition enhances bleomycin A5-induced apoptosis in an oral cancer cell line: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *J Oral Patbol Med.*, **33**, 37-45.
- 45- **J.S. Mistry, R.R. Koepsel et J.S. Lazo** (1993). Structural basis for the sequence selectivity of DNA cleavage by bleomycins. *Biochem. Biophys. Commun.*, **191**, 420-426.
- 46- **S. Lyman, B. Ujjani et K. Renner** (1986). Properties of the initial reaction of bléomycine and several of its metal complexes with Ehrlich cells. *Cancer. Res.*, **46**, 4472-4478.
- 47- **S.N. Roy et S.B. Horwitz** (1984). Characterisation of the association of radiolabeled bleomycin A2 with Hela cells. *Cancer. Res.*, **44**, 1541-1546.
- 48- **L.M. Mir, S. Orlowski et J.R. Belehrakdek** (1991). Electrochemotherapy: potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer.*, **27**, 68-72.
- 49- **S.M. Sebtì, J.P. Jani et J.S. Mistry** (1991). Metabolic inactivation: A mechanism of human tumor resistance to bleomycin. *Cancer Res.*, **51**, 227-232.
- 50- **Y.H. He 2nd, M. Wu, M. Kobune, Y. Xu, M.R. Kelley et W.J. Martin** (2001). Expression of yeast apurinic/aprimidinic endonuclease (APN1) protects lung epithelial cells from bleomycin toxicity. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, **25**, 692-698.
- 51- **S. Di-An, D. Jing-Zhen, R. S. Shelley et M.H. Sidney** (1999). Misprylic Acid, a New Monocyclic Triterpenoid with a Novel Skeleton from *Mischocarpus pyriformis* that Inhibits DNA Polymerase  $\beta$ . **19**, 6120-6124.
- 52- **V. Kristoffer et F.P. Lawrence** (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*, **22**, 5792-5812.
- 53- **A. Sancar, L.A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kaçmaz et S. Linn** (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev Biochem.*, **73**., 39-85.
- 54- **T. Alio et R.J. Etpresion** (2000). Increased sensitivity to chromatid aberration induction by bleomycin and reccarizinositalin results from alterations in a DNA damage response pathway. *Mutat. Res.*, **453**, 5-15.
- 55- **A. Elson, Y. Wang et C.J. Daugherty** (1996). Pleiotropic defects in ataxia-telangiectasia protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 13084-13089.
- 56- **W.G. Nelson et M.B. Kastan** (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1815-1823.
- 57- **S. Obad, H. Brunnström et J. Vallon-Christersson** (2004). Staf50 is a novel p53 target gene conferring reduced clonogenic growth of leukemic U-937 cells. *Oncogene*, **23**, 4050-4059.
- 58- **V. Pailnstey, J.F. Enstey et J.S. Gutking** (2000). Induction of apoptosis in had-and-neck squamous carcinoma cells by gamma irradiation and bleomycin is p53-independent. *Int. J. Cancer.*, **88**, 737-743.
- 59- **P. Vernole, B. Tedeschi et L. Tentori** (2006). Role of the mismatch repair system and p53 in the clastogenicity and cytotoxicity induced by bleomycin. *Mutation Research*, **594**, 63-77.
- 60- **C. Sevrine** (2006). Rôle des caspases dans la différenciation de cellules hématopoïétiques, Thèse de docteur de l'université de Bourgogne.