

UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN
Faculté de Médecine
&
Christian de Duve Institute of Cellular Pathology
Laboratoire de Chimie Physiologique

Activation du cycle cellulaire par la 2-chloro-2'-désoxyadénosine
dans la lignée leucémique EHEB:
un nouveau mécanisme impliqué dans l'induction de l'apoptose

Sabine Cardoen
Docteur en Médecine vétérinaire

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences biomédicales
(Orientation: Biochimie et Biologie cellulaire)

Janvier 2005



Université catholique de Louvain



10.466.271

Promoteur: Pr. Françoise Bontemps
Co-promoteur: Pr. Georges Van den Berghe

Jury: Pr. Charles Dumontet
Pr. Augustin Ferrant
Pr. Marie-Paule Mingot
Pr. Frederik Oppendoes
Pr. Jean-Marie Scheiff
Dr. Eric Van Den Neste

QU 375

Remerciements

Le moment est venu d'adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté aide et soutien tout au long de l'élaboration de ma thèse.

La personne que je tiens à remercier en premier lieu est sans aucun doute ma promotrice Françoise Bontemps. Pour sa rigueur scientifique, certes déjà proverbiale au laboratoire, mais surtout pour son extrême gentillesse, sa disponibilité, l'aide qu'elle m'a apportée dans toutes les difficultés que j'ai rencontrées et pour tout ce qu'elle m'a appris et qui dépasse largement le cadre de la recherche.

Les personnes que je tiens également à remercier particulièrement sont Monsieur Van den Berghe pour la confiance qu'il m'a accordée lorsqu'il m'a permis de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire, Eric Van Den Neste pour sa bienveillance et son soutien, et bien sûr Caroline Smal pour sa complicité de tous les jours et son amitié. Je n'oublie pas Anne Delacauw qui restera dans nos coeurs pour longtemps.

Cette thèse aurait certainement pris un autre chemin si je n'avais pas bénéficié de l'aide et surtout des conseils de Jean-François Rosier lors de notre longue collaboration. Je tiens également à remercier Jean-Luc Gala pour sa contribution au projet microarrays.

Merci aussi à Emile Van Schaftingen et Françoise Vincent de m'avoir écouté et conseillé lors de mes séminaires, ainsi qu'à Madame Franklin pour sa disponibilité.

Je suis également reconnaissante envers le Professeur Charles Dumontet, ainsi qu'envers les Professeurs Frederik Oppendoes, Augustin Ferrant, Marie-Paule Mingeot et Jean-Marie Scheiff qui ont accepté de faire partie de mon Jury de thèse et dont les remarques pertinentes m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

J'ai au moins une raison de remercier également chacune des personnes qui font ou ont fait partie de ce laboratoire et que je n'ai pas citées ainsi que ma famille et mes amis, et certainement toutes les raisons de remercier mon mari Gauthier.

RESUME

La 2-chloro-2'-désoxyadénosine (CdA, cladribine) est un agent de chimiothérapie appartenant à la famille des analogues de purines, particulièrement actif dans la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B). Pour exercer ses effets thérapeutiques, la CdA doit être phosphorylée dans les lymphocytes en CdATP. Ce dérivé, considéré comme le métabolite actif de la CdA, inhibe plusieurs enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN, comme la ribonucléotide réductase et les ADN polymérases, et active les voies de l'apoptose aussi bien dans les lymphocytes prolifératifs que dans les lymphocytes quiescents. Dans les cellules qui se divisent, l'induction de l'apoptose par la CdA résulterait principalement de l'inhibition de la synthèse d'ADN. Le but de cette thèse était de mieux comprendre le mécanisme d'action de la CdA en étudiant ses effets dans une lignée leucémique dérivée de lymphocytes d'une patiente atteinte de LLC, la lignée EHEB.

Les cellules EHEB se sont montrées moins sensibles à la CdA que des lymphocytes issus de patients atteints de LLC-B ou que d'autres lignées leucémiques. La première partie de notre travail fut dès lors de rechercher pourquoi cette lignée cellulaire présentait une résistance à la CdA. Les résultats ont montré que la ribonucléotide réductase, dont l'inhibition par la CdA est déterminante pour l'inhibition de la synthèse d'ADN, n'est que faiblement inhibée dans les cellules EHEB, ce qui est probablement dû à la faible capacité de ces cellules à accumuler le CdATP. De plus, bien que la synthèse d'ADN soit modérément inhibée 4 h après l'addition de CdA, elle est augmentée de 2 à 3 fois après 24 h. Nous avons pu expliquer cette augmentation de la synthèse d'ADN par la CdA, qui est maximale à des concentrations proches de l'IC₅₀, par une augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire.

Si une accumulation insuffisante de CdATP dans les cellules EHEB peut rendre compte de la relative résistance à la CdA de ces cellules, elle n'explique pas pourquoi la CdA produit, à des concentrations cytotoxiques, une augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire. Diverses expériences de cytométrie de flux nous ont montré que cette augmentation est due à une stimulation par la CdA de la transition des cellules de la phase G1 vers la phase S. En accord avec ces résultats, nous avons observé une augmentation d'activité de la cdk2, une protéine kinase qui joue un rôle crucial dans la transition G1/S, ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de sa cible, la protéine Rb. Nous avons également pu déterminer que l'activation de la cdk2 est corrélée à une augmentation de son expression, ainsi qu'à une diminution du taux de ses inhibiteurs, les protéines p21 et p27. Afin de savoir si l'activation de la cdk2 jouait un rôle dans l'apoptose induite par la CdA, nous avons

investigué l'effet de la roscovitine, un inhibiteur de cette enzyme, sur l'activation de la caspase-3. Nous avons observé que la roscovitine, à des concentrations où elle supprime complètement l'activation du cycle cellulaire par la CdA, réduit également, d'au moins 50%, l'activation de la caspase-3 induite par la CdA. Ce résultat indique que l'activation de la cdk2 et/ou du cycle cellulaire induite par la CdA dans les cellules EHEB n'est pas un processus qui s'oppose à la mort cellulaire, mais qui, au contraire, y contribue. Nos études ont ainsi permis l'identification d'un nouveau type de réponse cellulaire à la CdA, impliquant une activation de la cdk2 et du cycle cellulaire, qui contribuerait à l'apoptose induite par cet analogue.

SUMMARY

2-Chloro-2'-deoxyadenosine (CdA, cladribine) is a chemotherapeutic agent belonging to the family of purine analogues, which is particularly active in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). CdA has to be converted into CdATP to exert its cytotoxic effects. CdATP, the active metabolite of CdA, inhibits several enzymes involved in DNA synthesis, such as ribonucleotide reductase and DNA polymerases, and also activates apoptotic pathways in both resting and dividing lymphocytes. Inhibition of DNA synthesis, leading to DNA lesions, is considered the mechanism by which CdA exerts its cytotoxicity in dividing cells. The aim of the present work was to further investigate the mechanism of action of CdA. We performed this study in the B-CLL cell line EHEB.

EHEB cells were found less sensitive to CdA than B-CLL lymphocytes and other human lymphoblastic cell lines. Therefore, the first part of this work was devoted to unravel the mechanism(s) of resistance of EHEB cells to CdA. Results showed that inhibition of ribonucleotide reductase by CdA, which plays a major role in inhibition of DNA synthesis, is low in EHEB cells, probably because of the low capacity of EHEB cells to accumulate CdATP. Moreover, whereas DNA synthesis is slightly inhibited after a 4 h-incubation with CdA, it is surprisingly 2- to 3-fold augmented after a 24 h-incubation. This effect, which is maximal at concentrations of CdA close to its IC_{50} , is explained by an increase of the proportion of cells in the S phase of the cell cycle.

If reduced accumulation of CdATP could account, at least partially, for the resistance of EHEB cells to CdA, it could not explain why CdA produces in this cell line an increase of the number of cells in the S phase of the cell cycle. Flow cytometry experiments revealed that the increase in the proportion of cells in S phase is due to a stimulation by CdA of the passage of cells from G1 to S phase. In accordance with this result, we observed an increase of cdk2 activity, a protein kinase that plays a major role in the control of G1/S transition, and of the phosphorylation of its target, the Rb protein. We also determined that the increase of cdk2 activity is correlated with an increase of its expression and with a decrease in the level of its inhibitors p21 and p27. In order to know whether this cdk2 activation was involved in CdA-induced apoptosis, we tested the effect of roscovitine, a cdk2 inhibitor, on the activation of caspase-3. At a concentration which completely blocks the CdA-induced activation of the cell cycle, roscovitine also significantly reduces the CdA-induced activation of caspase-3, indicating that cdk2 and/or cell cycle activation play a role in apoptosis provoked by CdA in this cell line. In conclusion, our studies have led to the identification of a new mode of cellular response to CdA, involving activation of cdk2 and of the cell cycle, which appears to contribute to apoptotic cell death.

TABLE DES MATIÈRES

Abréviations	1
Chapitre I. Introduction	3
1. L'action antileucémique de la CdA	4
1.1. De la déficience en adénosine désaminase à la CdA	4
1.2. Utilisation clinique de la CdA	7
1.2.1. La leucémie à tricholeucocytes	7
1.2.2. La leucémie lymphoïde chronique	7
1.2.3. Autres désordres lymphoprolifératifs ou auto-immunitaires	10
1.3. Métabolisme de la CdA	10
1.3.1. Transport de la CdA à travers la membrane plasmique	12
1.3.2. Activation de la CdA	12
1.3.3. Catabolisme de la CdA	14
1.4. Effets de la CdA sur la synthèse des acides nucléiques	14
1.4.1. Inhibition de la réplication de l'ADN	15
1.4.2. Inhibition de la réparation de l'ADN	17
1.4.3. Inhibition de la synthèse de l'ARN	18
1.4.4. Inhibition de la méthylation de l'ADN	19
1.5. Induction de la mort cellulaire par la CdA	20
1.5.1. Apoptose et nécrose: définition et rôle dans la cytotoxicité de la CdA	20
1.5.2. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose	21
1.5.2.1. Les caspases	21
1.5.2.2. La voie intrinsèque	22
1.5.2.3. La voie extrinsèque	24
1.5.3. Activation de l'apoptose par la CdA	25
1.5.3.1. Activation de la voie intrinsèque	25
1.5.3.2. Activation de la voie extrinsèque	28
1.5.4. Implication de la nécrose dans la cytotoxicité de la CdA	29
1.5.5. Intérêt particulier de la CdA	29
2. Les mécanismes de résistance à la CdA	30
2.1. Anomalies du métabolisme de la CdA	30
2.1.1. Défaut de transport de la CdA	30

2.1.2. Diminution de l'activité de la désoxycytidine kinase.....	31
2.1.3. Augmentation de l'activité de la 5'-nucléotidase	32
2.2. Incapacité du CdATP à provoquer des lésions dans l'ADN	33
2.2.1. Surexpression de la ribonucléotide réductase	33
2.2.2. Altération des ADN polymérases	33
2.2.3. Réparation de l'ADN	33
2.3. Incapacité du CdATP à induire l'apoptose	34
3. Le cycle cellulaire.....	35
3.1. Les phases du cycle cellulaire	35
3.2. La régulation du cycle cellulaire	37
3.3. Les kinases dépendantes des cyclines.....	38
3.3.1. Propriétés et rôle des cdks.....	38
3.3.2. Régulation des cdks	39
3.4. La progression en G1 du cycle cellulaire et le passage en phase S	42
3.5. Le contrôle de la transition G1/S.....	44
3.6. Effets des analogues de nucléosides sur le cycle cellulaire	46
3.7. Le rôle des cdks dans l'apoptose	48
3.7.1. Apoptose et cycle cellulaire	48
3.7.2. Implication de la cdk2 dans l'apoptose.....	49
3.7.3. Implication d'autres cdks dans l'apoptose	50
4. Objectifs de la thèse	52
 Chapitre II. Résistance à la CdA de la lignée leucémique EHEB	 53
 Chapitre III. Analyse de la résistance de la ribonucléotide réductase à la CdA dans les cellules EHEB	 64
 Chapitre IV. Activation par la CdA du cycle cellulaire des cellules EHEB: implication dans l'apoptose	 70
 Chapitre V. Discussion générale et perspectives	 88
Références	98

Abréviations

ADA	adénosine désaminase
AIF	apoptosis-inducing factor
AMP	adénosine monophosphate
ANT	translocateur de nucléotides à adénine
AP-1	activating protein-1
APAF-1	apoptotic protease activating factor-1
ara-G	1- β -D-arabinofuranosylguanine
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM-and Rad3-related
BAPTA-AM	1,2-bis-(<i>o</i> -aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra-(acetoxymethyl) ester
CAdé	2-chloroadénine
CADP	2-chloroadénine diphosphate
CAK	cdk-activating kinase
CAMP	2-chloroadénine monophosphate
CATP	2-chloroadénine triphosphate
CdA	2-chloro-2'-désoxyadénosine, cladribine
CdADP	2-chloro-2'-désoxyadénosine diphosphate
CdAMP	2-chloro-2'-désoxyadénosine monophosphate
CdATP	2-chloro-2'-désoxyadénosine triphosphate
cdk	kinase dépendante des cyclines
Chk1	checkpoint kinase 1
Chk2	checkpoint kinase 2
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
clofarabine	2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-désoxyadénosine, CaFdA
cN-I	5'-nucléotidase cytosolique à bas Km
cN-II	5'-nucléotidase cytosolique à haut Km
cytarabine	1- β -D-arabinosylcytosine, ara-C
dAdo	2'-désoxyadénosine
dADP	2'-désoxyadénosine diphosphate
dAMP	2'-désoxyadénosine monophosphate
dATP	2'-désoxyadénosine triphosphate
dCK	désoxycytidine kinase
DD	death domain, domaine de mort
dGK	désoxyguanosine kinase
dIno	désoxyinosine
DISC	death-inducing signaling complex
DNA-PK	protéine kinase dépendante de l'ADN
dNDP	désoxyribonucléoside diphosphate
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate
DR	death receptor, récepteur de mort
EBV	Epstein-Barr virus
ecto-5'-NT	5'-nucléotidase membranaire
FADD	Fas associated death domain
Fas-R	récepteur Fas
Fas-L	ligand Fas

fludarabine	9-β-D-arabinosyl-2-fluoroadénine, F-ara-A
gemcitabine	2', 2'-difluorodésoxycytidine, dFdC
HCL	hairy cell leukemia, leucémie à tricholeucocytes
hCNT	transporteur concentratif de nucléosides humain
hENT	transporteur équilibratif de nucléosides humain
IAP	inhibiteurs des protéines apoptotiques
LLC-B	leucémie lymphoïde chronique de type B
MAPK	mitogen activated protein kinase
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide
NER	réparation par excision de nucléotides
NDP	nucléoside diphosphate
NDPK	nucleoside diphosphate kinase
NMPK	nucléoside monophosphate kinase
5'-NT	5'-nucléotidase
PARP	poly (ADP-ribose) polymérase
PCNA	antigène nucléaire des cellules proliférantes
PIKKS	phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases
PRIMA-1	p53-dependent reactivation and induction of massive apoptosis-1
RR	ribonucléotide reductase
SAHH	S-adénosyl homocystéine hydrolase
SAPK/JNK	stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase
SCID	severe combined immunodeficiency
STAT	signal transducer and activator of transcription
tBid	truncated Bid, fragment de Bid
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

Chapitre I

Introduction

Cette thèse a pour objet l'étude du mécanisme d'action de la 2-chloro-2'-désoxyadénosine (CdA, cladribine), un agent de chimiothérapie appartenant à la famille des analogues de purines. La CdA possède une remarquable activité thérapeutique dans les cancers provenant de l'expansion clonale de lymphocytes, et particulièrement dans la leucémie lymphoïde chronique de type B (LLC-B).

Notre étude a été réalisée sur la lignée leucémique EHEB, un modèle de LLC-B humaine. Comme décrit plus loin dans ce manuscrit, cette lignée s'est montrée moins sensible à la CdA que des lymphocytes prélevés chez des patients atteints de LLC-B ou même que d'autres lignées leucémiques. De plus, il est apparu que la CdA activait le cycle cellulaire de ces cellules, un fait qui n'avait jamais été décrit pour un analogue de nucléoside.

C'est pourquoi nous décrivons dans cette introduction non seulement les mécanismes par lesquels la CdA exerce son action antileucémique, mais aussi les causes possibles de résistance à ce médicament, ainsi que le cycle cellulaire, qui est habituellement inhibé par les analogues de nucléosides.

1. L'action antileucémique de la CdA

1.1. De la déficience en adénosine désaminase à la CdA

C'est la compréhension des phénomènes physiopathologiques intervenant dans la déficience en adénosine désaminase (ADA) qui est à l'origine de la synthèse et de l'utilisation thérapeutique de la CdA.

La déficience en ADA est une maladie génétique rare, caractérisée par une lymphopénie profonde touchant les lymphocytes B et T. La déficience généralisée en ADA fut mise en évidence tout à fait fortuitement par Giblett *et al.* (1972) chez deux enfants souffrant d'un syndrome d'immunodéficience sévère combinée appelé SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). C'est la consanguinité existant entre les parents de ces enfants qui a permis à ces auteurs d'en déduire qu'il s'agissait d'un déficit génétique héréditaire. Les enfants homozygotes pour un gène mutant de l'ADA souffrent d'infections opportunistes graves et répétées pouvant entraîner la mort en l'absence de traitement adéquat.

L'ADA est une protéine monomérique contenant un site catalytique et liée, dans certains tissus, à une glycoprotéine homodimérique non catalytique (binding protein), qui lie deux protéines ADA. Elle est constituée de 362 acides aminés et comprend 8 feuillets β centraux entourés de 8 hélices α périphériques. Elle contient dans la poche catalytique un atome de Zn^{++} essentiel pour l'activité catalytique. La déficience en ADA est expliquée dans la majorité des cas par des mutations ponctuelles ou des délétions (Wilson *et al.*, 1991).

Les substrats naturels de l'ADA sont l'adénosine et la 2'-désoxyadénosine (dAdo). Le syndrome d'immunodéficience associé à la déficience en ADA résulte principalement de l'incapacité de l'organisme à désaminer la dAdo. Dans une cellule normale, la dAdo, provenant du catabolisme de l'ADN, peut être désaminée par l'ADA en 2'-désoxyinosine (dIno) qui sera finalement catabolisée en acide urique (figure 1A). La dAdo peut également être phosphorylée en dAMP par la désoxycytidine kinase (dCK), l'enzyme limitante de la voie de récupération des désoxynucléosides. Le dAMP est ensuite converti en dATP sous l'action successive de la nucléoside monophosphate kinase et de la nucléoside diphosphate kinase. Grâce à l'action conjuguée de la dCK et de l'ADA, la dAdo est maintenue à une concentration très faible dans l'organisme. Lorsque l'ADA est déficiente, la dAdo ne peut plus être désaminée (figure 1B). Par contre, elle reste utilisable par la dCK. Dans les lymphocytes, la vitesse de phosphorylation de la dAdo excède la vitesse de déphosphorylation du dAMP catalysée par la 5'-nucléotidase (5'-NT) cytoplasmique, ce qui mène à une accumulation de dATP. C'est pourquoi les lymphocytes de patients déficients en ADA présentent un taux élevé de dATP.

Ce sont Cohen *et al.* qui, en 1978, établirent les premiers la relation entre l'accumulation intracellulaire du dATP et la lymphotoxité qui y est associée. Sachant que le dATP est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase (RR), l'enzyme qui catalyse la réduction des ribonucléosides diphosphates en 2'-désoxyribonucléosides diphosphates, ces auteurs proposèrent que le dATP, en s'accumulant à de très hautes concentrations dans les lymphocytes des patients déficients en ADA, inhibe leur capacité à former les dNTPs requis pour la synthèse d'ADN et dès lors leur prolifération en réponse à des agents infectieux (figure 1B).

A partir de ces observations, des stratégies thérapeutiques ont été explorées visant à provoquer dans les lymphocytes une accumulation de dérivés triphosphates ayant le même

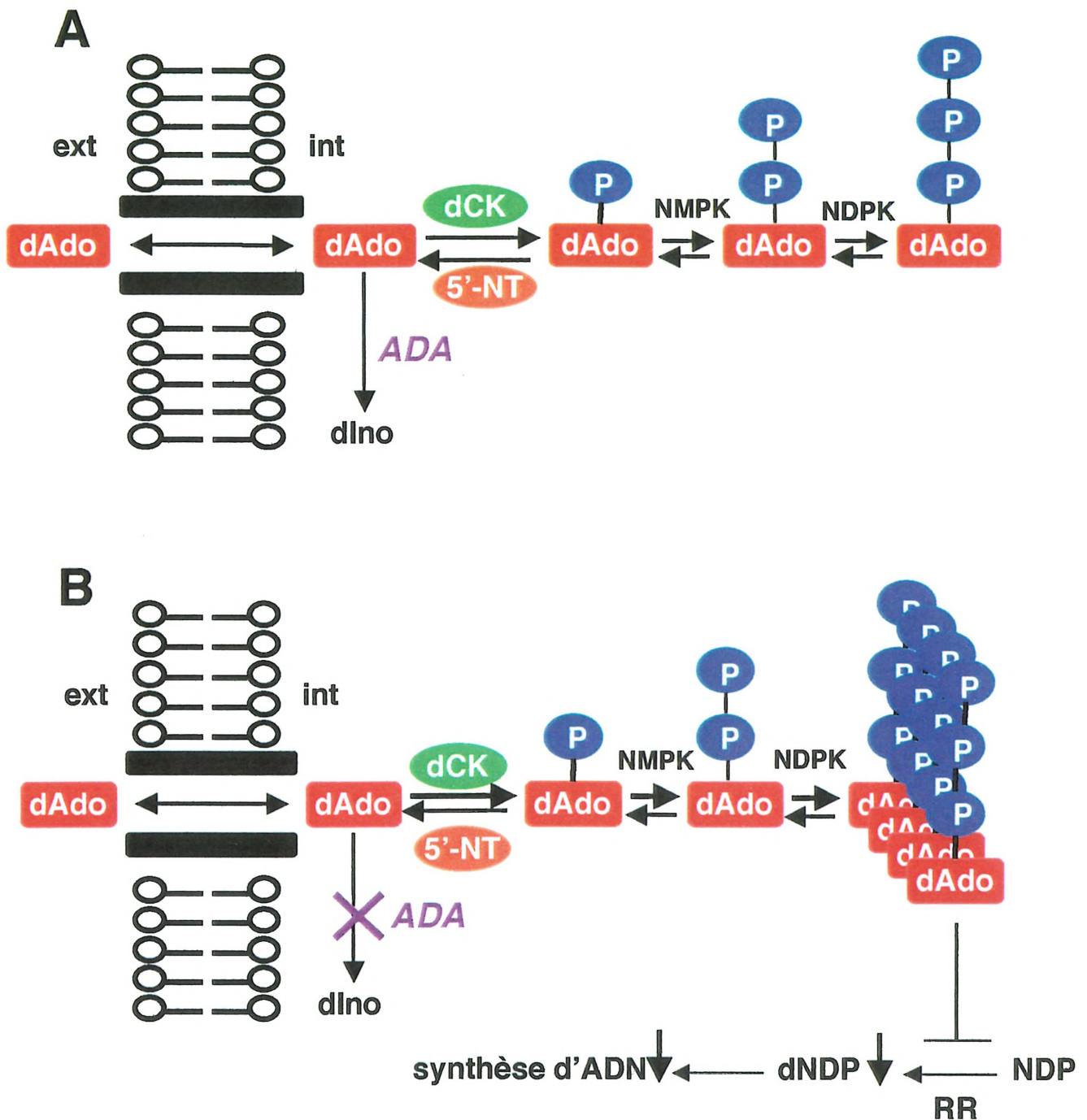


Figure 1: Métabolisme de la 2'-désoxyadénosine (dAdo) dans les lymphocytes normaux (A) et dans les lymphocytes déficients en adénosine désaminase (B).

ADA: adénosine désaminase; dCK: désoxycytidine kinase; 5'-NT: 5'-nucléotidase; NMPK: nucléoside monophosphate kinase; NDPK: nucléoside diphosphate kinase; dIno: désoxyinosine; RR: ribonucléotide réductase; NDP: nucléoside diphosphate; dNDP: désoxynucléoside diphosphate.

effet que le dATP, dans le but de freiner la réplication de l'ADN et la prolifération de lymphocytes que l'on rencontre dans certaines leucémies et désordres immunitaires. Carson *et al.*, en 1980, synthétisèrent ainsi toute une série de désoxynucléosides résistants à l'action de l'ADA et ils testèrent leur effet sur des lignées lymphoblastoïdes en culture. La CdA s'est révélée comme étant le désoxynucléoside le plus puissant pour arrêter la prolifération cellulaire, avec un IC_{50} de 3 nM après 72 heures d'incubation. Cette molécule, dont la structure est présentée à la figure 2, résulte de la substitution, par un atome de chlore, de l'hydrogène situé en position 2 du cycle purique de la dAdo.

Comme expliqué plus loin, c'est dans les lymphocytes que l'activité de la dCK, l'enzyme responsable de la phosphorylation et de l'activation de la CdA, est la plus élevée, ce qui explique la spécificité de cette molécule pour ce type cellulaire.

1.2. Utilisation clinique de la CdA

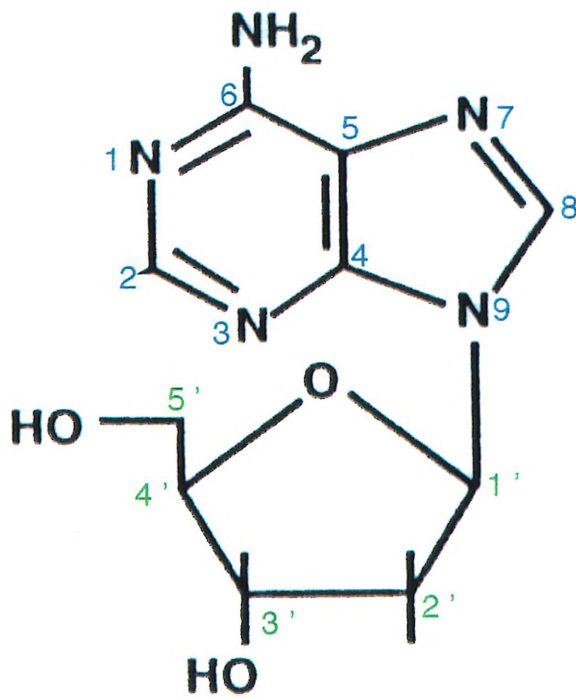
1.2.1. La leucémie à tricholeucocytes

La leucémie à tricholeucocytes (Hairy Cell Leukemia, HCL) est une leucémie chronique rare, ne représentant que 2 à 3% de toutes les leucémies de l'adulte. Elle est issue de lymphocytes B matures et se caractérise par la présence dans le sang de cellules chevelues typiques, d'où son nom.

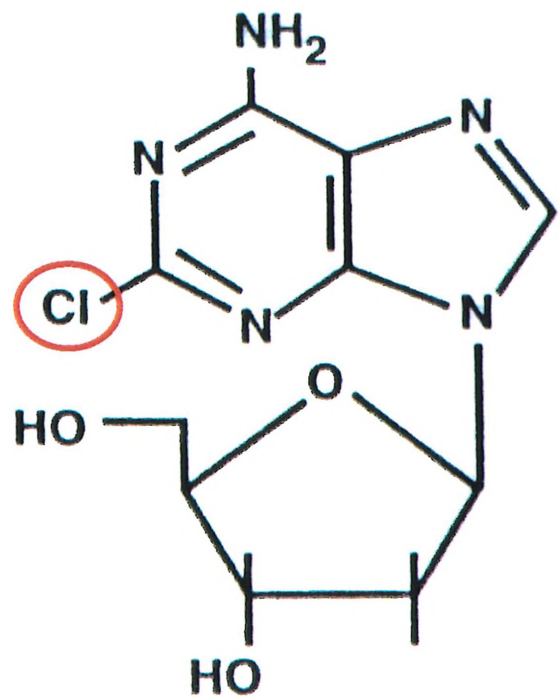
C'est chez les patients atteints de ce type de leucémie que la CdA a donné les résultats les plus gratifiants. Une rémission complète de la maladie est en effet observée dans 85 à 90% des cas après un seul traitement à la CdA (Piro *et al.*, 1990; Saven *et al.*, 1993) qui dès lors est devenue le médicament de choix pour ces patients. Cependant, même en cas de rémission complète, il y a persistance d'une population de cellules leucémiques (clone de lymphocytes B), qui est décrite comme maladie résiduelle minimale, au niveau de la moelle osseuse (Hakimian *et al.*, 1993; Filleul *et al.*, 1994; Konwalinka *et al.*, 1995 ; Zak *et al.*, 2000). La persistance de ces cellules malignes peut expliquer les rechutes que l'on observe chez certains patients (Wheathon *et al.*, 1996).

1.2.2. La leucémie lymphoïde chronique

Les résultats encourageants obtenus avec la CdA dans le traitement de la leucémie à tricholeucocytes ont mené à son utilisation dans la LLC-B (Saven *et al.*, 1994; Delannoy *et*



2'-désoxyadénosine



2-chloro-2'-désoxyadénosine
(CdA, Cladribine)

Figure 2: Structure de la 2-chloro-2'-désoxyadénosine.

La substitution par un chlore de l'hydrogène sur le deuxième carbone du noyau purique distingue la 2-chloro-2'-désoxyadénosine de la 2'-désoxyadénosine.

al., 1995). La LLC-B, qui représente 95% des cas de LLC, est la forme de leucémie la plus fréquemment rencontrée chez l'adulte dans les pays occidentaux. Elle est souvent d'évolution lente et touche généralement des personnes âgées de plus de 50 ans (Dighiero *et al.*, 1996). Elle est caractérisée par l'accumulation progressive de petits lymphocytes B malins morphologiquement matures et apparentés à des cellules mémoire (Rosenwald *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2001).

L'expansion progressive du clone leucémique de lymphocytes B dans la moelle osseuse, le sang et les organes lymphoïdes s'explique par le fait que la durée de vie des lymphocytes tumoraux dans le sang des patients est fortement allongée (plusieurs mois) par rapport à la durée de vie des lymphocytes normaux (20 jours). Ceci s'explique par le fait qu'elles ne peuvent pas mourir par apoptose (Dighiero *et al.*, 1996; Caligaris-Cappio *et al.*, 2000; Kipps *et al.*, 2000). Cette résistance à l'apoptose peut être due, entre autres, à une expression accrue de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Hanada *et al.*, 1993). Dans la LLC-B, il y a une proportion des cellules clonales qui sont arrêtées en phase G0 du cycle cellulaire (cellules quiescentes) (Dörmer *et al.*, 1983). Des études récentes montrent qu'il y a aussi une proportion des cellules LLC-B qui prolifèrent *in vivo* (Granziero *et al.*, 2001). En effet, il existe un turnover des lymphocytes chez des patients atteints de LLC-B, qui varie de 1 à 10 % par semaine selon les patients, ce qui indique bien que le clone de lymphocytes peut se répliquer d'une façon non négligeable (Messmer *et al.*, 2002). Ces données expliquent pourquoi certains patients maintiennent un nombre de globules blancs faible et stable pendant de longues périodes tandis que d'autres voient ce nombre augmenter exponentiellement. Ces données impliquent que la LLC-B est une maladie accumulative dynamique (Keating *et al.*, 2003).

Lorsqu'il est requis, le traitement de ces patients comprend classiquement des agents alkylants (chlorambucil) en monothérapie ou associés aux glucocorticoïdes (prednisone), la polychimiothérapie et la splénectomie. Ces agents sont efficaces, mais ne permettent pas, dans la majorité des cas, d'obtenir une rémission complète. De ce fait, les patients rechutent quasi invariablement et il est nécessaire de reprendre régulièrement le traitement. L'efficacité clinique des analogues de purines dans la LLC-B s'est révélée à la fin des années 80 dans le cas de la fludarabine (9- β -D-arabinosyl-2-fluoroadénine) (Keating *et al.*, 1989), et dans les années 90 dans le cas de la CdA (Saven *et al.*, 1994). En monothérapie, ces substances sont les plus efficaces contre la LLC-B. Par rapport aux traitements

classiques, la CdA permet d'obtenir des taux de rémission complète plus élevés et dont la durée est aussi plus longue. Le taux de réponse totale à la CdA est de 80% chez les patients non traités préalablement, avec une durée moyenne de réponse de 14,7 mois (Pott *et al.*, 1997 ; Robak *et al.*, 2000).

Dans la LLC-B, comme dans la leucémie à tricholeucocytes, il y a persistance de lymphocytes leucémiques dans la moelle osseuse à la fin du traitement, ce qui explique qu'il y a aussi quasi systématiquement une rechute après usage des analogues de nucléosides en monothérapie (Delannoy *et al.*, 1995; Juliusson *et al.*, 1996; Robak *et al.*, 1999; Karlsson *et al.*, 2002; Robak *et al.*, 2002 a et b).

Plus récemment, d'autres molécules, comme le Rituximab (anticorps monoclonaux anti-CD20) et le Campath-1H (anticorps monoclonaux anti-CD52) ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique de la LLC-B. Ils sont utilisés dans les cas de leucémie réfractaire à la fludarabine et aux agents alkylants (Osterborg *et al.*, 1997; Keating *et al.*, 2002). En clinique, la fludarabine combinée avec le cyclophosphamide et le rituximab produisent plus de 90% de réponse (Keating *et al.*, 2002).

1.2.3. Autres désordres lymphoprolifératifs ou auto-immunitaires

En plus de la HCL et de la LLC-B, la CdA exerce une certaine activité dans le traitement d'autres cancers hématologiques, parmi lesquels les leucémies myéloïdes aiguës (Nagourney *et al.*, 1993 ; Van Den Neste *et al.*, 1998), la leucémie lymphoblastique aiguë (Carson *et al.*, 1980), la macroglobulinémie de Waldenström et les lymphomes non-Hodgkiniens. Le taux de rémission complète obtenu dans ces maladies est variable. Etant donné ses propriétés immunosuppressives, la CdA a également été utilisée, mais sans résultats, dans certains cas de maladies du greffon contre l'hôte réfractaires aux traitements classiques. Elle a finalement été utilisée, mais avec des résultats mitigés, dans l'anémie hémolytique auto-immune, ainsi que dans le purpura thrombocytopénique, l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux systémique, etc.

1.3. Métabolisme de la CdA

Pour qu'elle puisse exercer ses effets cytotoxiques, la CdA doit être transportée dans la cellule et être phosphorylée en CdATP (figure 3).

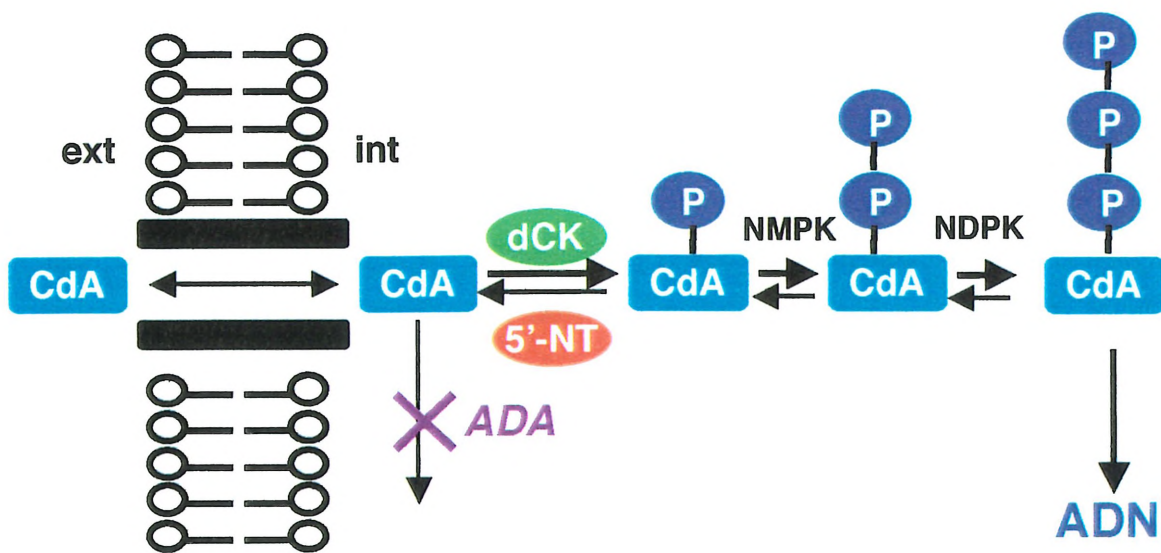


Figure 3: Métabolisme de la 2-chloro-2'-désoxyadénosine (CdA).

ADA: adénosine désaminase; dCK: désoxycytidine kinase; 5'-NT: 5'-nucléotidase; NMPK: nucléoside monophosphate kinase; NDPK: nucléoside diphosphate kinase.

1.3.1. Transport de la CdA à travers la membrane plasmique

Le passage de la CdA à travers la membrane plasmique est médié par les transporteurs spécifiques des nucléosides (NTs). Ces NTs sont soit équilibratifs: hENT1 et hENT2, soit concentratifs: hCNT1, hCNT2 et hCNT3. Les deux types de transporteurs n'acceptent que les composés déphosphorylés (Crawford *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1999).

Le transport de la CdA et de la fludarabine est assuré presque exclusivement par hENT1 et hENT2, et dans une moindre mesure par hCNT3, qui sont tous trois exprimés à la surface des lymphocytes LLC-B (Pastor-Anglada *et al.*, 2004). Ce transport est bidirectionnel, ce qui signifie que la CdA intracellulaire peut sortir dans le milieu extracellulaire, engendrant une concentration identique de part et d'autre de la membrane plasmique (Alessi-Severini *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2000).

1.3.2. Activation de la CdA

Dans les lymphocytes, la CdA, contrairement à la dAdo, ne peut être désaminée par l'ADA. Dès lors, elle va être uniquement utilisée et phosphorylée par la dCK, une enzyme à large spécificité qui catalyse aussi la phosphorylation de plusieurs autres analogues de nucléosides comme la fludarabine, la cytarabine (1- β -D-arabinosylcytosine, ara-C) et la gemcitabine (2',2'-difluorodésoxycytidine, dFdC) (Carson *et al.*, 1980; Heineman *et al.*, 1988). L'activité dCK est la plus élevée dans les cellules hématopoïétiques et les tissus lymphoïdes (Ho *et al.*, 1973; Spasokoukotskaja *et al.*, 1995), ce qui explique le succès clinique des analogues de nucléosides dans le traitement de la leucémie. Vu que la dCK est exprimée durant tout le cycle cellulaire, la phosphorylation de la CdA se fait aussi bien dans les cellules quiescentes que dans les cellules en division. Dans certains types cellulaires, l'activité de la dCK peut cependant augmenter lorsque les cellules entrent en phase S du cycle cellulaire (Wan *et al.*, 1978; Hengstschlager *et al.*, 1993).

La dCK convertit la CdA en 2-chloro-2'-désoxyadénosine monophosphate (CdAMP) avec un Km de 5 μ M (Eriksson *et al.*, 1991; Arner *et al.*, 1995). Cette première étape de phosphorylation est déterminante pour la cytotoxicité de la CdA. Les lignées déficientes en dCK sont en effet résistantes à l'action de la CdA. Le CdAMP formé à partir de la CdA est phosphorylé en 2-chloro-2'-désoxyadénosine diphosphate (CdADP) grâce à la nucléoside monophosphate kinase (NMPK) et finalement en 2-chloro-2'-désoxyadénosine triphosphate (CdATP) par la nucléoside diphosphate kinase (NDPK)

(Carson *et al.*, 1980). La NMPK étant peu active vis-à-vis du CdAMP, elle limite sa conversion en CdADP et CdATP. Le CdAMP est habituellement le métabolite intracellulaire de la CdA le plus abondant (Avery *et al.*, 1989; Liliemark *et al.*, 1995), mais c'est le CdATP qui est considéré comme le métabolite actif de la CdA et qui est responsable de sa cytotoxicité.

La CdA peut aussi pénétrer dans la mitochondrie puisque hENT1 y est exprimé (Lai *et al.*, 2004) et y être phosphorylée, avec un Km d'environ 80 μ M, par la désoxyguanosine kinase (dGK), une enzyme qui phosphoryle les désoxynucléosides puriques dans la matrice mitochondriale et fournit les dNTPs nécessaires pour la synthèse de l'ADN mitochondrial (Wang *et al.*, 1993; Arner *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1996; Hentosh *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998; Sjoberg *et al.*, 1998). Cependant, comme la fraction de CdA phosphorylée par la dGK est inférieure à 15% dans la plupart des tissus, la dCK est la principale enzyme à activer la CdA.

Le CdATP peut être reconverti en CdA par des déphosphorylations successives dont l'étape finale et limitante est la conversion du CdAMP en CdA, catalysée par une 5'-NT cytosolique (Carson *et al.*, 1983). Cette enzyme catalyse la réaction inverse de la dCK, c'est à dire qu'elle déphosphoryle les monophosphates de nucléosides et d'analogues de nucléosides en leurs nucléosides respectifs par hydrolyse du lien ester entre le carbone 5' et le groupe phosphate. Elle appartient à une famille comprenant un large groupe d'enzymes, différant par leur localisation cellulaire, leur sensibilité au pH, et leur inhibition ou stimulation par l'ATP. Deux types de 5'-NT sont impliquées dans la déphosphorylation des nucléosides monophosphates: les 5'-NT cytosoliques et les 5'-NT membranaires (ecto-5'-NT). Le rôle physiologique des ecto-5'-NT membranaires est la récupération des nucléotides puriques extracellulaires. En effet, elles les hydrolysent en nucléosides capables d'entrer dans la cellule via les protéines de transport des nucléosides (Resta *et al.*, 1998). Les 5'-NT cytosoliques, quant à elles, sont réparties en deux groupes, celles à bas Km (cN-I) spécifiques des pyrimidines, et celles à haut Km (cN-II) spécifiques des purines. Ces dernières déphosphorylent les nucléosides monophosphates intracellulaires, comme l'AMP, le dAMP, mais aussi le CdAMP.

L'accumulation intracellulaire de CdATP dépend des activités relatives de la dCK et de la 5'-NT cytosolique. Les lymphocytes présentent un rapport dCK/5'-NT beaucoup plus élevé que les autres types cellulaires, ce qui favorise la formation de CdATP au sein de ces

cellules et explique la lymphotoxicité de la CdA (Carson *et al.*, 1981; Carson *et al.*, 1983). Plusieurs études ont par ailleurs montré que la réponse thérapeutique à la CdA dans les lymphocytes LLC-B pouvait être influencée par le rapport dCK/5'-NT (Kawasaki *et al.*, 1993; Arner *et al.*, 1994).

1.3.3. Catabolisme de la CdA

In vivo, la CdA peut être catabolisée en 2-chloroadénine (CAde). En effet, on retrouve de la CAde dans le plasma et l'urine de patients ayant reçu de la CdA, la concentration en CAde retrouvée chez ces patients étant cinq fois plus importante après administration orale de CdA qu'après administration intraveineuse (Lindemalm *et al.*, 2004). Cette observation suggère qu'*in vivo*, la CAde est formée principalement par l'hydrolyse acide de la CdA dans l'estomac ou par dégradation enzymatique par des phosphorylases bactériennes présentes dans les intestins (Liliemark *et al.*, 1997). La CAde peut aussi provenir du clivage phosphorolytique de la CdA par la méthylthioadénosine phosphorylase, une enzyme présente dans le foie, le muscle, la prostate et le sang périphérique (Fabianowska-Majewska *et al.*, 1994; Albertioni *et al.*, 1995).

La CAde peut être métabolisée par l'adénine phosphoribosyltransférase en son nucléoside monophosphate correspondant, le CAMP, qui est ensuite converti par d'autres kinases en CADP et CATP (Bontemps *et al.*, 2000). La CAde peut induire l'apoptose dans les cellules LLC-B *in vitro*, mais est moins toxique que la CdA. En effet, si la CdA est cytotoxique à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Carson *et al.*, 1983), la CAde ne l'est qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire (Bontemps *et al.*, 2000), qui ne sont thérapeutiquement pas atteignables. On pense donc que la CAde ne joue pas de rôle dans l'effet thérapeutique de la CdA.

1.4. Effet de la CdA sur la synthèse des acides nucléiques

La CdA affecte de plusieurs façons la synthèse de l'ADN et le maintien de son intégrité. Elle peut également entraver la synthèse de l'ARN. Ces effets expliquent en grande partie sa cytotoxicité et peuvent être à l'origine du déclenchement de la mort cellulaire (voir section 1.5).

1.4.1. Inhibition de la réplication de l'ADN

Un des principaux mécanismes par lequel s'exerce la cytotoxicité de la CdA dans les cellules en division est une inhibition de la réplication de l'ADN, laquelle engendre un arrêt de la prolifération cellulaire. Une inhibition de la synthèse d'ADN à des concentrations en CdA inférieures ou égales à 1 μM a été démontrée dans plusieurs lignées de cellules leucémiques (Carson *et al.*, 1980; Carson *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1986; Griffig *et al.*, 1989; Hirota *et al.*, 1989) ainsi que dans des lymphocytes humains (Sasvari-Szekeli *et al.*, 1998). La CdA inhibe la synthèse d'ADN en inhibant la RR et diverses enzymes impliquées directement dans la synthèse de la molécule d'ADN.

Inhibition de la ribonucléotide réductase

Les désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs) requis pour la réplication de l'ADN sont principalement fournis par l'action de la RR, qui réduit les ribonucléosides diphosphates (NDPs) en leurs désoxyribonucléosides diphosphates (dNDPs) correspondants (Reichard *et al.*, 1987). Ceux-ci sont ensuite phosphorylés par la nucléoside diphosphate kinase en leurs dérivés triphosphates (dNTPs), précurseurs directs de l'ADN.

La RR est constituée de deux protéines non identiques appelées M1 et M2, toutes deux nécessaires à son activité. Celle-ci est étroitement contrôlée par des interactions allostériques, de façon à fournir une proportion adéquate des divers dNTPs. La sous-unité M1 de l'enzyme contient deux sites: le site d'activité, qui détermine l'activité du site catalytique, et le site de spécificité, qui détermine la spécificité du site catalytique envers le substrat. L'occupation du site d'activité par l'ATP rend l'enzyme active, mais l'occupation de ce même site par le dATP arrête toute activité de l'enzyme. La sous-unité M1 est présente durant tout le cycle cellulaire des cellules prolifératives, tandis que la sous-unité M2 est exprimée principalement pendant la phase S du cycle cellulaire. Dans les cellules quiescentes, ni les protéines M1 et M2, ni les ARNm de ces protéines ne sont détectables (Bjorklund *et al.*, 1990).

Le CdATP qui s'accumule intracellulairement à partir de la CdA est un des plus puissants inhibiteurs connus de la RR, avec un IC_{50} compris entre 0,1 et 0,3 μM (à comparer avec un IC_{50} de 45 μM pour le dATP, l'effecteur négatif physiologique de l'enzyme) (Parker *et al.*, 1988 ; Griffig *et al.*, 1989). Il agit en prenant la place du dATP sur le site d'activité de l'enzyme. Les concentrations de CdATP qui inhibent la RR sont

inférieures aux concentrations pouvant être atteintes dans les cellules leucémiques durant une thérapie, qui sont de l'ordre de 5 μ M (Albertioni *et al.*, 1998). Ceci explique que la concentration des dNTPs s'abaisse rapidement après administration de CdA (Griffing *et al.*, 1989; Wilson *et al.*, 1998).

La chute des dNTPs conduit à une inhibition de la synthèse d'ADN et à une inhibition de la prolifération cellulaire. La baisse du dATP, nucléotide avec lequel le CdATP est en compétition pour son incorporation dans l'ADN, peut en outre favoriser l'incorporation de ce dernier dans l'ADN. D'autre part, la diminution du dCTP, un rétroinhibiteur de la dCK, va favoriser l'activité de cette enzyme et ainsi la phosphorylation de la CdA en son métabolite actif.

Inhibition des ADN polymérases et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN

Le CdATP est un bon substrat de l'ADN polymérase α et peut être incorporé à la place de son homologue naturel, le dATP, à l'extrémité 3' de la chaîne d'ADN en cours d'élongation, d'autant plus que, comme expliqué plus haut, la concentration en dATP est diminuée suite à l'inhibition de la RR. L'encombrement stérique dû à l'atome de chlore gêne les ADN polymérases dont la progression le long du brin d'ADN ralentit (Parker *et al.*, 1988; Hentosh *et al.*, 1990; Chunduru *et al.*, 1993). Des études *in vitro* ont montré que l'ADN polymérase α ne s'arrêtait que lorsqu'il y avait incorporation dans l'ADN de plusieurs résidus consécutifs de CdA (Hentosh *et al.*, 1990; Chunduru *et al.*, 1993), ce qui en fait un inhibiteur moins puissant que la fludarabine qui est capable de bloquer quasi totalement l'élongation du brin par la polymérase α après incorporation d'un seul résidu dans l'ADN (Tseng *et al.*, 1982; Huang *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1995).

Par un mécanisme différent de celui décrit pour l'ADN polymérase α , la CdA pourrait également inhiber l'ADN polymérase ϵ , comme le fait la fludarabine. L'ADN polymérase ϵ possède, en plus de son activité polymérase, une activité exonucléase 3'→5' qui lui confère la capacité d'enlever les résidus de fludarabine incorporés dans l'ADN (Huang *et al.*, 1990). Cependant, une fois la réaction d'excision terminée, la polymérase ϵ reste associée aux produits de la réaction, ce qui lui enlève la capacité ultérieure de polymériser l'ADN (Kamiya *et al.*, 1996). La possibilité que la CdA exerce le même effet que la fludarabine n'a pas encore été étudié.

Outre les ADN polymérases, le CdATP peut inhiber les ADN primases (Parker *et al.*, 1988). Vu qu'il s'incorpore à l'extrémité 3' des brins d'ADN en cours d'élongation, il pourrait également inhiber l'ADN ligase, comme cela a été décrit pour la fludarabine (Yang *et al.*, 1992).

La CdA inhibe non seulement la synthèse de l'ADN génomique, mais également celle de l'ADN mitochondrial. En effet, comme expliqué plus haut, grâce à l'action de la dGK, le CdATP s'accumule aussi dans la mitochondrie où il peut inhiber les ADN polymérases mitochondriales (Parker *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 2001).

1.4.2. Inhibition de la réparation de l'ADN

Il est logique de penser que les mécanismes qui produisent une inhibition de la synthèse d'ADN répllicative produisent aussi une inhibition de la synthèse d'ADN réparatrice. Certains mécanismes de réparation de l'ADN comprennent en effet une étape de synthèse qui a pour rôle de combler la brèche laissée par l'excision de la lésion ayant induit cette réparation.

L'ADN polymérase β est une polymérase impliquée dans la réparation de l'ADN. Des études *in vitro* sur de l'ADN synthétique ont montré que le CdATP est un bon substrat de cette enzyme qui peut l'incorporer à la place du dATP dans l'ADN au cours de la réparation (Parker *et al.*, 1988; Chunduru *et al.*, 1993). Bien que le CdATP soit un moins bon substrat de l'ADN polymérase β que de l'ADN polymérase α , l'incorporation d'un seul résidu de CdA par la polymérase β suffit à inhiber quasi totalement la synthèse subséquente d'ADN (Hentosh *et al.*, 1990; Chunduru *et al.*, 1993). L'ADN polymérase β est par contre insensible à la fludarabine (Tseng *et al.*, 1982; Parker *et al.*, 1988).

Ces études sur enzymes purifiées et substrats synthétiques pourraient expliquer l'inhibition de la réparation de l'ADN que l'on observe dans des cellules intactes. En effet, la CdA, à des concentrations cliniquement atteignables, inhibe la synthèse réparatrice de l'ADN qui se produit spontanément dans les lymphocytes LLC-B (Seto *et al.*, 1986 ; Van Den Neste *et al.*, 1999). Cette inhibition de la réparation ne serait cependant pas suffisante pour engendrer une cytotoxicité significative, comme suggéré pour la fludarabine (Huang *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2003; Sampath *et al.*, 2003). La CdA inhibe également la synthèse réparatrice faisant suite à des lésions de l'ADN induites par les radiations ionisantes (Kuwabara *et al.*, 1991) et par les UV (Van Den Neste *et al.*, 2002), et la fludarabine inhibe

celles induites par les agents alkylants (Li *et al.*, 1997; Yamauchi *et al.*, 2001). Ces deux analogues pourraient potentialiser les conséquences de ces dommages dans l'ADN en empêchant leur réparation (Begleiter *et al.*, 1988; Kuwabara *et al.*, 1991; Sandoval *et al.*, 1996; Van Den Neste *et al.*, 1999; Van Den Neste *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2001; Van Den Neste *et al.*, 2002), avec en corollaire plus de mort cellulaire par apoptose (Pettit *et al.*, 1999 a et b; Rao *et al.*, 2003). Si la CdA peut potentialiser l'effet d'agents endommageant l'ADN, ceux-ci peuvent également potentialiser l'effet de la CdA. En effet, l'induction de lésions dans l'ADN par ces agents stimule sa réparation, ce qui pourrait favoriser l'incorporation de CdA dans l'ADN et de cette manière sa cytotoxicité, comme cela a déjà été décrit pour la fludarabine (Rao *et al.*, 2003; Pettit *et al.*, 2003).

1.4.3. Inhibition de la synthèse de l'ARN

Les analogues de nucléosides comme la CdA et la fludarabine peuvent inhiber la synthèse d'ARN dans les lymphocytes (Seto *et al.*, 1985). Les mécanismes par lesquels agissent ces deux agents sont cependant différents. La fludarabine, étant un composé arabinosyl, peut s'incorporer dans l'ARN en cours d'élongation à la place de l'ATP et induire la terminaison prématurée du transcrit d'ARN (Gandhi *et al.*, 2002). La CdA, étant un désoxyribonucléoside, ne peut être incorporée dans l'ARN à un niveau significatif (Carson *et al.*, 1983; Griffig *et al.*, 1989). Cependant, son incorporation dans l'ADN par la polymérase α peut gêner la progression des ARN polymérases le long du brin d'ADN (Hentosh *et al.*, 1995a). De plus, cette incorporation, si elle se fait dans des séquences essentielles pour la régulation transcriptionnelle, peut avoir plusieurs autres conséquences. Premièrement, l'ARN polymérase II ne s'attache pas aussi bien au niveau de promoteurs contenant des résidus de CdA (Hentosh *et al.*, 1995a; Hartman *et al.*, 2004). Deuxièmement, lorsque cette ARN polymérase est liée à un promoteur substitué par la CdA, sa conformation s'altère, ce qui induit une augmentation de son clivage protéolytique par l'endoprotéinase glu-C (Hentosh *et al.*, 1995a). Troisièmement, certains facteurs de transcription peuvent ne pas se lier aussi bien au niveau de promoteurs contenant de la CdA et, lorsqu'ils sont liés, être séquestrés sur l'ADN, ne pouvant alors plus se dissocier et réinitier la transcription (Hentosh *et al.*, 1995a; Hartman *et al.*, 2004).

Les conséquences de cette inhibition de la synthèse d'ARN par la CdA ou la fludarabine sont une répression de la transcription de gènes et une déplétion de certaines

protéines, principalement des protéines à courte demi-vie encodées par des ARNm à courte demi-vie, qui peuvent être essentielles pour la survie (Huang *et al.*, 2000), comme par exemple Mcl-1 (Perez-Galan *et al.*, 2002) ou Bcl-2 (Petersen *et al.*, 1996 ; Gottardi *et al.*, 1997), bien que cela ait été contesté pour cette dernière protéine (Perez-Galan *et al.*, 2002). Pour la fludarabine, une corrélation entre l'inhibition de la synthèse d'ARN et la mort des lymphocytes LLC-B a pu être montrée (Huang *et al.*, 2000).

Comme la CdA peut être incorporée dans l'ADN mitochondrial, ainsi qu'expliqué plus haut, elle pourrait aussi inhiber la transcription de cet ADN. Elle pourrait aussi l'inhiber indirectement suite à l'inhibition de la RR. Celle-ci en effet produit une inhibition de la réduction de l'ADP en dADP notamment, ce qui pourrait entraîner une élévation de la concentration en ADP cytosolique, l'influx de ce dernier dans la mitochondrie et une augmentation de la concentration en ATP mitochondrial, un fait connu pour inhiber l'activité de l'ARN polymérase mitochondriale (Enriquez *et al.*, 1996). Une inhibition de la transcription de l'ARN mitochondrial aurait pour conséquence une réduction des taux de protéines mitochondriales nécessaires au transport des électrons et aux phosphorylations oxydatives.

1.4.4. Inhibition de la méthylation de l'ADN

Une inhibition de la phosphorylation de la dAdo par la CdA, ainsi que de sa désamination, a été décrite par Fabianowska-Majewska *et al.* (1995). Cette inhibition résulterait en une élévation de la concentration de la dAdo, ce qui peut inactiver la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH), une enzyme qui hydrolyse la S-adénosylhomocystéine en adénosine et homocystéine (Fabianowska *et al.*, 1994 a et b; Warzocha *et al.*, 1997). L'inactivation de cette enzyme peut provoquer à son tour une élévation de la S-adénosylhomocystéine, ce qui peut inhiber les réactions de transméthylations, parmi lesquelles la méthylation de l'ADN par l'ADN méthyltransférase. La méthylation de l'ADN est une modification qui se produit après sa synthèse et qui est impliquée dans la régulation de l'expression de certains gènes. Une diminution de la méthylation de l'ADN a de fait été observée dans des cellules K562 (leucémie myéloïde chronique) incubées en présence de CdA (Wyczechowska *et al.*, 2003). On ne sait cependant pas encore si ce mécanisme est réellement impliqué dans la cytotoxicité de la CdA. L'inactivation de la SAHH provoquerait également une diminution de la production d'homocystéine, un accepteur de méthyle dans la réaction de conversion

du 5-méthyltétrahydrofolate en tétrahydrofolate catalysée par la méthionine synthase. Une moindre formation de tétrahydrofolate, nécessaire à la synthèse de purines dépendante du folate, provoquerait une inhibition de la synthèse de nucléotides et freinerait indirectement la prolifération cellulaire (Warzocha et al., 1997). Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée.

En conclusion, la CdA peut inhiber la réplication, la réparation et la méthylation de l'ADN, ainsi que la synthèse d'ARN, ce qui va créer des dommages cellulaires qui vont finalement provoquer la mort cellulaire par apoptose et/ou par nécrose.

1.5. Induction de la mort cellulaire par la CdA

1.5.1. Apoptose et nécrose: définition et rôle dans la cytotoxicité de la CdA

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mode physiologique normal de mort cellulaire, essentiel au développement de l'embryon et à l'entretien des tissus adultes. Elle se différencie de la nécrose, une forme de mort dite accidentelle.

La nécrose résulte d'agressions massives du milieu extérieur, comme l'ischémie, des températures extrêmes, ou des traumatismes physiques. Elle se caractérise par une perte d'intégrité de la membrane plasmique et une augmentation rapide du volume cellulaire, ce qui mène à un gonflement des organites intracellulaires et à leur éclatement. Les enzymes lysosomiales détruisent alors le contenu cellulaire qui est ensuite déversé dans le milieu extracellulaire, provoquant une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est quant à elle induite par des stimuli spécifiques, physiologiques ou pathologiques, intra- ou extracellulaires, tels qu'une privation en facteurs de croissance ou des lésions dans l'ADN. L'intégrité de la membrane cellulaire est conservée jusque dans les phases tardives du processus et une diminution du volume cellulaire est observée. La chromatine se condense à la périphérie du noyau et la cellule se fragmente en corps apoptotiques, contenant les restes du noyau, des mitochondries et d'autres organites. Les corps apoptotiques sont ensuite rapidement phagocytés par des macrophages. La mort par apoptose ne provoque pas de réponse inflammatoire (Kerr *et al.*, 1972). De plus, à la différence de la nécrose, l'apoptose est un processus actif qui requiert de l'énergie, l'activation d'enzymes et la synthèse de protéines.

L'apoptose peut être impliquée tant dans des processus physiologiques que pathologiques. Ainsi, elle intervient dans l'élimination de cellules âgées ou endommagées et dans la dégénérescence des cellules surnuméraires, en particulier lors du développement embryonnaire. Elle est impliquée également dans la formation du système nerveux, dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, dans le renouvellement tissulaire et dans les phénomènes de vieillissement cellulaire. Des anomalies du programme de mort cellulaire sont impliquées dans l'étiologie de plusieurs maladies humaines (Thompson *et al.*, 1995). Ainsi, un accroissement du taux d'apoptose participe à la lymphopénie observée dans le SIDA ou à l'émergence de certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer. A l'inverse, une résistance accrue à l'apoptose entraîne des pathologies telles que les maladies auto-immunes ou le cancer. C'est le cas de la LLC-B dans laquelle les lymphocytes s'accumulent à cause d'une déficience de la mort par apoptose (Dighiero *et al.*, 1996; Caligaris-Cappio *et al.*, 2000; Kipps *et al.*, 2000).

De nombreux agents de chimiothérapie, comme la CdA, font mourir les cellules cancéreuses, notamment les lymphocytes de patients atteints de LLC-B (Robertson *et al.*, 1993; Zinzani *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1997; Castejon *et al.*, 1997; Shenkerman *et al.*, 1997) ou de leucémie à tricholeucocytes (Beutler *et al.*, 1993; Idink-Mecking *et al.*, 1998; Carson *et al.*, 2003), en déclenchant l'apoptose. Une induction de l'apoptose par la CdA a également été observée dans des lymphocytes normaux (Carrera *et al.*, 1991), de même que dans des thymocytes (Szondy *et al.*, 1995). Bien que l'apoptose soit la voie majeure par laquelle la CdA tue les cellules leucémiques, la nécrose peut aussi jouer un certain rôle comme cela sera décrit plus bas. Apoptose et nécrose peuvent en effet se produire simultanément dans des cellules exposées à un même stimulus. C'est souvent l'intensité du stimulus initial qui détermine lequel de ces deux processus mortels sera induit, choix qui se fait au niveau mitochondrial (Polla *et al.*, 1998).

1.5.2 Les mécanismes moléculaires de l'apoptose

1.5.2.1. Les caspases

La régulation et l'exécution de l'apoptose impliquent l'action de protéases particulières, appelées caspases (pour cysteiny aspartate-specific proteases). Ces enzymes contiennent une cystéine dans leur site catalytique et clivent leurs substrats au niveau d'un résidu aspartate. Elles existent dans le cytoplasme sous une forme inactive, appelée procaspase. A l'origine,

une stimulation proapoptotique provoque le clivage de procaspases dites initiatrices, générant deux fragments, une petite et une grande sous-unité. La caspase peut alors s'assembler sous sa forme active: deux hétérodimères composés chacun de l'association de la petite et de la grande sous-unité. La caspase devenue fonctionnelle active alors, par clivage, d'autres caspases dites effectrices, ce qui amplifie en cascade le signal apoptotique initial. Les caspases inactivent les voies de survie cellulaire et activent spécifiquement d'autres facteurs dont la fonction consiste à favoriser la mort cellulaire (Adams *et al.*, 2003).

L'apoptose peut être déclenchée par deux voies, la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou médiée par des récepteurs), qui sont décrites ci-dessous (figure 4). Ces deux voies impliquent des caspases différentes, mais aboutissent toutes deux à l'activation d'une caspase effectrice commune, la caspase-3. L'activation de cette caspase, considérée comme la principale caspase effectrice, provoque la dégradation internucléosomale de l'ADN ainsi que la condensation de la chromatine (Woo *et al.*, 1998).

1.5.2.2. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque est encore appelée voie mitochondriale car les mitochondries jouent un rôle clé dans cette voie de mort cellulaire. Elle est déclenchée par une perméabilisation de la membrane mitochondriale, qui est suivie d'une chute du potentiel transmembranaire.

Plusieurs mécanismes sont proposés dans la littérature pour expliquer la perméabilisation des mitochondries, mais l'hypothèse la plus retenue est l'ouverture de mégapores mitochondriaux (Marzo *et al.*, 1998). Ces derniers sont des complexes multiprotéiques composés de la porine (ou VDAC, Voltage-Dependent Anion Channel), protéine de la membrane mitochondriale externe, et d'un translocateur de nucléotides à adénine (ANT), inséré dans la membrane mitochondriale interne. Des protéines pro-apoptotiques, telles que Bax, en s'associant au mégapore, favoriseraient son ouverture, provoquant un gonflement de la matrice mitochondriale et la rupture de la membrane externe (Martinou *et al.*, 2000). Bax se trouve normalement dans le cytosol sous forme inactive. Lorsque l'apoptose est enclenchée, il est transloqué au niveau de la membrane mitochondriale et activé suite à des changements de conformation (voir plus loin).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale est à l'origine de la libération du cytochrome c et d'autres protéines apoptogènes, comme les procaspases-2 et -9 et le

Voie extrinsèque

Voie intrinsèque

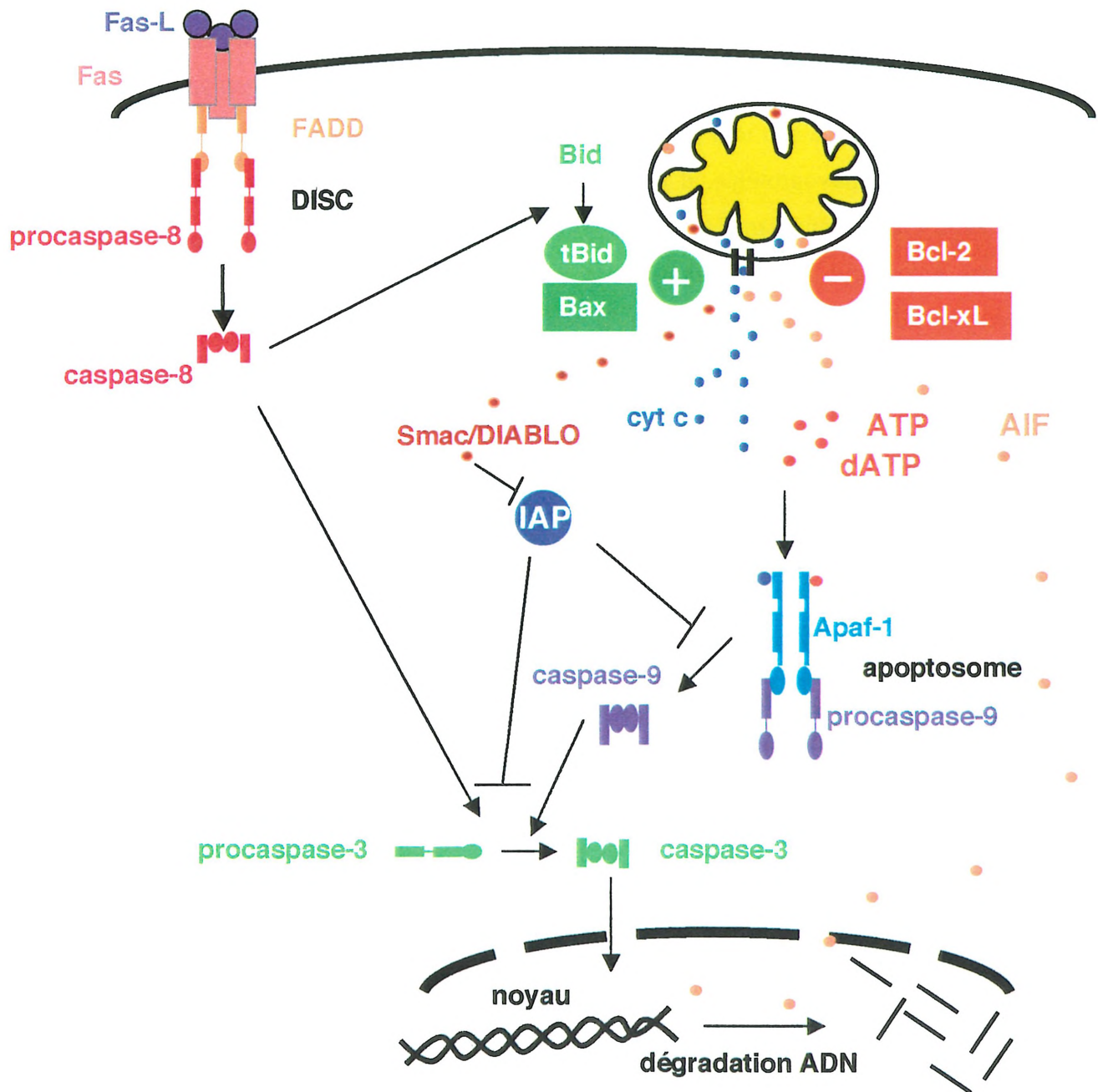


Figure 4: Schéma des mécanismes moléculaires de l'apoptose: voies intrinsèque et extrinsèque.

Les explications sont données dans le texte.

facteur AIF (Apoptosis-Inducing Factor), de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Ces protéines mitochondriales favorisent activement la mort cellulaire par apoptose. Le cytochrome c, une fois libéré dans le cytosol, interagit avec la protéine d'assemblage Apaf-1, le dATP ou l'ATP, et la procaspase-9, formant ainsi un complexe multimérique appelé apoptosome qui est à l'origine du clivage et de l'activation de la procaspase-9 en caspase-9. Cette dernière active à son tour d'autres caspases, principalement la caspase-3. Quant au facteur AIF, une flavoprotéine, il intervient d'une manière indépendante des caspases. Après avoir été relargué dans le cytosol, il est transloqué dans le noyau où il est capable d'induire à lui seul la fragmentation de la chromatine en particules de haut poids moléculaire ainsi que sa condensation. L'action combinée des caspases et de l'AIF est responsable du phénotype de l'apoptose (rétrécissement cellulaire, formation des corps apoptotiques, condensation et fragmentation nucléaire). La mitochondrie perméabilisée libère également la protéine Smac/DIABLO qui peut contrecarrer l'action d'inhibiteurs de caspases, les IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Les IAP sont des protéines qui s'opposent à la mort cellulaire en se liant directement aux caspases telles que les procaspases-3 et -9, empêchant ainsi leur clivage et leur activation.

La voie intrinsèque est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, ...) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, ...). Ces protéines interagissent entre elles, formant des homodimères et/ou des hétérodimères. Par exemple, les protéines Bax peuvent interagir avec les protéines Bcl-2 pour former des hétérodimères. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine ainsi la sensibilité de cette dernière à un signal de mort (Oltvai *et al.*, 1993). L'activité anti-apoptotique de Bcl-2, ancrée dans la membrane mitochondriale externe, consiste à s'opposer à l'ouverture des mégapores par la protéine pro-apoptotique Bax.

1.5.2.3. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est initiée par l'activation de récepteurs spécialisés de la membrane plasmique, des récepteurs de mort, qui appartiennent à la famille des récepteurs appelés TNFR (tumor necrosis factor receptor). Ces récepteurs incluent Fas-R (CD95/Apo-1), le récepteur 1 du facteur de croissance TNF (TNF-R1), ainsi que les récepteurs de mort DR-3, DR-4 et DR-5 ou encore CD40 (Goldstein *et al.*, 1997).

Ces récepteurs lient des ligands tels que Fas-L, TNF- α (ligand de TNF-R1), TRAIL (ligand inducteur d'apoptose relié à TNF, ligand de DR-4 et DR-5) et CD40-L (ligand de CD40). Ces ligands peuvent être présents à la surface cellulaire ou sous forme soluble dans le milieu extracellulaire. La liaison d'un ligand à un récepteur de mort active le récepteur et par là une voie qui mène à l'activation de la caspase-3 et à l'apoptose.

Parmi les récepteurs de mort, Fas a été décrit le premier et est le mieux caractérisé. Comme d'autres récepteurs dits de mort, il a la particularité de posséder dans sa portion intracellulaire une région conservée appelée « le domaine de mort » (DD, Death Domain), d'environ 80 acides aminés, nécessaire à la transmission d'un signal de mort. Une fois stimulé par son ligand FasL, le récepteur Fas subit une trimérisation au niveau de la membrane, ce qui permet le recrutement à la membrane d'une protéine cytoplasmique, FADD (Fas Associated Death Domain). Celle-ci contient dans sa partie carboxy-terminale un autre domaine de mort grâce auquel elle attire à son tour la procaspase-8. Le complexe multimérique formé à la membrane par Fas, FADD et la procaspase-8 est appelé le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Le rapprochement des procaspases-8 dans le DISC permet leur clivage réciproque et la libération dans le cytosol des formes actives de la caspase-8, qui vont à leur tour cliver des caspases effectrices, dont la caspase-3.

La voie extrinsèque est connectée à la voie intrinsèque par le biais de la molécule Bid, qui est un des membres de la famille Bcl-2. En effet, un fragment de Bid (truncated Bid, tBid) engendré suite au clivage de Bid par la caspase-8, peut se lier à Bax qui est présent sous forme monomérique dans le cytosol, induire son oligomérisation et son intégration dans la membrane mitochondriale externe, entraînant l'ouverture des mégapores et la libération du cytochrome c.

1.5.3. Activation de l'apoptose par la CdA

1.5.3.1. Activation de la voie intrinsèque

L'activation de la voie intrinsèque est le processus majeur par laquelle la CdA induit l'apoptose dans les lymphocytes leucémiques (Leoni *et al.*, 1998; Genini *et al.*, 2000; Marzo *et al.*, 2001; Perez-Galan *et al.*, 2002). Comme décrit ci-dessus, l'activation de cette voie implique une modification de la perméabilité mitochondriale, qui mène à la libération dans le cytosol du cytochrome c et de l'AIF. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour

expliquer l'effet de la CdA au niveau de la mitochondrie, qui peuvent être dépendants ou indépendants de p53 (Pettitt *et al.*, 1999 a et b).

Mécanisme dépendant de p53

Une première hypothèse suggère que la modification de la perméabilité mitochondriale induite par la CdA pourrait faire suite à une accumulation de p53 dans le noyau et à son activation comme facteur de transcription. La protéine p53 peut en effet activer la transcription de Bax, et réprimer celle de Bcl-2, ce qui va favoriser, comme décrit plus haut, l'ouverture de mégapores dans la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c et de l'AIF dans le cytosol. Une accumulation de p53 sous l'influence de la CdA a de fait été observée dans des lymphocytes LLC-B ou dans d'autres cellules cancéreuses (Gartenhaus *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1997; Borner *et al.*, 1997). De plus, la présence de p53 influence la sensibilité de lymphocytes tumoraux à l'apoptose induite par la CdA (Galmarini *et al.*, 2003). L'accumulation de p53 observée après CdA fait vraisemblablement suite à son incorporation dans l'ADN, qui peut se faire au cours de sa réplication comme de sa réparation. La présence de nucléotides de la CdA dans les brins d'ADN finit en effet par inhiber leur élongation et/ou leur réparation, ce qui provoque l'apparition de cassures de brins. Celles-ci sont reconnues par des molécules « senseurs » telles que ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), ATR (ATM and Rad3-related) ou DNA-PK (protéine kinase dépendante de l'ADN), des protéines kinases qui vont phosphoryler et stabiliser la protéine p53 (Achanta *et al.*, 2001; Sampath *et al.*, 2003).

Le rôle de Bax et/ou de Bcl-2 dans l'induction de l'apoptose par la CdA a cependant été contesté. Alors qu'une augmentation de Bax a été observée dans des cellules de carcinome colorectal incubées en présence de CdA (Galmarini *et al.*, 2003), plusieurs auteurs n'ont pas observé de modification de l'expression de Bax ou de Bcl-2 après traitement de lymphocytes LLC-B par la CdA (Johnston *et al.*, 1997; Bellosillo *et al.*, 2002; Peroz-Galan *et al.*, 2002; Dewson *et al.*, 2003). De même, le niveau d'expression de ces deux protéines ne semble pas pouvoir prédire la sensibilité des lymphocytes LLC-B à la CdA (Johnston *et al.*, 1997; Bonsanquet *et al.*, 2002). Cependant, dans le cas où les analogues de nucléosides n'induisent pas d'augmentation de l'expression de Bax, on ne peut exclure qu'ils induisent des changements conformationnels de Bax ainsi que sa

translocation vers la mitochondrie, comme expliqué plus haut (Bellosillo *et al.*, 2002 ; Dewson *et al.*, 2003).

Mécanismes indépendants de p53

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer une modification de la perméabilité mitochondriale, indépendamment d'une accumulation de p53.

Tout d'abord, il a été démontré que la CdA est capable de diminuer le potentiel transmembranaire de mitochondries isolées de lymphocytes LLC-B et de rompre leur intégrité (Genini *et al.*, 2000b). Le mécanisme par lequel la CdA induirait ce dommage reste hypothétique. Il ferait suite à la conversion intramitochondriale de la CdA en CdATP, lequel pourrait se lier à des protéines qui régulent des fonctions mitochondriales importantes, comme la F1-F0 ATPase (mitochondrial adenosine triphosphate synthase) impliquée dans les phosphorylations oxydatives, et l'ANT, impliqué dans le contrôle de l'ouverture des mégapores mitochondriaux.

Un second mécanisme pouvant mener à des perturbations mitochondriales en présence de CdA implique des changements de concentration en calcium. Selon Chandra et ses collaborateurs (2002), la CdA peut induire en quelques minutes une élévation du Ca^{++} libre cytosolique, ce qui peut dissiper le potentiel transmembranaire de la mitochondrie et déclencher l'ouverture des mégapores si la capacité des mitochondries à tamponner l'excès de calcium est dépassée (Bernardi *et al.*, 1998). Le fait qu'un chélateur de Ca^{++} , le BAPTA-AM, empêche l'activation de la caspase-3 ainsi que la fragmentation de l'ADN provoquée par la CdA dans des cellules leucémiques est en faveur d'un rôle du calcium dans la cytotoxicité de la CdA (Chandra *et al.*, 2002).

Une perte d'intégrité des mitochondries pourrait aussi survenir suite à des lésions de son propre ADN. En effet, comme expliqué plus haut (voir sections 1.3.2. et 1.4.3.), la CdA peut être incorporée dans l'ADN mitochondrial par l'ADN polymérase γ (Parker *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 2001), ce qui peut entraver sa transcription et empêcher la production en quantités suffisantes de protéines mitochondriales importantes pour les phosphorylations oxydatives (Hentosh *et al.*, 1997). Il pourrait en résulter une perturbation des fonctions métaboliques de la mitochondrie et de là une perte de son intégrité. L'observation qu'une surexpression de la dGK mitochondriale augmente la sensibilité à la CdA de lignées

tumorales est en faveur d'un rôle du métabolisme mitochondrial de la CdA dans son action pharmacologique (Zhu *et al.*, 1998).

Finalement, en plus de sa capacité à augmenter la perméabilité de la mitochondrie, la CdA peut favoriser directement le clivage et l'activation de la caspase-9 au niveau de l'apoptosome dans les lymphocytes LLC-B. En effet, le CdATP, de structure similaire au dATP, peut se substituer à celui-ci dans l'assemblage de l'apoptosome et promouvoir son activation, ce qui mène au clivage de la procaspase-9 et à l'activation de la caspase-3 (Leoni *et al.*, 1998). Les formes triphosphates d'autres analogues de nucléosides, particulièrement celle de la fludarabine, possèdent aussi la capacité d'activer l'apoptosome (Genini *et al.*, 2000a). Dans les cellules non traitées, les concentrations cytoplasmiques en dATP et en cytochrome c sont trop faibles pour déclencher l'activation de l'apoptosome.

1.5.3.2. Activation de la voie extrinsèque

La CdA peut également induire l'apoptose en activant la voie extrinsèque. En effet, Nomura *et al.* (2000) ont décrit que la CdA augmente la synthèse et l'expression des protéines Fas-R et Fas-L à la surface des cellules de la lignée leucémique MOLT-4, cet effet étant suivi de l'activation de la caspase-8, de la caspase-3 et de l'apoptose. D'après ces auteurs, l'augmentation de l'expression de Fas-L ferait suite à l'activation, par les cassures dans l'ADN induites par la CdA, de SAPK/JNK. Celle-ci est une MAP kinase impliquée dans la régulation de l'expression de AP-1, un facteur de transcription qui régule l'expression de Fas-L. Quant à Fas-R, étant une cible transcriptionnelle directe de p53 (Muller *et al.*, 1997 ; Muller *et al.*, 1998), son expression pourrait augmenter suite à l'activation de p53, comme cela a été décrit pour la fludarabine (Rao *et al.*, 2003).

La contribution exacte de la voie de signalisation Fas/Fas-L dans la mort cellulaire apoptotique induite par les analogues de nucléosides tels que la CdA et la fludarabine reste cependant controversée. En effet, bien que ces agents induisent une augmentation de l'expression de Fas-L, l'inhibition de la voie Fas-L/Fas-R par des anticorps ne diminue pas l'apoptose qu'ils induisent dans des cellules leucémiques (Villunger *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1999 ; Klöpfer *et al.*, 2004).

1.5.4. Implication de la nécrose dans la cytotoxicité de la CdA

Comme nous venons de le décrire, la CdA induit la mort cellulaire par apoptose, mais il n'est pas exclu que la nécrose coexiste avec l'apoptose, ou survienne dans un second temps après l'induction de cette dernière.

Une enzyme qui pourrait être impliquée dans la mort cellulaire par nécrose suite à l'administration de CdA est la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) (Seto et al., 1985). Cette enzyme nucléaire, qui est recrutée et activée par des cassures dans l'ADN, synthétise, à partir de NAD^+ , des polymères d'ADP-ribose qu'elle lie de façon covalente à différentes protéines nucléaires ainsi qu'à elle-même. Une fois autoribosylée, PARP se détache de l'ADN et rend la lésion accessible aux facteurs et enzymes de réparation (Decker et Muller, 2003; Scovassi et Diederich, 2004). D'après Seto *et al.* (1985), l'activation de PARP par les analogues de purines provoque une déplétion en NAD^+ , suivie d'une chute de l'ATP, ce qui entraîne la mort cellulaire par nécrose. L'hypothèse selon laquelle l'activation de PARP jouerait un rôle crucial dans la mort cellulaire induite par la CdA provient du fait que des inhibiteurs de PARP, qui préviennent la déplétion en NAD^+ et en ATP, empêchent aussi la mort cellulaire (Seto et al., 1985). Des études plus récentes, réalisées par Pettitt *et al.* (2000a), confirment que l'activation de PARP joue un rôle dans la mort cellulaire induite par la CdA, mais démontrent qu'elle n'en est pas l'élément initiateur. Elle est plutôt impliquée dans la nécrose qui survient dans un second temps après le déclenchement de l'apoptose (Pettitt et al., 2000a, Pettitt *et al.*, 2003).

1.5.5. Intérêt particulier de la CdA

La diversité des mécanismes, dépendants ou indépendants de p53, par lesquels la CdA peut induire l'apoptose dans les lymphocytes, ainsi que sa capacité à activer PARP et à induire la nécrose, expliquent pourquoi elle est active à la fois dans les cellules qui se divisent et dans les cellules quiescentes. Cette propriété la rend particulièrement intéressante d'un point de vue thérapeutique, notamment dans le cas de la LLC-B, où peuvent coexister les deux types de cellules. En effet, comme dit plus haut, bien que la LLC-B résulte principalement d'une accumulation dans le sang de lymphocytes quiescents, l'expansion clonale ne peut se faire sans prolifération.

2. Les mécanismes de résistance à la CdA

Bien que les analogues de nucléosides aient révolutionné le traitement des maladies malignes lymphoprolifératives, leur efficacité thérapeutique est limitée par des phénomènes de résistance, qui peuvent exister d'emblée ou se développer au fil des rechutes. Schématiquement, la résistance à la CdA, comme à d'autres analogues de nucléosides, peut être due soit à une activation insuffisante de la CdA en CdATP expliquée par une anomalie de son métabolisme, soit à l'incapacité du CdATP à provoquer des lésions dans l'ADN, soit à son incapacité à induire l'apoptose (Galmarini *et al.*, 2001; Lotfi *et al.*, 2003).

2.1. Anomalies du métabolisme de la CdA

2.1.1. Défaut de transport de la CdA

Comme expliqué plus haut, la CdA traverse la membrane plasmique à l'aide de transporteurs de nucléosides (hENTs), dont la présence est indispensable à son action pharmacologique. Il a en effet pu être démontré que l'absence du transporteur hENT1 dans des cellules leucémiques les rendait résistantes à la CdA (Lang *et al.*, 2001) et que la toxicité de la CdA était corrélée à l'expression de hENT1 dans la membrane plasmique (Gati *et al.*, 1998). Cependant, l'implication d'une déficience en hENT1 dans la résistance clinique à la CdA n'est pas encore bien établie. En effet, tandis qu'une faible réponse clinique à l'ara-C chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë a pu être corrélée avec une faible vitesse de transport de ce nucléoside (Wiley *et al.*, 1982), il n'y a pas de corrélation statistiquement significative qui ait pu être établie entre le contenu en hENTs et la sensibilité à la CdA de lymphoblastes d'enfants atteints de leucémie lymphocytaire aiguë (Wright *et al.*, 2002).

Une augmentation de la sensibilité à la CdA a été observée *in vitro* dans des cellules leucémiques incubées en présence de bryostatine, une lactone macrocyclique activatrice de la protéine kinase C, qui pourrait s'expliquer en partie par une stimulation de l'influx de CdA dans les cellules via les transporteurs concentratifs (CNTs) (Beck *et al.*, 2000).

2.1.2. Diminution de l'activité de la désoxycytidine kinase

La résistance aux analogues de nucléosides, y compris la CdA, a pu être mise en relation dans plusieurs lignées cellulaires avec une absence ou une réduction d'activité de la dCK (Carson *et al.*, 1980; Verhoef *et al.*, 1981; Bhalla *et al.*, 1984; Orr *et al.*, 1995; Stegmann *et al.*, 1993; Dumontet *et al.*, 1999; Mansson *et al.*, 1999). Il a aussi été montré que la sensibilité aux analogues de nucléosides de lignées déficientes en dCK était restaurée par la transfection du gène de la dCK (Stegmann *et al.*, 1995; Hapke *et al.*, 1996). De ces études *in vitro*, il est ressorti que la réduction d'activité de la dCK doit être d'au moins 90% pour provoquer une résistance, suggérant que dans une cellule normale, la dCK est présente en excès. Bien qu'un déficit en dCK soit la forme de résistance aux analogues de nucléosides la plus fréquemment observée dans des lignées cellulaires, son implication dans la résistance clinique aux analogues de nucléosides est controversée. En effet, l'expression et l'activité de la dCK, ainsi que le taux de phosphorylation de la CdA, ont été corrélés avec la sensibilité clinique à cet agent par certains auteurs (Kawasaki *et al.*, 1993; Arner *et al.*, 1994), mais pas par d'autres (Albertioni *et al.*, 1998).

Plusieurs mécanismes peuvent aboutir à une diminution d'activité de la dCK, comme des mutations ou délétions dans son gène (Owens *et al.*, 1992; Flashove *et al.*, 1994), une hyperméthylation de la région promotrice du gène (Leegwater *et al.*, 1998), ou un épissage alternatif de son ARNm (Veuger *et al.*, 2000).

Divers auteurs ont imaginé des stratégies visant à contourner un déficit en dCK. Par exemple, l'utilisation de vecteurs rétroviraux contenant le gène d'une désoxyribonucléoside kinase multisubstrat capable de phosphoryler les quatre désoxynucléosides naturels (Munch-Petersen *et al.*, 1998), ainsi que la CdA et d'autres analogues de nucléosides (Zheng *et al.*, 2000). Un autre exemple est l'utilisation de pro-drogues monophosphates couplées à une molécule lipophile leur permettant de traverser la membrane plasmique et de court-circuiter l'étape de phosphorylation par la dCK (Rose *et al.*, 2002; Jordheim *et al.*, 2004). Un dernier exemple est l'utilisation de molécules qui augmenteraient l'activité de la dCK, soit en abaissant la concentration du dCTP, son inhibiteur physiologique, soit en augmentant son degré de phosphorylation, puisqu'il apparaît de plus en plus que cette enzyme est soumise à une régulation par phosphorylation/déphosphorylation (Csapo *et al.*, 2001; Smal *et al.*, 2004). Dans ce dernier cas, des combinaisons d'analogues de nucléosides pourraient être envisagées puisque, d'une part, ils peuvent induire une baisse de

dCTP, et que, d'autre part, ils peuvent augmenter l'activité de l'enzyme par modification post-traductionnelle (Sasvari-Szekeli *et al.*, 1998; Spasokoukotskaja *et al.*, 1999; Smal *et al.* 2004).

En ce qui concerne la dGK mitochondriale, on sait qu'elle phosphoryle de nombreux agents anticancéreux tels que la CdA ou l'ara-G (1-beta-D-arabinofuranosylguanine). Une diminution de son expression a été impliquée dans la résistance à l'ara-G de la lignée leucémique MOLT-4 (Lofti *et al.*, 2002). A notre connaissance, elle n'a cependant jamais été impliquée dans la résistance à la CdA, même si une surexpression de la dGK dans des lignées cellulaires de tumeurs solides augmente leur sensibilité à différents analogues de nucléosides, dont la CdA (Zhu *et al.*, 1998).

2.1.3. Augmentation de l'activité de la 5'-nucléotidase

Dans diverses lignées leucémiques (Carson *et al.*, 1991; Schirmer *et al.*, 1998 ; Dumontet *et al.*, 1999; Hunsucker *et al.*, 2001; Lotfi *et al.*, 2001), ainsi que chez des patients atteints de LLC-B (Kawasaki *et al.*, 1993), une augmentation de l'expression et/ou de l'activité des 5'-NT cytosoliques, cN-I (à bas Km) et cN-II (à haut Km), a été associée à une résistance aux analogues de nucléosides, y compris la CdA. En particulier, les travaux de Kawasaki *et al.* (1993) indiquent que le taux de 5'-NT dans les lymphocytes de patients pourrait prédire leur sensibilité à la CdA, ce taux étant systématiquement plus bas chez les patients sensibles que chez les patients résistants (Kawasaki *et al.*, 1993). De même, plusieurs autres études ont montré que le rapport dCK/5'-NT est plus élevé dans des lignées sensibles à la CdA que dans des lignées résistantes (Carson *et al.*, 1983; Arner *et al.*, 1994; Arner *et al.*, 1996). Cependant, bien qu'une augmentation de l'activité 5'-NT soit souvent associée à une résistance aux analogues de nucléosides, cela ne semble pas être le cas dans tous les types cellulaires. En effet, dans une lignée cellulaire de rein humain, une surexpression de la 5'-NT cN-II de 50 fois est incapable d'induire une résistance à la CdA (Gazziola *et al.*, 1999).

Les mécanismes qui mènent à une augmentation de l'activité 5'-NT ne sont pas connus.

2.2. Incapacité du CdATP à provoquer des lésions dans l'ADN

Comme expliqué ci-dessus, l'inhibition de la synthèse d'ADN est un mécanisme important de la cytotoxicité de la CdA car elle induit des cassures dans l'ADN, lesquelles peuvent activer l'apoptose. Plusieurs processus pourraient s'opposer à l'apparition de ces lésions et jouer un rôle dans la résistance à la CdA.

2.2.1. Surexpression de la ribonucléotide réductase

Comme l'ont montré plusieurs études, une augmentation d'activité de la RR, due notamment à une surexpression de la sous-unité M2, peut engendrer une résistance aux analogues de nucléosides, comme la gemcitabine (Goan *et al.*, 1999) et la fludarabine (Dumontet *et al.*, 1999; Mansson *et al.*, 1999; Mansson *et al.*, 2003). L'augmentation d'activité de la RR entraîne en effet une élévation du pool des dNTPs qui s'oppose, par inhibition compétitive, à l'incorporation des analogues de nucléosides triphosphates dans l'ADN (Dumontet *et al.*, 1999). De plus, une élévation du dCTP peut rétro-inhiber l'activité de la dCK et donc l'activation de ces analogues de nucléosides. Une résistance à la CdA impliquant une surexpression de l'activité de la RR n'a cependant encore jamais été décrite.

2.2.2. Altération des ADN polymérases

Comme les analogues de nucléosides triphosphates sont généralement substrats des ADN polymérases, ils peuvent entrer en compétition avec leurs homologues naturels et contribuer ainsi à une inhibition de la synthèse d'ADN. Une diminution de l'affinité des ADN polymérases pour les analogues triphosphates pourrait jouer un rôle dans le développement de résistances, comme c'est le cas pour la cytarabine dans la leucémie lymphoblastique aiguë (Tanaka *et al.*, 1982; Higashigawa *et al.*, 1991). Une telle possibilité n'a cependant jamais été démontrée dans des cas de résistance à la CdA.

2.2.3. Réparation de l'ADN

L'efficacité clinique de la CdA pourrait être atténuée par des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, telles que les protéines du groupe XP, qui reconnaissent les résidus de CdAMP incorporés dans l'ADN et les enlèvent (Hentosh *et al.*, 1995b; Shi *et al.*, 2001; Lawrenzi *et al.*, 2003).

2.3. Incapacité du CdATP à induire l'apoptose

Certaines protéines intervenant dans les voies intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose peuvent être altérées, absentes ou surexprimées, ce qui peut mener à une modification de la sensibilité de la cellule à la CdA.

Des mutations dans le gène qui code pour la protéine p53, qui est muté chez 10 à 15% des patients atteints de LLC-B, prédisent une évolution agressive de la maladie ainsi qu'un faible taux de réponse à la chimiothérapie (Gaidano *et al.*, 1991; el Roubi *et al.*, 1993; Wattel *et al.*, 1994; Lens *et al.*, 1997). Plusieurs auteurs ont ainsi observé que des patients atteints de LLC-B et présentant des mutations de p53 étaient résistants à la CdA et à la fludarabine (Dohner *et al.*, 1995; Johnston *et al.*, 1997; Pettitt *et al.*, 1999; Galmarini *et al.*, 2003).

In vitro, plusieurs moyens ont été imaginés pour restaurer la sensibilité à l'apoptose de cellules déficientes en p53, comme par exemple l'utilisation de peptides correspondant à l'extrémité C-terminale de la protéine p53 sauvage et capables de réactiver la voie p53 (Hupp *et al.*, 2000), ou l'utilisation de PRIMA-1 (p53-dependent reactivation and induction of massive apoptosis), un composé capable de restaurer l'activité transcriptionnelle de p53 muté et d'augmenter la sensibilité à la fludarabine (Nahi *et al.*, 2004).

Concernant les protéines impliquées dans la voie intrinsèque, plusieurs auteurs ont montré qu'un rapport Bcl-2/Bax élevé pouvait être une cause de résistance à la fludarabine dans des lymphocytes LLC-B (Thomas *et al.*, 1996; Pepper *et al.*, 1999), bien que le niveau d'expression de Bcl-2 par lui-même ne soit pas corrélé à la réponse à la CdA ou à la fludarabine dans ce même type de cellules (Morabito *et al.*, 1997; Zaja *et al.*, 1998). D'autres mécanismes pouvant être causes de résistance à la CdA ont également été décrits: une augmentation de la capacité des mitochondries à séquestrer le Ca^{++} libre cytosolique (Chandra *et al.*, 2002), l'induction par la CdA de protéines de la famille des IAPs empêchant l'activation des caspases de la voie intrinsèque (Wall *et al.*, 2001), un défaut d'expression des caspases-9 ou -3, ou encore une absence d'activation des caspases-3,-8 et -9 (Perez-Galan *et al.*, 2002). Finalement, il a été décrit que l'infection de lymphocytes par le virus d'Epstein-Barr (EBV) induisait une activation constitutive du facteur de transcription STAT, qui rend ces cellules résistantes à l'action de la fludarabine qui normalement diminue le niveau de cette protéine (Fagard *et al.*, 2002).

Concernant les protéines impliquées dans la voie extrinsèque, Lotfi *et al.* (2001) ont observé un faible niveau d'expression de l'ARNm de FasL dans des cellules de leucémie lymphoblastique aiguë résistantes à la CdA.

Malgré les résultats encourageants de la CdA dans le traitement de la LLC-B, la résistance reste encore un défi médical majeur. On ne sait pas encore si tous les mécanismes de résistance décrits ci-dessus peuvent intervenir simultanément ou successivement, et s'ils dépendent de la quantité et/ou du temps d'exposition à la CdA. En caractérisant chaque cause de résistance, on peut espérer la combattre, en élaborant par exemple des protocoles d'associations de chimiothérapies. Des tests *in vitro* permettant de déterminer la sensibilité probable à un agent chimiothérapeutique particulier (chimigrammes) pourraient être utilisés afin de prédire la réponse *in vivo* et éviter des traitements inefficaces et toxiques.

3. Le cycle cellulaire

Tous les organismes sont constitués de cellules qui se multiplient par division cellulaire. La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule-mère génère deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le cycle cellulaire est la succession d'étapes qu'une cellule doit traverser pour donner naissance à ces deux cellules-filles. Avant d'exposer l'influence des analogues de nucléosides sur le cycle cellulaire, cette section rappelle brièvement quelles en sont les différentes étapes et la façon dont leur succession est contrôlée.

3.1. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est essentiellement constitué de deux périodes, l'interphase, au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose, au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules-filles.

L'interphase est classiquement divisée en trois phases: G1, S et G2 (figure 5). La phase G1, habituellement la plus longue du cycle cellulaire, est une phase de transition qui correspond à l'intervalle séparant la mitose (phase M) de la réplication de l'ADN (phase S). Durant la phase G1, la cellule grossit, synthétise des protéines et se prépare à la phase S. En

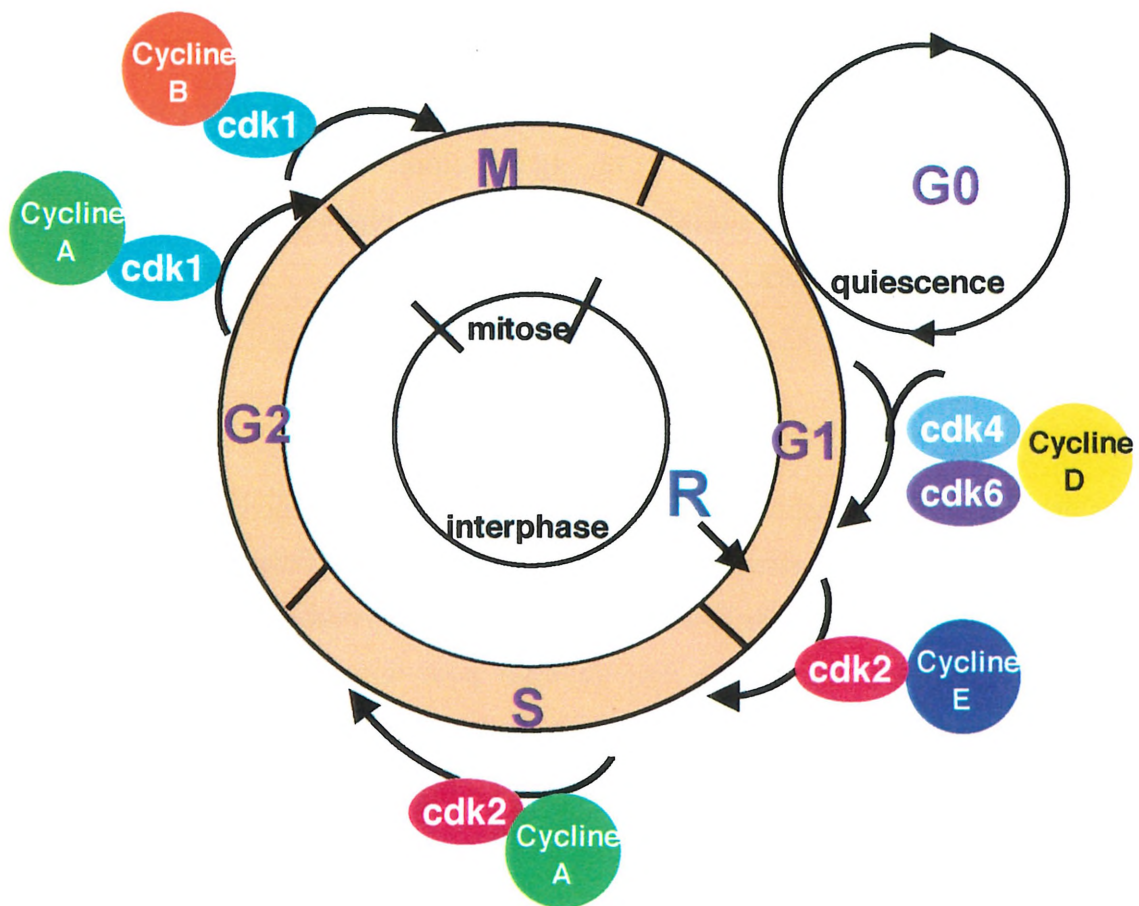


Figure 5: Présentation des phases du cycle de division cellulaire et des complexes cdk/cycline qui en contrôlent l'avancement.

D'après Meijer *et al.*, 2003.

fin de phase G1, la cellule passe par le point de restriction (R) qui surveille la taille de la cellule, l'état des chromosomes, la disponibilité en nutriments et la présence de facteurs de croissance. Le point R est une sorte de point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé, même si les facteurs de croissance sont éliminés. La phase S est la phase durant laquelle se déroule spécifiquement la réplication de l'ADN. La phase G2 est une nouvelle phase de transition au cours de laquelle la cellule continue à grossir et à synthétiser des protéines en vue de la mitose. De plus, au cours de cette phase, la cellule vérifie que la réplication de l'ADN a été correctement réalisée.

La phase M ou mitose est la phase au cours de laquelle les chromosomes dédoublés sont répartis entre les deux cellules-filles. Elle est divisée en quatre périodes: la prophase, terminée par la rupture de l'enveloppe nucléaire, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La cytokinèse sépare les deux cellules filles et achève la division cellulaire. Après la division, les cellules retournent en phase G1 et le cycle cellulaire est bouclé.

Les cellules qui ne se divisent plus s'arrêtent généralement en phase G1. Elles sont dans un compartiment spécialisé de G1 appelé G0 (phase de quiescence), où elles peuvent rester un temps indéfini. Par exemple, les lymphocytes de patients atteints de LLC-B qui ne se divisent pas sont pour la plupart arrêtés en phase G0. Bien que dites quiescentes, les cellules en phase G0 sont des cellules actives qui continuent à synthétiser et à sécréter des protéines.

3.2. La régulation du cycle cellulaire

Pour que la cellule-mère puisse léguer à ses filles un génome intact, les quatre phases du cycle cellulaire, G1, S, G2 et M, doivent s'enchaîner de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que si la précédente s'est déroulée correctement. Pour assurer ce contrôle, la cellule dispose de systèmes de régulation hautement perfectionnés, découverts grâce aux travaux de T. Hunt, P. Nurse et L. Hartwell qui reçurent en 2001 le prix Nobel de Physiologie et de Médecine. Ces systèmes de régulation sont les suivants :

Les kinases dépendantes des cyclines (cyclin-dependent kinases, cdks)

Les cdks constituent une famille de protéines kinases qui jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle (voir section 3.3.). Elles interviennent tout au long du cycle dans un ordre déterminé:

- en phase G1 et pour la transition G1/S, c'est-à-dire pour le déclenchement de la réplication de l'ADN;
- en phase S pour la poursuite de la réplication de l'ADN;
- en phase G2 et pour la transition G2/M, c'est-à-dire pour le déclenchement et l'exécution de la mitose.

La succession normale des différentes phases ne peut avoir lieu que si les différentes cdks intervenant au cours des différentes phases sont activées aux moments opportuns.

Les mécanismes de surveillance du cycle ou points de contrôle ("checkpoints")

Les points de contrôle du cycle cellulaire sont des voies de transduction du signal qui interviennent pour inhiber les cdks et arrêter le cycle, si l'étape précédente n'est pas terminée ou si une réparation de l'ADN est nécessaire (voir section 3.4.). Ce contrôle évite la transmission aux cellules-filles de chromosomes incomplets ou endommagés, ce qui pourrait aboutir à la cancérisation de la cellule. Les points de contrôle permettent la surveillance d'aspects fondamentaux de la division cellulaire comme par exemple l'état des molécules d'ADN avant, pendant ou après sa réplication (DDCP ou DNA damage CheckPoint), l'achèvement total de la réplication avant l'entrée en mitose (RCP ou Replication Checkpoint), et le bon positionnement de tous les chromosomes sur la plaque métaphasique avant la séparation des chromatides sœurs en fin de métaphase (MPC ou Mitotic CheckPoint).

3.3. Les kinases dépendantes des cyclines

3.3.1. Propriétés et rôle des cdks

Les cdks sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique (cdk) et une sous-unité régulatrice (cycline). Les cyclines ne sont pas présentes pendant tout le cycle, elles apparaissent puis disparaissent brusquement à des moments précis du cycle, de façon périodique. Elles n'ont pas d'activité enzymatique, ce sont des

protéines régulatrices nécessaires aux cdk pour que celles-ci soient enzymatiquement actives. Les cdk peuvent donc se trouver sous forme activée ou désactivée, selon qu'elles sont associées ou non à leur cycline. Les cdk sont des sérine-thréonine kinases qui catalysent la phosphorylation de protéines cibles, entraînant des propriétés nouvelles pour ces dernières. D'après le séquençage du génome humain, il existerait 13 cdk et 25 cyclines. Toutes les cdk ne seraient cependant pas impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est contrôlé par au moins six complexes cdk/cycline différents qui interviennent à des moments précis du cycle. Schématiquement (figure 5), cdk4 et cdk6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis le complexe cdk2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par le complexe cdk2/cycline A qui assure le bon déroulement de la phase S. Le complexe cdk1/cycline A intervient en fin de G2, et le complexe cdk1/cycline B régule la transition prophase/métaphase de la mitose.

3.3.2. Régulation des cdk

Toutes les cdk sont présentes tout au long du cycle cellulaire. Si leur activité apparaît ou disparaît à des moments bien particuliers du cycle, c'est grâce à l'intervention d'au moins trois niveaux de régulation (Meijer *et al.*, 2003; Mc Gowan *et al.*, 2003) (figure 6):

(1) assemblage transitoire à une cycline, lié à une durée de vie des cyclines généralement courte (succession rapide de synthèse, d'interaction avec une cdk, de dégradation dépendante de l'ubiquitine). Par exemple, la cycline E n'est synthétisée qu'en fin de phase G1 et est détruite après l'entrée des cellules en phase S. L'expression cyclique des cyclines au cours du cycle cellulaire conditionne donc la chronologie de l'activation des cdk, la liaison d'une cdk à une cycline particulière conférant à la cdk une spécificité de substrat (Peeper *et al.*, 1993).

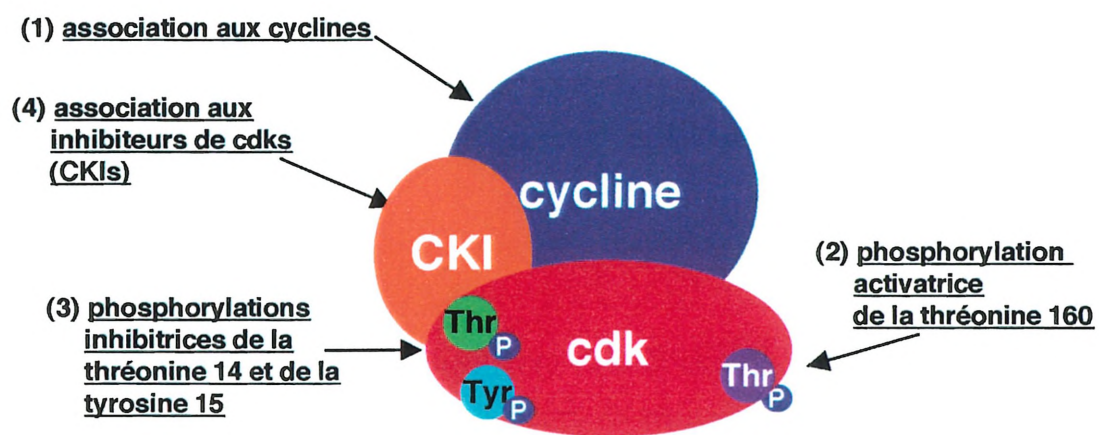


Figure 6: Régulation des kinases dépendantes des cyclines (cdks).

L'activité d'une cdk dépend de son association à une cycline (1), de phosphorylations qui peuvent être activatrices (2) ou inhibitrices (3) et de la présence d'inhibiteurs protéiques, les CKIs (4).

(2) modifications post-traductionnelles, essentiellement des phosphorylations qui peuvent être soit activatrices, soit inhibitrices :

- phosphorylation activatrice

L'activation des cdk est régie par la phosphorylation d'un résidu thréonine situé à la position 160 dans toutes les cdk. Cette phosphorylation activatrice induit un changement de conformation qui dégage l'entrée du site de fixation pour la protéine cible. Elle est catalysée par l'enzyme CAK (cdk-activating kinase), elle-même formée de l'association d'une cdk (cdk7) avec la cycline H.

- phosphorylations inhibitrices

L'activité des cdk est inhibée par la phosphorylation de deux acides aminés adjacents (thréonine 14 et tyrosine 15) situés au bord de la poche de fixation de l'ATP. Ces phosphorylations, catalysées par Wee-1 et Mit1, provoquent une répulsion électrostatique qui interdit l'entrée de l'ATP dans son site, ce qui veut dire que même si la cdk est phosphorylée sur la thréonine 160, elle reste inactive car l'ATP ne peut prendre sa place. C'est la raison pour laquelle les phosphorylations inhibitrices dominent la phosphorylation activatrice. Ces phosphorylations inhibitrices peuvent être enlevées par la phosphatase CDC25, qui active ainsi les complexes cdk/cycline. Il existe trois variantes de la protéine CDC25 : les CDC25A, B et C, résultant d'un épissage alternatif du même ARN pré-messager. La Cdk2, par exemple, est inhibée par phosphorylation de la thréonine 14 et de la tyrosine 15 et sera à nouveau active après déphosphorylation de ces résidus par la CDC25A.

(3) associations transitoires avec des inhibiteurs protéiques

Ces inhibiteurs ou CKIs (cyclin-dependent kinase inhibitors) exercent leur activité inhibitrice en s'associant avec les cdk. Ils sont répartis en deux groupes, la famille INK4, dont les membres p16 et p15 inhibent préférentiellement cdk4 et cdk6, et la famille Cip/Kip, dont les membres p21 et p27 sont connus pour être des inhibiteurs de cdk2/cycline E, mais qui peuvent aussi inhiber cdk4 et cdk6.

3.4. La progression en G1 du cycle cellulaire et le passage en phase S

Les cellules sont maintenues en G1 grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb, p107 et p130 (« pocket proteins »). Ces suppresseurs de tumeur bloquent le cycle cellulaire en s'associant aux facteurs de transcription E2F, dont ils inhibent l'activité transcriptionnelle (Herwig *et al.*, 1997). La famille E2F régule l'expression des gènes impliqués dans la transition G1/S, dans la réplication de l'ADN et dans l'induction de l'expression des histones 2A et 2B, indispensables pour l'assemblage de l'ADN dans les nucléosomes. Les facteurs E2F sont donc essentiels pour l'initiation et la progression de la phase S, mais ils ne peuvent agir qu'après avoir été libérés des « pocket proteins ». Ce sont les cdk de la phase G1 qui permettent cette dissociation, en phosphorylant pRb et les autres protéines de la famille pRb.

Le début du cycle, ou le passage du point de restriction (point R), coïncide avec la production et la stabilisation des cyclines de type D (D1, D2 et D3) en réponse aux facteurs de croissance (Sherr *et al.*, 1993; Sherr *et al.*, 1994a; Sherr *et al.*, 1994b; Sherr *et al.*, 2000). Une fois formés et activés, les complexes cdk4/cycline D et cdk6/cycline D phosphorylent pRb, ce qui permet une libération partielle de E2F et l'activation du gène de la cycline E (figure 7). La cycline E est ainsi synthétisée en fin de phase G1, ce qui permet la formation et l'activation du complexe cdk-2/cycline E, qui servira au passage de la transition G1/S. Le complexe cdk2/cycline E complète en effet la phosphorylation de pRb sur des sites additionnels, comme la sérine 795 en fin de phase G1 (Sherr *et al.*, 1994c; Zarkowska *et al.*, 1997 ; Garnovskaya *et al.*, 2004), ce qui permet la libération complète des facteurs E2F, et donc leur action maximale comme activateurs de transcription (Nevins *et al.*, 1998). Les gènes impliqués dans l'initiation de la phase S, comme celui de la cycline A, et dans la réplication de l'ADN, comme ceux de la RR, de la thymidine kinase, de l'ADN polymérase α , de PCNA ou de la dihydrofolate réductase, deviennent ainsi fonctionnels (Dyson *et al.*, 1998). Ces données montrent que la protéine pRb joue un rôle central dans la régulation du passage de G1 à S. Son état de phosphorylation témoigne de l'entrée en phase S du cycle cellulaire.

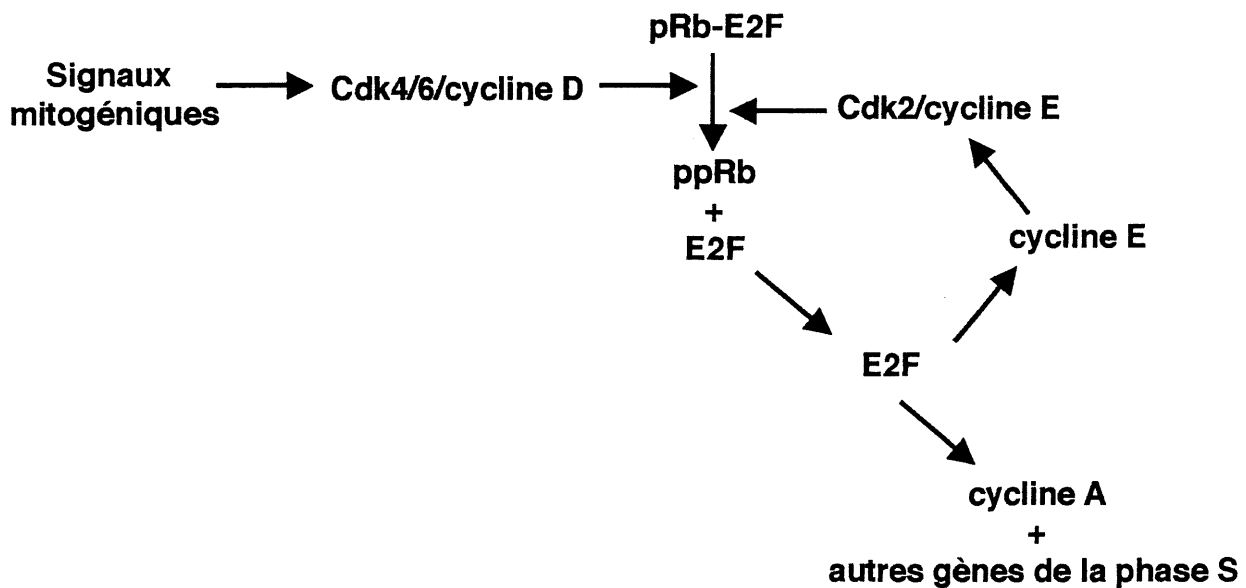


Figure 7: Contrôle du cycle cellulaire par pRb et E2F (Sherr *et al.*, 2000).

Quand il n'est pas phosphorylé, pRb s'attache au facteur de transcription E2F qui contrôle l'activité de toute une série de gènes dont les produits sont nécessaires à l'entrée en phase S. La phosphorylation de pRb par les complexes cdk4/6/cycline D entraîne sa dissociation partielle de E2F, ce qui va permettre la synthèse de la cycline E et la formation du complexe cdk2/cycline E. Celui-ci va compléter la phosphorylation de pRb, qui sera alors complètement dissocié de E2F.

3.5. Le contrôle de la transition G1/S

Lorsque l'ADN est endommagé, des mécanismes complexes sont activés. Ceux-ci conduisent à un arrêt du cycle cellulaire et permettent à la cellule, soit de réparer cet ADN, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire par apoptose (Fridman *et al.*, 2003). Comme expliqué plus haut, plusieurs niveaux d'arrêt sont possibles. Nous ne décrivons que le point de contrôle G1/S, les autres points de contrôle dépassant le cadre de cette thèse.

Le point de contrôle G1/S implique trois kinases appartenant à la famille des PIKKS (phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases): ATM, ATR et DNA-PK. Ces trois kinases peuvent identifier des cassures dans l'ADN ainsi que des nucléotides non naturels incorporés dans celui-ci (Achanta *et al.*, 2001; Sampath *et al.*, 2003). La kinase ATM est aussi activée en réponse aux radiations ionisantes et aux coupures double-brin de l'ADN, alors que les UV et les erreurs de réplication activent plutôt la kinase ATR (Matsuoka *et al.*, 2000). L'activation de ces kinases entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S par deux mécanismes différents (figure 8) (Bartek et Lucas, 2001).

(1) Arrêt rapide et indépendant de p53

ATM et ATR phosphorylent et activent Chk2 (Checkpoint kinase 2) et Chk1 (Checkpoint kinase 1) qui elles-mêmes phosphorylent la phosphatase CDC25A (partie gauche de la figure 8). Celle-ci est alors ubiquitinée et dégradée par le protéasome. L'inactivation de la phosphatase CDC25A, dont la fonction est principalement d'enlever les phosphorylations inhibitrices des thréonine 14 et tyrosine 15 de la cdk2 et de l'activer, a comme conséquence que la cdk2 reste phosphorylée et inactive et que le cycle cellulaire est arrêté en G1/S.

La voie ATM/ATR – Chk2/Chk1 – CDC25A – cdk2, dite voie rapide car elle permet un arrêt du cycle cellulaire par un mécanisme indépendant de la transcription de gènes et de la synthèse de protéines, est effective dans les minutes qui suivent le dommage à l'ADN.

Notons que cette voie peut aussi être activée par une lésion de l'ADN se produisant au cours de la réplication. L'inhibition de la cdk2 résultant de cette activation conduit alors à un arrêt du cycle cellulaire dit « intra S ».

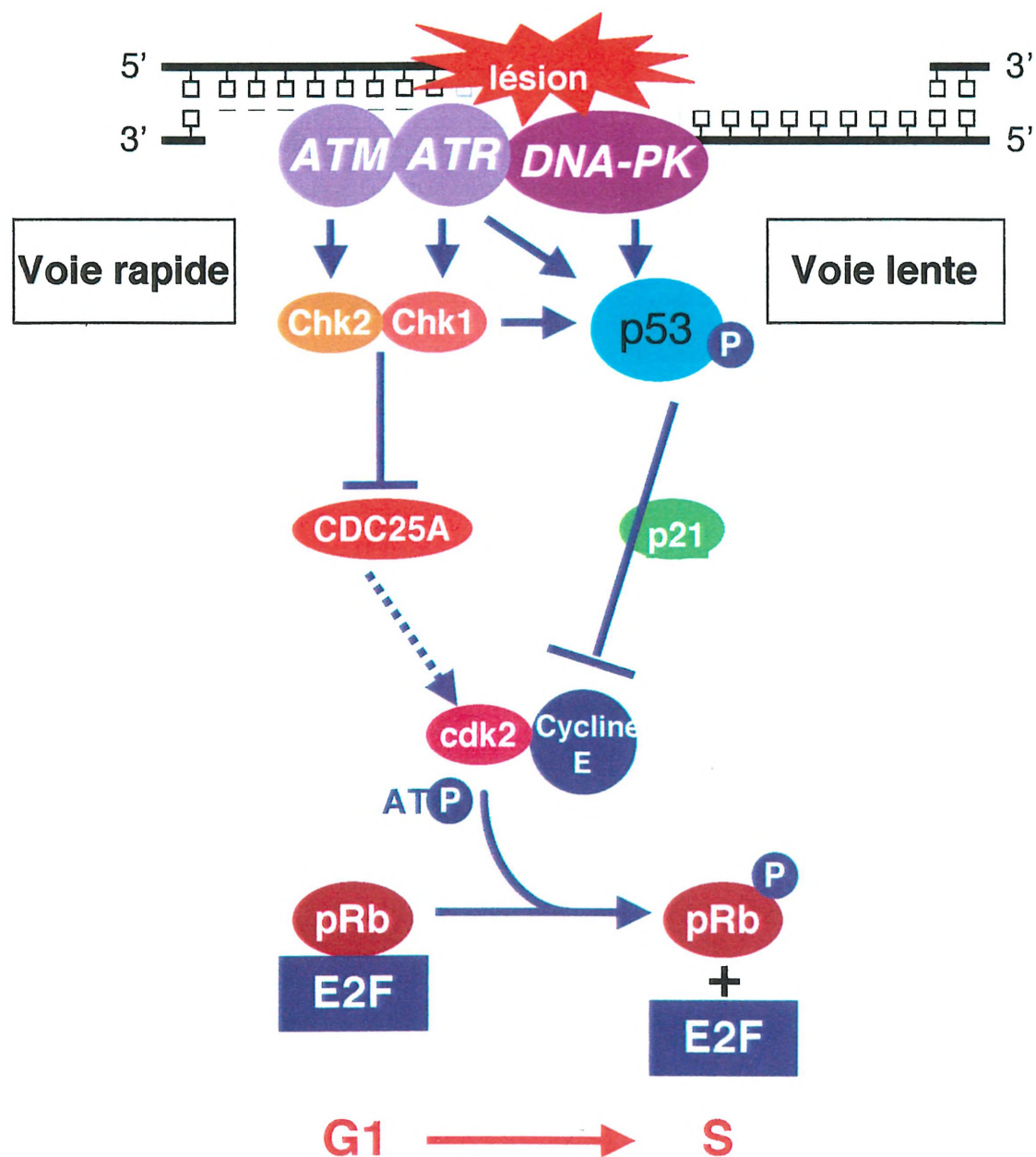


Figure 8: Activation du point de contrôle G1/S.

Comme expliqué dans le texte, un dommage dans l'ADN peut provoquer un arrêt de la transition G1/S par une voie rapide, indépendante de p53, et par une voie lente, dépendante de p53.

(2) Arrêt plus lent impliquant p53

ATM et ATR agissent également, de même que DNA-PK, par une voie dépendante du facteur de transcription p53 (partie droite de la figure 8). Cette protéine est responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes conduisant à des réponses multiples et en particulier à un arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose, comme expliqué dans la section 1.5.3. Dans des conditions normales, p53 est une protéine très instable. Elle est en effet liée au facteur MDM2, une protéine qui facilite sa dégradation dans le protéasome par la voie de l'ubiquitine, ce qui explique sa faible abondance dans les cellules en bon état. En revanche, lorsque l'ADN est endommagé, ATM, ATR et DNA-PK activées phosphorylent p53 sur la sérine 15, ce qui inhibe son interaction avec MDM2, la stabilise et l'active (Shieh *et al.*, 1997; Tibbetts *et al.*, 1999). Les kinases Chk1 et Chk2 la phosphorylent aussi sur la sérine 20, ce qui renforce encore son accumulation et son activation. La protéine p53 ainsi activée peut se lier à l'ADN et stimuler la transcription de gènes variés, et notamment du gène qui code le CKI p21. L'induction de p21 mène à l'inhibition de la cdk2 et à l'arrêt du cycle cellulaire en G1/S. La protéine p21 peut également empêcher directement la réplication de l'ADN en se fixant à PCNA (antigène nucléaire des cellules proliférantes), protomère de l'ADN polymérase δ . L'arrêt du cycle induit par la voie dépendante de p53, ou voie lente, permet de maintenir pendant plusieurs heures l'arrêt du cycle en G1/S qui a été initié par la voie rapide.

Le point de contrôle G1/S peut donc être activé par deux voies: indépendante et dépendante de p53, qui sont activées simultanément dans les minutes qui suivent le dommage à l'ADN, mais dont la réponse est différée dans le temps. L'activation des deux voies mène à l'inhibition du complexe cdk-2/cycline E et empêche la transition G1/S. Au niveau d'une population cellulaire, ce blocage se traduit par une accumulation des cellules à la transition G1/S et par une déplétion de cellules en phase S.

3.6. Effets des analogues de nucléosides sur le cycle cellulaire

Plusieurs chercheurs ont constaté que les analogues de nucléosides, comme la fludarabine et la gemcitabine, provoquent un arrêt du cycle cellulaire en phase S (Shi *et al.*, 2001; Sampath *et al.*, 2002). Concernant plus particulièrement la CdA, peu de choses ont été décrites. Dans les cellules lymphoblastiques CCRF-CEM, la CdA, à des concentrations

proches de l'IC₅₀, provoque une accumulation de cellules en phase S, plus exactement en phase « early S » (Huang *et al.*, 1986). A des concentrations plus élevées, elle provoque l'accumulation des cellules à la frontière G1/S, accompagnée d'une déplétion de cellules en phase S, G2 et M, indiquant que la CdA bloque un processus se déroulant spécifiquement à l'initiation de la phase S. Étonnamment, dans des cellules leucémiques de patients atteints de LLC-B, le pourcentage de cellules en phase S, qui est très bas vu que ces cellules sont quiescentes, s'est vu légèrement augmenté à des doses de CdA cytotoxiques (Petersen *et al.*, 1996). Cette élévation du pourcentage de cellules en phase S étant accompagnée d'une augmentation de l'incorporation dans l'ADN de bromodésoxyuridine (un analogue de la thymidine), elle a été considérée par les auteurs de cette étude comme une induction de la capacité de prolifération de ces lymphocytes sous l'effet de la CdA.

L'hypothèse la plus probable pour expliquer le mécanisme par lequel les analogues de nucléosides arrêtent le cycle cellulaire est l'induction d'un dommage à l'ADN qui, comme décrit dans la section précédente, peut activer un point de contrôle du cycle cellulaire. Les dommages susceptibles d'être produits dans l'ADN par les analogues de nucléosides sont de deux types. Tout d'abord, l'inhibition de la réplication ou de la réparation de l'ADN peut induire des cassures dans l'ADN qui peuvent être simple brin, ou double brin si les cassures simple brin viennent à se superposer. L'inhibition de la synthèse d'ADN peut aussi produire une terminaison anormale des brins (Seto *et al.*, 1985; Hirota *et al.*, 1989 ; Sampath *et al.*, 2003). Une autre possibilité est que l'analogue incorporé dans l'ADN en modifie la structure. En effet, des études de modélisation moléculaire prédisent que les résidus de CdAMP dans l'ADN peuvent tordre l'hélice d'ADN (Foley *et al.*, 2004). Quant aux molécules « senseurs », capables de reconnaître les dommages de l'ADN induits par les analogues de nucléosides, elles pourraient être la DNA-PK (Achanta *et al.*, 2001), ATM ou ATR. Selon Sampath *et al.* (2003), il semble que ATR soit le senseur le plus probable des dommages induits dans l'ADN par les analogues de nucléosides.

Concernant les voies de contrôle pouvant être activées par les analogues de nucléosides, peu de choses sont connues. La fludarabine peut provoquer l'arrêt en phase S du cycle cellulaire en activant la voie de contrôle « intra S » ou ATR - Chk1 – CDC25A, qui mène à l'inhibition de la cdk2 (Sampath *et al.*, 2002), tandis que l'ara-C peut activer la Chk1 et le point de contrôle G2/M (Shao *et al.*, 2004). On sait que la CdA peut augmenter l'expression de p53 ainsi que de p21 (Gartenhaus *et al.*, 1996; Galmarini *et al.*,

2003), et qu'elle peut bloquer la progression du cycle cellulaire dans des lymphocytes tumoraux (Huang *et al.*, 1986), mais il n'a jamais été décrit s'il y avait un lien entre ces deux événements, ni si l'augmentation d'expression de p21 provoquait une inhibition de l'activité de la cdk2 et de la phosphorylation de Rb. On ne sait pas non plus par quel mécanisme la CdA active p53.

Comme décrit dans la figure 8, l'élévation de p53 peut mener à un arrêt du cycle cellulaire, permettant à la cellule de réparer son ADN, mais cette fonction de survie pourrait être dépassée par sa capacité à déclencher la mort cellulaire par apoptose (Fridman *et al.*, 2003). L'hypothèse a été émise que le destin de la cellule résulte d'une balance entre des signaux de survie et des signaux apoptotiques, probablement en fonction de la quantité de dommages présents dans l'ADN. Si les concentrations en analogues sont des concentrations subléthales ou cytostatiques, il peut y avoir arrêt du cycle cellulaire, en phase S par exemple, réparation de l'ADN, et reprise de la prolifération cellulaire si les analogues de nucléosides sont éliminés (Shi *et al.*, 2001). Par contre, si les concentrations en analogues sont cytotoxiques, ce mécanisme de survie peut être dépassé et la fonction des molécules senseurs serait alors d'initier la mort cellulaire par apoptose (Sampath *et al.*, 2002; Sampath *et al.*, 2003).

3.7. Le rôle des cdks dans l'apoptose

3.7.1. Apoptose et cycle cellulaire

Le cycle cellulaire et l'apoptose sont deux processus aux finalités opposées. Au cours de l'apoptose, la cellule meurt en détruisant sélectivement ses protéines et son génome alors que le cycle cellulaire aboutit à la duplication du génome et à la production de deux nouvelles cellules. Cependant, d'un point de vue morphologique, l'apoptose et la division cellulaire présentent des caractéristiques communes comme des changements du cytosquelette, la fragmentation de l'enveloppe nucléaire et la condensation de la chromatine (Evan *et al.*, 1995). Cette observation a mené à la notion que l'apoptose pourrait découler d'un cycle cellulaire aberrant, phénomène décrit dans la littérature sous le nom de "mitotic catastrophe" (Evan *et al.*, 1995; Castedo *et al.*, 2004).

En accord avec cette hypothèse, plusieurs travaux effectués au cours de ces dernières années indiquent que des protéines intervenant dans le déroulement du cycle

cellulaire ou dans sa régulation sont aussi impliquées dans le processus apoptotique. Ainsi plusieurs oncogènes qui activent la prolifération cellulaire peuvent également induire l'apoptose, comme le facteur de transcription c-Myc qui peut réguler deux types de gènes indépendants, les uns contrôlant la prolifération, les autres l'apoptose quand il manque de facteurs de croissance (Evan *et al.*, 1992). De même, la protéine p53 peut intervenir dans l'induction de l'apoptose tout comme dans la régulation du cycle cellulaire. Meikrantz *et al.* (1995) suggèrent même que l'apoptose fait partie du cycle cellulaire et que le point de transition G1/S est le moment le plus probable pour que la cellule s'engage dans un programme apoptotique. Ceci implique l'existence de molécules présentes en fin de phase G1 dont l'activité facilite l'exécution de l'apoptose (Meikrantz *et al.*, 1996). De fait, plusieurs études indiquent que l'activation de la cdk2 corrèle avec l'induction de l'apoptose. D'autres cdk's intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ont été également impliquées dans l'apoptose (Borgne *et al.*, 2003).

3.7.2. Implication de la cdk2 dans l'apoptose

Une activation de la cdk2 a été observée à plusieurs reprises en réponse à des stimuli apoptotiques aussi variés qu'une irradiation aux rayons γ , la privation de facteurs de croissance, l'ischémie, l'addition de dexaméthasone, de TGF- β 1 ou d'étoposide, et ce, dans divers types cellulaires, notamment des thymocytes (Gil-Gomez *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Granes *et al.*, 2004), des myocytes (Wang *et al.*, 1996), des cellules endothéliales de la veine ombilicale (Levkau *et al.*, 1998), des cellules tumorales d'épithélium utérin (Meikrantz *et al.*, 1994) ainsi que dans des cellules tumorales de foie (Choi *et al.*, 1999). Le rôle joué par la cdk2 dans l'induction de l'apoptose a été établi par l'utilisation d'inhibiteurs de cette enzyme, comme la roscovitine ou l'olomoucine, qui se sont montrés capables de réduire ou même de bloquer complètement l'apoptose (Gil-Gomez *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 1999). L'utilisation de mutants négatifs dominants pour la cdk2 a également indiqué que l'activité cdk2 pouvait être nécessaire à la condensation de la chromatine ainsi qu'à d'autres événements spécifiques de l'apoptose (Levkau *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 2000).

Le mécanisme menant à l'activation de la cdk2 en réponse à des stimuli apoptotiques est hypothétique. Certains auteurs suggèrent que son activation pourrait être la conséquence d'un clivage de ses inhibiteurs protéiques, p21 et p27, par les caspases

apoptotiques (Levkau *et al.*, 1998; Gil-Gomez *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001). Elle pourrait également être due à une augmentation de l'expression de l'une ou l'autre des cyclines à laquelle elle doit être associée pour exercer une activité catalytique (Choi *et al.*, 1999), ou à son association avec une sous-unité régulatrice nouvellement synthétisée, ce qui pourrait modifier sa spécificité de substrat et lui permettre d'agir sur des cibles qui provoquent la mort cellulaire plutôt que la progression dans le cycle cellulaire (Gil-Gomez *et al.*, 1998).

Une fois activée, la cdk2 pourrait phosphoryler p53 et provoquer son accumulation, entraînant une augmentation de la transcription de la protéine pro-apoptotique Bax (Hakem *et al.*, 1999) et expliquer ainsi la chute de potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération de cytochrome c et l'activation des caspases exécutrices de l'apoptose (Gil-Gomez *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2003). L'activation de la cdk2 suite à un stimulus apoptotique peut aussi mener à une hyperphosphorylation de la protéine Rb (Choi *et al.*, 1999), empêchant par là un arrêt du cycle cellulaire, et laissant entrer improprement les cellules en phase S, avec comme résultat final une mort cellulaire inéluctable.

3.7.3. Implication d'autres cdks dans l'apoptose

Outre la cdk2, d'autres protéines kinases impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire peuvent jouer un rôle dans l'apoptose. Par exemple, les cdk4 et cdk6, qui habituellement contrôlent la prolifération cellulaire, ont été impliquées dans l'induction de l'apoptose par des agents endommageant l'ADN dans les neurones. De fait, la surexpression dans ces neurones des protéines p16, p21 ou p27, des inhibiteurs des cdk4 et cdk6, les protège de l'apoptose induite par les UV ou par la cytarabine (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 1998). Cette activation des cdk4 et 6 pourrait être due à une augmentation du taux de cycline D1. En effet, l'élévation artificielle du niveau de cycline D suffit à induire l'apoptose dans les neurones ainsi que dans d'autres types cellulaires (Kranenburg *et al.*, 1996). Une activation de la cdk1 a également été observée dans divers types cellulaires stimulés pour entrer en apoptose (Meikrantz *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 1996; Meikrantz *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1999).

Notons que l'activation de régulateurs du cycle cellulaire, comme les cdks, ne doit pas être considérée comme un prérequis universel au processus apoptotique. Ainsi, la surexpression de la cdk2 induite dans des lignées tumorales par le cytomégalo virus humain

confère à ces cellules une résistance à l'apoptose provoquée par l'étoposide, résistance que la roscovitine permet de décroître (Kim *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de certaines formes de la cdk1, avant ou pendant l'induction de dommages à l'ADN, augmente l'apoptose induite par ces dommages (Ongkeko *et al.*, 1995). Un autre exemple est celui de c-Myc, qui active transcriptionnellement l'expression de la cycline A dans des cellules prolifératives sans pour autant qu'elles n'entrent en apoptose (Hoang *et al.*, 1994). De manière plus générale, toutes les cellules qui prolifèrent contiennent des cdks actives, mais elles n'entrent pas pour autant en apoptose. Donc, si les cdks sont impliquées dans l'apoptose, d'autres facteurs doivent dicter si elles adoptent un rôle apoptotique ou un rôle mitogénique. De tels facteurs pourraient être la phase du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule, le type cellulaire, la nature et l'intensité du dommage, ou encore l'environnement en cytokines.

4. Objectifs de la thèse

Le but général de ce travail était de mieux comprendre le mécanisme d'action de la CdA dans la LLC-B. Au moment où débutèrent nos recherches, il était clairement établi que la CdA induisait l'apoptose dans les lymphocytes humains, qu'ils soient quiescents ou qu'ils se divisent, et qu'elle inhibait la réplication de l'ADN. Cette inhibition pouvait expliquer la cytotoxicité de la CdA dans les cellules en division, mais non dans les cellules quiescentes dans lesquelles des mécanismes alternatifs devaient être recherchés. Par ailleurs, que ce soit dans des cellules quiescentes ou non, le mécanisme par lequel la CdA induisait l'apoptose était encore à un stade spéculatif.

Nous avons choisi comme modèle expérimental la lignée leucémique EHEB, qui est une lignée établie à partir de lymphocytes d'une patiente atteinte de LLC-B (Saltman et al., 1990). Ces lymphocytes se divisent lentement avec un temps de dédoublement compris entre 50 et 70 h. Bien que la majorité des lymphocytes périphériques soient quiescents chez les patients souffrant de LLC-B, une proportion de ces cellules prolifèrent et ces cellules jouent un rôle important dans la progression de la maladie (Granziero et al., 2001). Les cellules EHEB peuvent être considérées comme un modèle de lymphocytes LLC-B qui prolifèrent.

Les premières expériences ont rapidement montré que la lignée leucémique EHEB était beaucoup moins sensible à la CdA que les lymphocytes fraîchement isolés de patients atteints de LLC-B et que d'autres lignées leucémiques, comme les cellules CCRF-CEM. Notre premier objectif fut dès lors de comprendre la ou les causes de cette résistance. En effet, comme expliqué dans la section 2 de ce chapitre, les phénomènes de résistance représentent un problème majeur dans le traitement de la leucémie par les analogues de nucléosides, y compris la CdA. Cette étude, rapportée dans le chapitre II, a montré que l'inhibition de la RR dans les cellules EHEB nécessitait une concentration de CdA beaucoup plus élevée que celle qui avait été déterminée dans d'autres lignées leucémiques comme la lignée CCRF-CEM (Griffing et al., 1989). De plus, il est apparu que la CdA provoquait dans ces cellules une augmentation de la synthèse d'ADN, qui s'expliquait par une augmentation de la proportion des cellules en phase S du cycle cellulaire. A la suite de ces observations, nous avons, d'une part, analysé pourquoi la RR des cellules EHEB paraissait résistante à l'action de la CdA (chapitre III) et d'autre part, tenté de comprendre le mécanisme de cet effet particulier de la CdA sur le cycle cellulaire, qui n'avait jamais été décrit, ainsi que ses implications (chapitre IV).

Chapitre II

Résistance à la CdA

de la lignée leucémique EHEB

Les numéros des figures mentionnés ci-dessous correspondent à ceux des figures de l'article intitulé "Resistance to 2-chloro-2'-deoxyadenosine of the human B-cell leukemia cell line EHEB", qui est joint à ce chapitre, à la page 56.

L'effet de la CdA n'ayant jamais été investigué dans la lignée leucémique EHEB, la première étape du travail présenté dans l'article joint à ce chapitre fut de déterminer si elle était sensible à cet analogue. La cytotoxicité de la CdA a été investiguée à l'aide du test au MTT, un test qui évalue l'activité métabolique des cellules. Nous avons observé que la concentration de CdA requise pour diminuer de 50 % la viabilité des cellules EHEB se situait aux environs de 5 μ M, soit une valeur 25 fois plus élevée que celle déterminée dans les mêmes conditions pour des lymphocytes de LLC-B (figure 1), et 10 à 1000 fois plus élevée que celles rapportées dans la littérature pour d'autres lignées leucémiques.

Comme la cause la plus fréquemment invoquée pour expliquer la résistance à la CdA est une incapacité des lymphocytes à accumuler suffisamment de CdATP, le métabolite actif de la CdA, nous avons commencé par analyser la capacité des cellules EHEB à phosphoryler la CdA. La vitesse de phosphorylation de la CdA, mesurée à une concentration de 50 μ M dans des lysats de cellules EHEB, s'est révélée être du même ordre de grandeur que celle mesurée dans des conditions similaires dans des lymphocytes de patients atteints de LLC-B ou que celles rapportées dans la littérature. De plus, la capacité des cellules EHEB à accumuler du CdATP et à incorporer celui-ci dans l'ADN (figure 2) nous semblait comparable à celle d'autres lignées leucémiques. Nous avons dès lors écarté *a priori* que la moindre sensibilité à la CdA des cellules EHEB puisse être expliquée par une activation insuffisante de la CdA en CdATP.

Un facteur déterminant dans la cytotoxicité de la CdA est sa capacité à inhiber la RR, une enzyme qui fournit les dNTPs nécessaires à la réplication de l'ADN. L'activité de cette enzyme peut s'étudier *in situ* en mesurant l'incorporation de cytidine radioactive dans l'ADN. L'utilisation de cette technique nous a montré qu'une inhibition significative de la RR n'était observée qu'en présence de CdA 10 μ M (figure 3), soit une concentration 100 fois plus élevée que celle déterminée dans la lignée CCRF-CEM (Griffith et al., 1989). En accord avec ce résultat, nous n'avons pas non plus observé de diminution de la concentration des dNTPs, mais plutôt une augmentation (figure 4).

L'inhibition de la RR et des ADN polymérases, qui est censée se produire suite au métabolisme de la CdA, conduit habituellement à une inhibition de la réplication de l'ADN, le mécanisme majeur par lequel la CdA exerce sa cytotoxicité dans les cellules qui se divisent. En mesurant l'incorporation de thymidine ou de désoxycytidine radioactive dans l'ADN, nous avons constaté que la légère inhibition qui était observée après 4 h d'incubation en présence de CdA était suivie, après 24 h d'incubation, par une augmentation significative de la synthèse d'ADN, cette augmentation étant la plus élevée à des concentrations proches de l'IC₅₀ et bien plus marquée avec la désoxycytidine comme précurseur qu'avec la thymidine (figures 5 et 6). Parallèlement à cette augmentation d'incorporation de thymidine et de désoxycytidine, nous avons également observé une augmentation, d'environ 3 fois, des activités de la thymidine kinase et de la désoxycytidine kinase (figure 7).

Cet effet surprenant de la CdA sur la synthèse d'ADN nous amena à analyser le cycle cellulaire par cytométrie de flux. Nous avons utilisé la technique utilisant un double marquage à l'iodure de propidium et à la bromodésoxyuridine. L'iodure de propidium permet d'estimer le contenu en ADN de chaque cellule composant une population cellulaire, tandis que la bromodésoxyuridine permet de déterminer si les cellules en phase S synthétisent activement de l'ADN. Cette technique nous a permis de comprendre que l'augmentation de la synthèse d'ADN observée en présence de CdA était la conséquence d'une augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire (figure 8).

En conclusion de cette première partie du travail, nous avons proposé que la faible sensibilité à la CdA des cellules EHEB pouvait s'expliquer, d'une part, par une insensibilité relative de la ribonucléotide réductase à la CdA, et d'autre part, par le fait que la CdA provoque dans cette lignée non pas une inhibition, mais une augmentation de la synthèse d'ADN, un fait n'ayant jamais été observé dans d'autres lignées leucémiques.

Resistance to 2-Chloro-2'-deoxyadenosine of the Human B-cell Leukemia Cell Line EHEB¹

Sabine Cardoen, Eric Van Den Neste,
Caroline Smal, Jean-François Rosier,
Anne Delacauw, Augustin Ferrant,
Georges Van den Berghe, and
Françoise Bontemps²

Laboratory of Physiological Chemistry, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, B-1200 Brussels, Belgium [S. C., E. V. D. N., C. S., A. D., G. V. d. B., F. B.]; Department of Hematology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, B-1200 Brussels, Belgium [E. V. D. N., A. F.]; and Tumoral Metabolism Research Unit, C. H. Jolimont-Lobbes, B-7100 La Louvière, Belgium [J.-F. R.]

ABSTRACT

The effects of 2-chloro-2'-deoxyadenosine (CdA, cladribine), an adenosine deaminase-resistant analogue toxic for both proliferating and resting lymphoid cells, were investigated in the human leukemia cell line EHEB, which was derived from a patient with B-cell chronic lymphocytic leukemia. These cells were found to be less sensitive to CdA than B-cell chronic lymphocytic leukemia lymphocytes (~25-fold) and other human lymphoblastic cell lines (10–1000-fold). Phosphorylation of CdA by deoxycytidine kinase and intracellular accumulation of 2-chloro-2'-deoxyadenosine triphosphate (CdATP) were similar in EHEB cells and in other CdA-sensitive cell lines. In contrast, the inhibitory effect of CdA on ribonucleotide reductase activity, which was investigated *in situ* by the conversion of cytidine into deoxyribonucleotides and its incorporation into DNA, was much less pronounced in EHEB cells than in other human lymphoblastic cells. Accordingly, concentrations of deoxynucleoside triphosphates did not decrease and even tended to rise. Unexpectedly, incorporation of thymidine and deoxycytidine into DNA was increased severalfold after a 24-h incubation with CdA. CdA also increased the activities of deoxycytidine kinase and thymidine kinase approximately 4-fold. Analysis of the cell cycle by flow cytometry showed that after

24 h, CdA provoked an increase in the proportion of cells in S phase, synthesizing DNA. We conclude that the EHEB cell line is resistant to the cytotoxic action of CdA not only because of a lack of inhibition of ribonucleotide reduction but also because CdA, in contrast with its known effects, provokes in this cell line an increase in the proportion of cells replicating their DNA. Unraveling of the mechanism of this effect may shed light on clinical resistance to CdA.

INTRODUCTION

CdA,³ an adenosine deaminase-resistant analogue of the natural nucleoside 2'-deoxyadenosine, is highly toxic to both proliferating and resting human lymphocytes (1–3). For this reason, it is widely used for the treatment of chronic lymphoid malignancies, particularly hairy cell leukemia and CLL (reviewed in Ref. 4). To exert its antileukemic effect, CdA has to be phosphorylated by dCK to CdAMP and then converted into CdADP and CdATP. CdATP inhibits various enzymes involved in DNA replication and repair, including ribonucleotide reductase and DNA polymerases α and β ; moreover, it can be incorporated into newly synthesized DNA, causing chain termination (reviewed in Ref. 5). Together, these actions result in the progressive accumulation of DNA strand breaks, leading to initiation of apoptosis by mechanisms that are not entirely clear (2). Recently, CdATP has been shown to contribute to caspase-3 activation in cell-free extracts, which may play a role in CdA-induced apoptosis in resting cells (6, 7).

With the aim of improving our understanding of the mechanisms by which CdA induces apoptosis in B-cell CLL lymphocytes, we studied the continuous B-cell CLL cell line EHEB (8). Unexpectedly, we observed that these cells were much less sensitive to CdA than freshly isolated B-cell CLL lymphocytes and several lymphoblastic cell lines and that this lower sensitivity could not be related to a reduced accumulation of CdATP, which is reportedly a determining factor in the effect of CdA (9). Further investigations showed that inhibition *in situ* of ribonucleotide reductase required higher concentrations of CdA in EHEB cells than in other proliferating cell lines (10). Moreover, CdA, at concentrations that are usually inhibitory (1, 10–12), increased both dThd incorporation into DNA and the proportion of cells in S phase of the cell cycle. This paradoxical, hitherto unreported effect of CdA on DNA synthesis was further investigated in relation with the resistance to CdA of the EHEB cell line.

Received 5/3/01; revised 7/23/01; accepted 7/31/01.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ Supported by Grants 7.4541.97 (Télévie) and 1.5.066.99 (Crédit aux Chercheurs) from the Fonds National de la Recherche Scientifique, the Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture, the Fédération Belge contre le Cancer, and the Fondation Salus Sanguinis.

² To whom requests for reprints should be addressed, at Laboratory of Physiological Chemistry, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology (ICP), Avenue Hippocrate 75, UCL-ICP 7539, B-1200 Brussels, Belgium. Phone: 32-2-7647539; Fax: 32-2-7647598; E-mail: bontemps@bchm.ucl.ac.be.

³ The abbreviations used are: CdA, 2-chloro-2'-deoxyadenosine; CdATP, 2-chloro-2'-deoxyadenosine triphosphate; BrdUrd, bromodeoxyuridine; CLL, chronic lymphocytic leukemia; Cyd, cytidine; dCK, deoxycytidine kinase; dCyd, deoxycytidine; dNTP, deoxynucleoside triphosphate; dThd, thymidine; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PBTB, PBS containing 0.5% Tween 20 and 0.5% BSA; PI, propidium iodide; TK, thymidine kinase.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Unlabeled CdA (>99.9% purity) was synthesized and supplied by Prof. L. Ghosez (Laboratory of Organic Chemistry, Louvain-la-Neuve, Belgium). Stock solutions were prepared in ethanol/150 mM NaCl (1:1 by volume). [$8\text{-}^3\text{H}$]CdA (4.7 mCi/mmol) and [$5\text{-}^3\text{H}$]Cyd (18.1 Ci/mmol) were purchased from Moravsek Biochemicals (La Brea, CA). [$\text{methyl-}^3\text{H}$]dThd (84 Ci/mmol) and [$5\text{-}^3\text{H}$]dCyd (24 Ci/mmol) were from Amersham International (Buckinghamshire, United Kingdom). MTT, hydroxyurea, BrdUrd, PI, and FITC-conjugated anti-BrdUrd antibodies were purchased from Sigma Chemical Co.-Aldrich (Bornem, Belgium). The mouse monoclonal BrdUrd-specific BR3 antibody (MD 5300) was from Caltag Laboratories, Inc. (San Francisco, CA). FCS was purchased from BioWhittaker Europe (Verviers, Belgium), RPMI 1640 was from Life Technologies Inc. (Merelbeke, Belgium), and all tissue culture reagents were from Gibco (Eggenstein, Germany). All other chemicals, materials, and reagents were of the highest quality available.

Cell Preparation and Incubation. The continuous cell lines EHEB and CCRF-CEM were cultured in RPMI 1640 with glutamate and supplemented with 10% heat-inactivated FCS at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air and routinely tested for *Mycoplasma* contamination. Freshly obtained peripheral blood from B-cell CLL patients was fractionated by Ficoll-Paque sedimentation. Mononuclear cells were washed and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 1% penicillin-streptomycin. Cells were counted, diluted to indicated concentration in RPMI 1640, and incubated at 37°C in 5% CO₂ in air. All patients had a confirmed diagnosis of B-cell CLL by cytological and immunological studies and were free of any cytotoxic therapy for at least 6 months. Only patients with lymphocyte counts over 30,000/ μl were selected.

Cytotoxicity Analysis. EHEB and CCRF-CEM cells (resuspended at a concentration of 0.2×10^6 cells/ml) and B-cell CLL cells (resuspended at a concentration of 1.5×10^6 cells) were incubated in the presence of various concentrations of CdA in 96-well plates. After 96 h, cell viability was measured using the MTT assay as described by Mosmann (13), with the modifications of Morabito *et al.* (14). Controls and CdA concentrations were set up in triplicate. The absorbance of each well was measured at 540 nm with a Multiwell Scanning Spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Cell viability, expressed as a percentage, was calculated by the equation: (mean absorbance of treated well/mean absorbance of control wells) $\times$ 100. The IC₅₀ was determined graphically. Cell viability was also estimated in a hemocytometer by trypan blue dye exclusion.

Apoptosis Assays. High molecular weight DNA fragmentation was analyzed by pulsed field gel electrophoresis as described by Huang *et al.* (15). Apoptin activity was determined with the FluoroAce Apoptin Assay from Bio-Rad.

Metabolism of CdA. To measure nucleotides synthesized from CdA, EHEB cells were incubated at a concentration of 1×10^6 cells/ml in the presence of [$8\text{-}^3\text{H}$]CdA (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$) and various concentrations of unlabeled CdA. Preparation of perchloric cell extracts and separation of labeled CdA nucleotides by high-performance liquid chromatography were performed as described previously (16). The amounts of nucleotides

synthesized were calculated from the specific radioactivity of CdA. To measure the amount of CdA incorporated into nucleic acids, radioactivity was determined in the acid-insoluble fraction of the cellular extract after two washings with 1 M perchloric acid and digestion with solvents.

Measurement of Ribonucleotide Reductase Activity in Intact Cells. As described by Griffing *et al.* (10), ribonucleotide reductase can be investigated in intact cells by measuring the conversion of Cyd into deoxynucleotides and its incorporation into DNA. Cells (5×10^6 cells/5 ml) were incubated for 24 h in the presence of various concentrations of CdA before the addition of [$5\text{-}^3\text{H}$]Cyd (1 $\mu\text{Ci/ml}$). One h after the addition of the latter precursor, incubation was stopped, and cells were treated as described previously (16). Acid-soluble ^3H -deoxynucleotides were quantified by high-performance liquid chromatography after destruction of ribonucleotides with NaIO₄ (17). Radioactivity incorporated into DNA was determined after removal of RNA from the acid-insoluble pellet by incubation with 0.5 N NaOH for 2 h at 37°C (18).

Determination of Deoxyribonucleoside Triphosphate Pools. Perchloric cell extracts were prepared as described for the measurement of labeled CdA nucleotides (16). Concentrations of dNTPs were determined using the DNA polymerase assay of Sherman and Fyfe (19), with the modifications of van Moorsel *et al.* (20). In each separate experiment, measurements were performed in triplicate. The intracellular concentrations of dNTPs were estimated from calibration curves obtained with pure standards.

DNA Synthesis. DNA synthesis was investigated by measuring the incorporation of [^3H]dThd into the acid-insoluble cellular fraction. Cell suspension (800 μl) containing 2×10^5 cells/ml was incubated for 4 h with [^3H]dThd (1 $\mu\text{Ci/ml}$). Subsequently, 200 μl were taken in triplicate, harvested on a multiscreen assay system 96-well filtration plate (Millipore; catalogue number MAGV N22), and washed successively with 100 μl of PBS, 200 μl of TCA 8%, 4×100 μl of H₂O, and finally with 1×200 and 3×100 μl of 70% ethanol. Remaining radioactivity associated with filters was counted. Incorporation of [^3H]dCyd into DNA was determined by the same procedure.

Measurement of Enzyme Activities. Frozen cell pellets corresponding to 10×10^6 cells were suspended in 0.5 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) and disrupted by three freeze/thawings. Assays were performed on the supernatant obtained after centrifugation. CdA phosphorylation was assayed with 50 μM [$8\text{-}^3\text{H}$]CdA (~ 200 cpm/pmol) and 0.03–0.05 mg of cellular protein in a final volume of 100 μl (21). TK and dCK activities were measured under the same assay conditions with 10 μM [^3H]dThd or 10 μM [$5\text{-}^3\text{H}$]dCyd (~ 1000 cpm/pmol) as substrates. The enzyme assays were carried out at 37°C, and 10- μl aliquots were taken after several appropriate time intervals, within 30 min, to yield a linear reaction rate. The protein content of cell extracts was measured by the method of Bradford (22), using BSA as the standard.

Cell Cycle Analysis. After incubation for the times indicated, with or without 10 μM CdA, samples containing 10×10^6 cells were pulse-labeled for 1 h with 10 μM BrdUrd, which is incorporated into DNA in place of dThd during DNA synthesis. The proportion of cells in S phase was determined by bivariate flow cytometric analysis using FITC-conjugated anti-

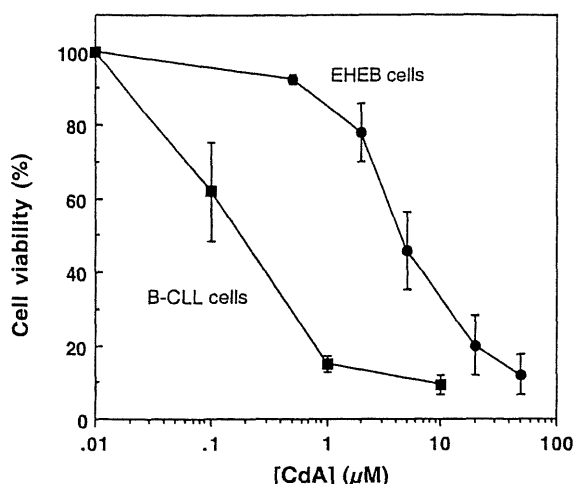


Fig. 1 Effect of CdA on viability of EHEB and B-cell CLL cells. Cell viability was measured by the MTT assay after 4 days of incubation in the presence of increasing concentrations of CdA. Results are the means $\pm$ SE of three separate experiments.

BrdUrd antibody to reveal nascent DNA and PI for total DNA content (23). Briefly, nuclei from BrdUrd pulse-labeled cells were isolated by pepsin treatment (0.04% in 0.1 M HCl). DNA was denatured in 2 N HCl for 20 min at 37°C, neutralized with 0.1 M Na₂B₄O₇, and washed with PBTB. Pellets were resuspended in 150 μ l of the same medium containing 500-fold diluted (v/v) mouse monoclonal BrdUrd antibody and incubated for 45 min at room temperature. Nuclei were washed in PBTB, centrifuged, and incubated for an additional 45 min with 150 μ l of FITC-labeled goat antimouse IgG (diluted 50-fold in PBTB). After washing, nuclei were resuspended in 2 ml of PI solution (10 μ g/ml PI in PBTB). RNase was added just before flow cytometry analysis to a final concentration of 5 μ g/ml.

All measurements were performed with a FACScan fluorescence-activated cell analyzer (Becton Dickinson). Data were analyzed by CellQuest I software (Becton Dickinson). For each sample, 15,000 events were collected. Debris and doublets were excluded from the analysis. Dot plots generated by FACScan analysis (see Fig. 8) show DNA content on the X axis (linear) and DNA synthesis on the Y axis (log). Both cell cycle distribution and DNA synthesis capacity can be estimated by gating BrdUrd-labeled (S phase) from unlabeled and single from double DNA content nuclei.

Data Analysis. All results of repeated experiments are given as the means $\pm$ SE. Significance was estimated by the paired two-tailed Student's *t* test.

RESULTS

Cytotoxicity of CdA. Sensitivity to CdA of the B-cell CLL cell line EHEB was evaluated by the MTT reduction assay after 4 days of incubation and compared with that of B-cell CLL lymphocytes freshly isolated from patients (Fig. 1). With an IC₅₀ of approximately 5 μ M, EHEB cells appear to be 25-fold less sensitive to CdA than B-cell CLL lymphocytes, for which an IC₅₀ of 0.2 μ M was calculated. An IC₅₀ of less than 0.5 μ M was determined by the same procedure in CCRF-CEM cells

(results not shown). Identical results were obtained when cell sensitivity to CdA was investigated by cell count in the presence of 0.1% trypan blue. Because of their quite long doubling time (48–72 h), the sensitivity of EHEB cells to CdA was also measured after 7 days of incubation with the drug, which reduced the IC₅₀ slightly from 5 to 2 μ M. This low sensitivity to CdA of EHEB cells contrasts with that of other human lymphoblastic cell lines, in which inhibition of cell growth or cytotoxicity was recorded with nanomolar concentrations of CdA (1, 3, 11, 24–28).

High molecular weight DNA fragments and activation of apopain/caspase-3 were detected in EHEB cells at concentrations of CdA that induced a loss of viability (data not shown). This indicates that cytotoxicity of CdA in EHEB cells, as in other cell lines and in B-cell CLL lymphocytes, results at least in part from induction of apoptosis.

Phosphorylation of CdA. Phosphorylation of CdA by dCK, leading to intracellular accumulation of CdATP, is a prerequisite for its cytotoxicity. Cell lines deficient in dCK are indeed resistant to the toxic effect of CdA (24), and a correlation has been evidenced between the level of phosphorylation of CdA and its cytotoxic effect (9). The rate of CdA phosphorylation (mean $\pm$ SE of three separate experiments), measured at a substrate concentration of 50 μ M, was 0.12 ± 0.02 nmol/min/mg protein in EHEB cell extracts as compared with 0.22 ± 0.03 nmol/min/mg protein in B-cell CLL cell extracts. These rates are in the same range as those determined by others in various lymphoblastoid cell lines (1, 29) and in B-cell CLL lymphocytes (21). Kinetic properties of the CdA phosphorylating activity were also investigated in EHEB cell extracts: a Michaelis-Menten curve with a *K_m* of 20 μ M was obtained, which accords with values found for recombinant dCK by Johansson and Karlsson (30).

Accumulation of CdA Nucleotides in Intact Cells and Incorporation into DNA. Because an active dCK could be counteracted by a high cytoplasmic 5'-deoxynucleotidase activity, leading to impaired accumulation of CdATP, we investigated the metabolism of CdA in intact EHEB cells. EHEB cells rapidly formed CdAMP and CdATP, whereas CdADP was nearly undetectable. Stable levels of CdA nucleotides were reached after 2 h and maintained for at least 24 h. Values measured after a 4-h incubation with CdA are presented in Fig. 2, which shows that maximal levels of CdAMP and CdATP were obtained at 20 μ M CdA. The calculated concentrations of CdATP were 1.73 ± 0.27 μ M at 0.5 μ M CdA and 9.9 ± 1.1 μ M at 20 μ M CdA (means $\pm$ SE of three separate experiments). These values are in the same range as those measured in other CdA-sensitive leukemia cell lines (3, 10). As also illustrated in Fig. 2, EHEB cells actively incorporated CdA into their DNA at a rate of 2.7 ± 0.7 pmol/10⁸ cells/h, which is comparable with that determined in CCRF-CEM lymphoblasts (1, 10). Taken together, these results dismiss impaired metabolism of CdA as the cause of the resistance of EHEB cells to this drug.

Effect of CdA on Ribonucleotide Reductase Activity. CdATP is one of the most potent inhibitors of ribonucleotide reductase identified to date, with an IC₅₀ of 0.1–0.3 μ M in cellular extracts (10). Inhibition of ribonucleotide reductase is hence assumed to be a determining factor in inhibition of DNA synthesis and cytotoxicity induced by CdA, at least in dividing

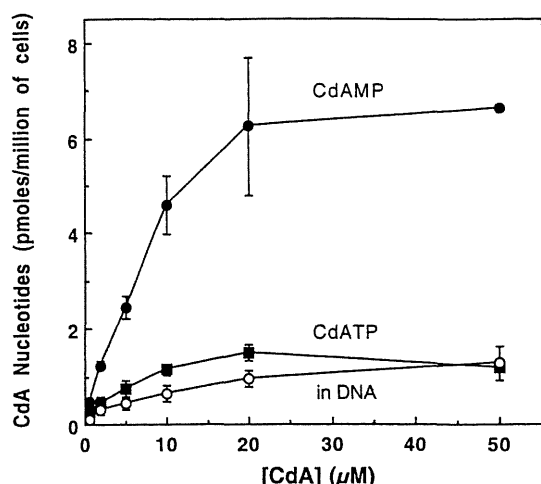


Fig. 2 CdA nucleotide levels and CdA incorporated in DNA in EHEB cells incubated for 4 h with various concentrations of $[8-^3\text{H}]\text{CdA}$. Values shown were calculated from the specific radioactivity of CdA and are the means $\pm$ SE of three separate experiments.

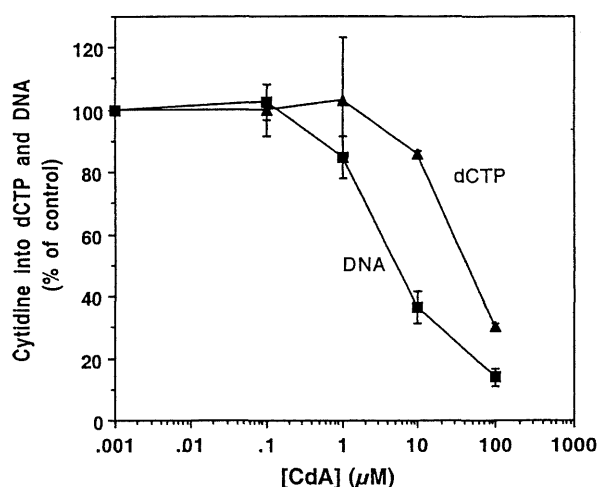


Fig. 3 Dose effect of CdA on Cyd conversion into dCTP and its incorporation into DNA. EHEB cells were incubated for 24 h in the presence of various concentrations of CdA, and then $[^3\text{H}]\text{Cyd}$ ($1 \mu\text{Ci/ml}$) was added. Incubations were stopped 1 h after the addition of Cyd. Results are the means $\pm$ SE of three and five separate experiments for dCTP and DNA, respectively.

cells. To evaluate ribonucleotide reductase activity *in situ*, we analyzed the effect of CdA on the conversion of labeled Cyd into deoxynucleotides and its incorporation into DNA (10). As depicted in Fig. 3, sizeable inhibition of the conversion of $[^3\text{H}]\text{Cyd}$ into dCTP and of its incorporation into DNA was not observed at concentrations of CdA below $10 \mu\text{M}$. It was verified that incorporation of $[^3\text{H}]\text{Cyd}$ into DNA could be inhibited in EHEB cells by $93 \pm 2\%$ ($n = 3$) by 1 mM hydroxyurea, an established ribonucleotide reductase inhibitor. As in Ref. 10, we observed an inhibition of ribonucleotide reductase *in situ* by CdA with an IC_{50} of less than $0.1 \mu\text{M}$ in CCRF-CEM cells. Thus, inhibition of ribonucleotide reduction required more than

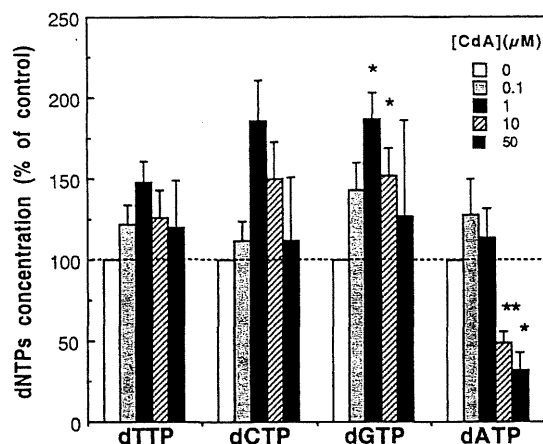


Fig. 4 Influence of CdA on concentrations of dNTPs in EHEB cells. Cells were incubated for 24 h with the indicated concentrations of CdA. dTTP, dCTP, dGTP, and dATP were determined by the DNA polymerase assay as described in "Materials and Methods." Values shown are the means $\pm$ SE of eight separate experiments for 0 and $10 \mu\text{M}$ CdA and of three separate experiments for 0.1, 1, and $50 \mu\text{M}$ CdA. Intracellular dNTP concentrations without CdA were: dTTP, $91.1 \pm 8.4 \mu\text{M}$; dCTP, $43.1 \pm 7.2 \mu\text{M}$; dGTP, $11.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$; and dATP, $50.3 \pm 8.3 \mu\text{M}$. Significant difference compared with controls without CdA: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$.

100-fold higher concentrations of CdA in EHEB cells than in CCRF-CEM cells.

Effect of CdA on dNTP Concentrations. In CdA-sensitive cell lines, CdA has been shown to lower the concentration of all or some of the dNTPs as a consequence of inhibition of ribonucleotide reductase by CdATP (10, 31–33). The fact that ribonucleotide reductase was only weakly inhibited by CdA in EHEB cells led us to measure the dNTP concentrations in these cells. Not only did a 24-h incubation in the presence of increasing concentrations of CdA fail to decrease the concentrations of the dNTPs, but it tended to elevate them (Fig. 4), with a maximal effect at around $1 \mu\text{M}$ CdA. Only dATP decreased significantly below the control values on incubation with 10 and $50 \mu\text{M}$ CdA.

Effect of CdA on DNA Precursor Incorporation. An inhibitory effect of CdA on DNA synthesis, as assessed by precursor incorporation, has been demonstrated in various sensitive cell lines (1, 10, 11, 24, 31) and in human resting and tonsillar lymphocytes (12, 34). The effect of CdA on the incorporation of $[^3\text{H}]\text{dThd}$ into DNA of EHEB cells is shown in Fig. 5. After a 4-h incubation, incorporation of $[^3\text{H}]\text{dThd}$ into DNA was inhibited by concentrations of CdA above $5 \mu\text{M}$. In marked contrast, after 24 h, it was significantly enhanced by the nucleoside at concentrations ranging from 2– $10 \mu\text{M}$. At $10 \mu\text{M}$ CdA, this incorporation was increased approximately 2-fold. This effect was still observed 48 and 72 h after the addition of CdA (results not shown). As illustrated in Fig. 6, incorporation of $[5-^3\text{H}]\text{dCyd}$ into DNA was also increased up to 4-fold by a 24-h incubation with $10 \mu\text{M}$ CdA. This effect was already detectable after a 4-h incubation. Both the increased dThd and dCyd incorporations were completely prevented by the addition of $100 \mu\text{M}$ dCyd, which competitively inhibits CdA phosphorylation (data not shown).

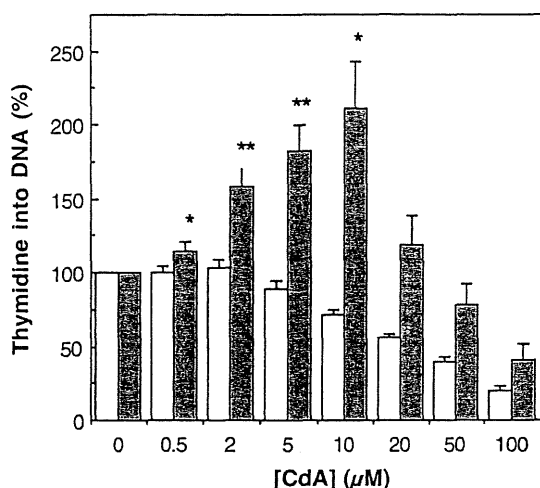


Fig. 5 Dose effect of CdA on dThd incorporation into DNA. EHEB cells were incubated for 4 h with [3 H]dThd (1 μ Ci/ml) added simultaneously with CdA ($\square$) or 20 h after its addition ($\square$). Results are the means $\pm$ SE of five or six separate experiments. Significant increase compared with controls without CdA: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$.

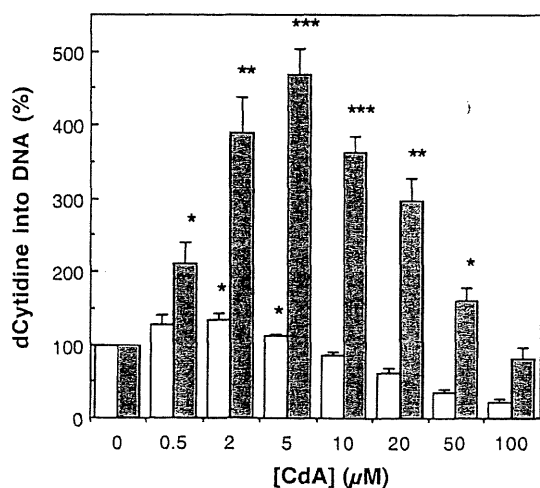


Fig. 6 Dose effect of CdA on dCyd incorporation into DNA. EHEB cells were incubated for 4 h with [3 H]dCyd (1 μ Ci/ml) added simultaneously with CdA ($\square$) or 20 h after its addition ($\square$). Results are the means $\pm$ SE of four or five separate experiments. Significant increase compared with controls without CdA: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; and ***, $P \leq 0.001$.

Effect of CdA on TK and dCK Activities. The fact that CdA elicited an increase in precursor incorporation and in the concentration of dNTPs in EHEB cells led us to investigate its effects on TK and dCK activities. As illustrated in Fig. 7, CdA induced a dose-dependent increase of the activities of both TK and dCK, as measured 24 h after its addition. A maximal effect was observed at $\sim 5 \mu\text{M}$ CdA for TK and at $\sim 1 \mu\text{M}$ CdA for dCK. For the latter enzyme (but not for TK), an increase of activity was already observable after 4 h [an increase from 15.5 ± 3.5 pmol/min/mg protein in the absence of CdA to 29.1 ± 4.2 pmol/min/mg protein in the presence of $10 \mu\text{M}$ CdA

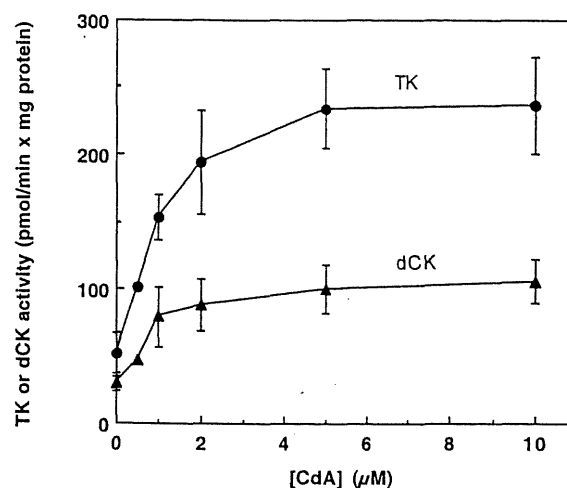


Fig. 7 Effect of CdA on TK and dCK activities. Activities were measured after 24 h of incubation in the presence of various concentrations of CdA. Results are the means $\pm$ SE of three separate experiments, except for $0.5 \mu\text{M}$ ($n = 2$).

(means $\pm$ SE of four separate experiments); $P < 0.05$]. The increase in TK activity was due to TK1, the cytoplasmic isoform, rather than to TK2, the mitochondrial isoform, because TK1 mRNA but not TK2 mRNA was detectable in the EHEB cells (results not shown). The stimulatory effect of CdA on dCK and TK activities was suppressed by coincubation with an excess of dCyd (data not shown), indicating that CdA has to be phosphorylated to exert this effect. The increase of these enzyme activities was not suppressed by dialysis of the cell lysates.

Effect of CdA on Cell Cycle Progression. Double labeling with PI and BrdUrd allows measurements of DNA content simultaneously with analysis of DNA synthesis activity because BrdUrd is an S-phase marker. Fig. 8 shows the scattergrams obtained by FACScan analysis of cells incubated for 24 h without (Fig. 8A) or with $10 \mu\text{M}$ CdA (Fig. 8B). The dashed lines separate the BrdUrd-incorporating cells (cells actively synthesizing DNA) from those that did not incorporate BrdUrd. Two cell subpopulations were distinguished among the BrdUrd-incorporating cells: (a) the early S-phase cells, with a DNA content close to 2 C and a variable degree of BrdUrd incorporation, which had entered S-phase during the 1 h-pulse of BrdUrd; and (b) the mid-late S-phase cells with a variable DNA content. The two subpopulations of cells that did not incorporate BrdUrd and have a DNA content of 2 or 4 C are G_1 or G_2 -M cells, respectively, that did not synthesize DNA during the pulse. Separation of the regions around the G_1 , early S, mid-late S, and G_2 -M subpopulations in the two scattergrams allowed determination of the percentages of populations within the cell cycle. Results obtained from four separate experiments, similar to those illustrated in Fig. 8, showed (Table 1) that the proportion of cells in G_1 phase was significantly decreased after a 24-h incubation with $10 \mu\text{M}$ CdA, whereas the proportion of cells synthesizing DNA (in either early or mid-late S phase) was significantly increased. The fact that the height of the crescent was the same without (Fig. 8A) or with CdA (Fig. 8B) indicates

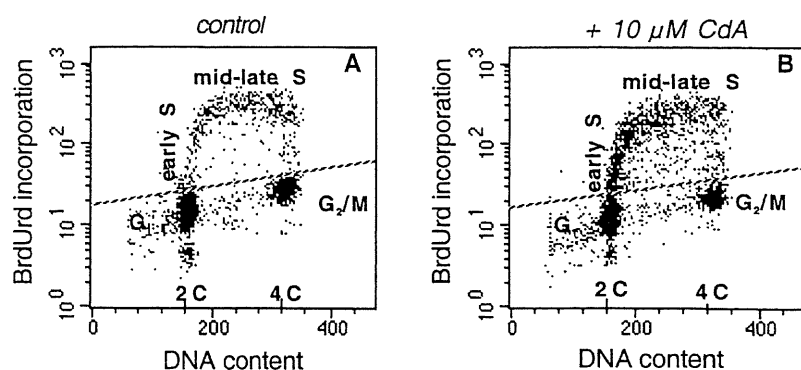


Fig. 8 Simultaneous analysis of DNA synthesis and DNA content by BrdUrd incorporation, PI staining, and fluorescence-activated cell-sorting analysis. EHEB cells incubated for 24 h without (A) or with (B) 10 μ M CdA were pulsed with BrdUrd for 60 min, stained for DNA synthesis with FITC-conjugated BrdUrd antibody, and stained for DNA content with PI. Dot plots show DNA synthesis on the Y axis and DNA content on the X axis.

Table 1 Effect of CdA on the distribution of cells within the cell cycle

EHEB cells were incubated for 24 h with or without 10 μ M CdA. The percentage of cells in G₁, early S, S, and G₂-M phases were estimated as explained in the text. Results are the means $\pm$ SE of four separate experiments.

	G ₁	Early S	Mid-late S	G ₂ -M
Control	67 $\pm$ 1.7	4.3 $\pm$ 0.8	13 $\pm$ 1.6	15 $\pm$ 1.1
10 μ M CdA	52 $\pm$ 2.4 ^a	13 $\pm$ 3.1 ^b	23 $\pm$ 1.7 ^a	11 $\pm$ 0.9 ^b

^a $P < 0.001$, significance between control and CdA.

^b $P < 0.05$, significance between control and CdA.

that CdA did not increase the rate of DNA synthesis but only increased the number of cells synthesizing DNA. As also shown in Table 1, the proportion of cells in G₂-M was only slightly decreased. Additional studies (data not shown) showed that a 6-h exposure of EHEB cells to CdA did not significantly modify the distribution of cells among the phases of the cell cycle, whereas a pattern similar to that given in Table 1 was observed 48 h after CdA addition. In contrast with EHEB cells, exposure of CCRF-CEM cells to CdA for 6 or 24 h suppressed the subpopulation of cells incorporating BrdUrd (results not shown).

DISCUSSION

This study shows that EHEB cells are approximately 25-fold less sensitive to CdA than lymphocytes freshly isolated from patients with B-cell CLL (Fig. 1) and 10–1000-fold less sensitive to CdA than other lymphoblastic cells (1, 3, 11, 24–28). The importance of the level of CdA phosphorylation in the cytotoxic effect of CdA has been emphasized by several authors (1, 9, 26, 29), and although there is not a simple relationship between the intracellular concentration of CdATP and the cytotoxicity of CdA, less sensitive cell lines tend to accumulate less CdATP than more sensitive ones (3). However, as mentioned in "Results," the relative resistance of EHEB cells to CdA could not be explained by a defect in the accumulation of CdATP. Indeed, CdATP accumulated to the same levels in EHEB cells as in other sensitive cell lines (1, 3, 10, 35). In addition, EHEB cells incorporated CdA into DNA at a rate that was in the same range as that seen in the CCRF-CEM cell line, which is very sensitive to CdA (1, 10). Taken together, these

data preclude a defect in the metabolism of CdA as the mechanism of resistance of EHEB cells to this drug.

CdATP is a potent inhibitor of ribonucleotide reductase; thus, its intracellular accumulation is expected to provoke a strong inhibition of the conversion of Cyd into dCTP and its incorporation into DNA (10). However, these processes were only marginally inhibited in EHEB cells at CdA concentrations below 10 μ M (Fig. 3), whereas they were nearly totally inhibited at 0.1 μ M in CCRF-CEM cells. These findings are in accord with recent reports that suggest that differences in purine analogue cytotoxicity could also be related to differences in inhibition or regulation of ribonucleotide reductase (27, 36). In accordance with the weak inhibition of ribonucleotide reduction, dNTP concentrations, which decrease in CdA-sensitive cell lines as a consequence of the inhibition of ribonucleotide reductase, were not lowered in EHEB cells and even tended to increase under CdA (Fig. 4).

In CdA-sensitive cell lines, DNA synthesis was found to be nearly completely inhibited at concentrations of CdA around 1 μ M (1, 10–12, 24, 31). At these concentrations, DNA synthesis, as measured 4 h after the addition of CdA by the incorporation of dThd, was not inhibited in EHEB cells (Fig. 5). On the contrary, it was dose-dependently increased after a 24-h incubation in the presence of up to 10 μ M nucleoside (Fig. 5). This stimulatory effect was observed not only on the incorporation of dThd into DNA but also on that of dCyd into DNA (Fig. 6), which, for unexplained reasons, was markedly more stimulated than that of dThd.

Cell cycle analysis (Fig. 8 and Table 1) showed that 10 μ M CdA significantly enlarged the proportion of cells in S phase and that this increase was correlated with an increase in the number of cells incorporating BrdUrd in either early S phase or mid-late S phase. These results indicate that the increase of dThd incorporation observed after CdA in EHEB cells is not due to an increase in the rate of DNA synthesis but rather to an increase in the number of cells synthesizing DNA. These effects of CdA on the cell cycle and dThd incorporation have, to our knowledge, never been reported, although DNA synthesis has not been systematically investigated in CdA-resistant cell lines. They contrast with those reported in CCRF-CEM cells, in which CdA inhibits DNA synthesis and provokes an accumulation of most cells in either early S phase or at the G₁-S border, accompanied by a progressive depletion of cells in S and G₂-M phase (11). We have also observed in CCRF-CEM cells that the latter

events are accompanied by a suppression of BrdUrd incorporation. Our observation that EHEB cells did not accumulate in G₂ phase indicates that the accumulation of cells in S phase is not due to a block at the G₂-M boundary. It remains to be determined whether accumulation of EHEB cells in S phase is due to a stimulation of entry into this phase or to a delay in progression therein. An increase in DNA repair by CdA can also be suspected because of the accumulation of EHEB cells in early S phase. Accumulation of cells in S phase most likely accounts for the elevation of activity of TK1, an S-phase enzyme involved in the nucleoside salvage pathway (37–39), after the addition of CdA (Fig. 7). The accumulation of cells in S phase, the increase in TK and dCK activities, and the weak inhibition of ribonucleotide reductase, which is also an S-phase enzyme, could account for the increase in dNTP concentrations observed after incubation with CdA.

Activation of dCK by short-term treatment with CdA has already been reported in human tonsillar lymphocytes (12, 40). In the latter cells, however, DNA synthesis was concomitantly strongly inhibited by CdA, and TK activity was not stimulated. A posttranslational modification of dCK has been proposed to explain its CdA-induced activation in human tonsillar lymphocytes, based on the observation that the amount of dCK protein was not modified by CdA treatment (12). Moreover, it has been shown that dCK can be inactivated by protein phosphatase treatment (41). In human tonsillar lymphocytes, activation of dCK by CdA can be prevented by an excess of dCyd, which competes with CdA for phosphorylation (12). Similarly, we observed that an excess of dCyd prevented the activation of TK as well as dCK, and suppressed the increase of dThd and dCyd incorporation into DNA by CdA in EHEB cells. These results indicate that the latter process and the increases of TK and dCK activities are linked and that they occur secondary to CdA phosphorylation.

We conclude that the resistance of the human B-leukemia cell line EHEB to CdA does not result from an impairment of its phosphorylation into CdATP but from a complex series of events encompassing poor inhibition of ribonucleotide reductase and an increase in the proportion of DNA-synthesizing cells in S phase. Questions such as why ribonucleotide reductase *in situ* is less sensitive to CdA and why cells accumulate in S phase remain to be unraveled. Elucidation of these processes may shed light on the resistance to CdA in clinical situations and lead to its rational association with other drugs to improve its efficacy.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. P. van der Bruggen for the use of the multiwell scanning spectrophotometer, Dr. K. van Moorsel for help with dNTP determination by the DNA polymerase assay, and Dr. V. Gregoire for expert advice.

REFERENCES

1. Carson, D. A., Wasson, D. B., Taetle, R., and Yu, A. Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood*, 62: 737–743, 1983.
2. Seto, S., Carrera, C. J., Kubota, M., Wasson, D. B., and Carson, D. A. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 75: 377–383, 1985.
3. Avery, T. L., Reh, J. E., Lumm, W. C., Harwood, F. C., Santana, V. M., and Blakley, R. L. Biochemical pharmacology of 2-chlorode-

- oxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. *Cancer Res.*, 49: 4972–4978, 1989.
4. Delannoy, A. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine: clinical applications in hematology. *Blood Rev.*, 10: 148–166, 1996.
5. Plunkett, W., and Gandhi, V. Nucleoside analogs: cellular pharmacology, mechanisms of action, and strategies for combination therapy. In: B. D. Cheson, M. J. Keating, and W. Plunkett (eds.), *Nucleoside Analogs in Cancer Therapy*, pp. 1–35. New York: Marcel Dekker, 1997.
6. Leoni, L. M., Chao, Q., Cottam, H. B., Genini, D., Rosenbach, M., Carrera, C. J., Budihardjo, I., Wang, X., and Carson, D. A. Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9567–9571, 1998.
7. Genini, D., Budihardjo, I., Plunkett, W., Wang, X., Carrera, C. J., Cottam, H. B., Carson, D. A., and Leoni, L. M. Nucleotide requirements for the *in vitro* activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J. Biol. Chem.*, 275: 29–34, 2000.
8. Saltman, D., Bansal, N. S., Ross, F. M., Ross, J. A., Turner, G., and Guy, K. Establishment of a karyotypically normal B-chronic lymphocytic leukemia cell line; evidence of leukemic origin by immunoglobulin gene rearrangement. *Leuk. Res.*, 14: 381–387, 1990.
9. Arner, E. S. J. On the phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) and its correlation with clinical response in leukemia treatment. *Leuk. Lymphoma*, 21: 225–231, 1996.
10. Griffing, J., Koob, R., and Blakley, R. L. Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. *Cancer Res.*, 49: 6923–6928, 1989.
11. Huang, M.-C., Ashmun, R. A., Avery, T. L., Kuehl, M., and Blakley, R. L. Effects of cytotoxicity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-bromo-2'-deoxyadenosine on cell growth, clonogenicity, DNA synthesis, and cell cycle kinetics. *Cancer Res.*, 46: 2362–2368, 1986.
12. Sasvari-Szekely, M., Spasokoukotskaja, T., Szoke, M., Csapo, Z., Turi, A., Szanto, I., Eriksson, S., and Staub, M. Activation of deoxycytidine kinase during inhibition of DNA synthesis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine) in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 56: 1175–1179, 1998.
13. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55–63, 1983.
14. Morabito, F., Messina, G., Oliva, B., Ramirez, F., Callea, V., Brugiattelli, M., and Nobile, F. *In vitro* chemosensitivity of chronic lymphocytic leukemia B-cells to multidrug regimen (CEOP) compounds using the MTT colorimetric assay. *Haematologica*, 78: 213–218, 1993.
15. Huang, P., Robertson, L. E., Wright, S., and Plunkett, W. High molecular weight DNA fragmentation: a critical event in nucleoside analogue-induced apoptosis in leukemia cells. *Clin. Cancer Res.*, 1: 1005–1013, 1995.
16. Bontemps, F., Delacauw, A., Cardoen, S., Van Den Neste, E., and Van den Berghe, G. Metabolism and cytotoxic effects of 2-chloroadenine, the major catabolite of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Biochem. Pharmacol.*, 59: 1237–1243, 2000.
17. Garrett, C., and Santi, D. V. A rapid and sensitive high pressure liquid chromatography assay for deoxyribonucleoside triphosphates in cell extracts. *Anal. Biochem.*, 99: 268–273, 1979.
18. Xu, Y.-Z., Huang, P., and Plunkett, W. Functional compartmentation of dCTP pools. Preferential utilization of salvaged deoxycytidine for DNA repair in human lymphoblasts. *J. Biol. Chem.*, 270: 631–637, 1995.
19. Sherman, P. A., and Fyfe, J. A. Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. *Anal. Biochem.*, 180: 222–226, 1989.
20. van Moorsel, C. J. A., Pinedo, H. M., Veerman, G., Guechev, A., Smid, K., Loves, W. J. P., Vermorken, J. B., Postmus, P. E., and Peters, G. J. Combination chemotherapy studies with gemcitabine and etoposide in non-small cell lung and ovarian cancer cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, 57: 407–415, 1999.

21. Arner, E. S. J., Spasokoukotskaja, T., Juliusson, G., Liliemark, J., and Eriksson, S. Phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) in extracts of peripheral blood mononuclear cells of leukaemic patients. *Br. J. Haematol.*, **87**: 715–718, 1994.
22. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248–254, 1976.
23. Dolbeare, F., Gratzner, H., Pallavicini, M. G., and Gray, J. W. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**: 5573–5577, 1983.
24. Carson, D. A., Wasson, D. B., Kaye, J., Ullman, B., Martin, D. W., Robins, R. K., and Montgomery, J. A. Deoxycytidine kinase-mediated toxicity of deoxyadenosine analogs toward malignant human lymphoblasts *in vitro* and toward murine L1210 leukemia *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6865–6869, 1980.
25. Carson, D. A., Wasson, D. B., Esparza, L. M., Carrera, C. J., Kipps, T. J., and Cottam, H. B. Oral antilymphocyte activity and induction of apoptosis by 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 2970–2974, 1992.
26. Dumontet, C., Fabianowska-Majewska, K., Mantincic, D., Callet Bauchu, E., Tigaud, I., Gandhi, V., Lepoivre, M., Peters, G. J., Rolland, M. O., Wyczechowska, D., Fang, X., Gazzo, S., Voorn, D. A., Vanier-Viorner, A., and Mackey, J. Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br. J. Haematol.*, **106**: 78–85, 1999.
27. Månsson, E., Spasokoukotskaja, T., Sällström, J., Eriksson, S., and Albertioni, F. Molecular and biochemical mechanisms of fludarabine and cladribine resistance in a human promyelocytic cell line. *Cancer Res.*, **59**: 5956–5963, 1999.
28. Lotfi, K., Månsson, E., Chandra, J., Wang, Y., Xu, D., Knaust, E., Spasokoukotskaja, T., Liliemark, E., Eriksson, S., and Albertioni, F. Pharmacological basis for cladribine resistance in a human acute T lymphoblastic leukaemia cell line selected for resistance to etoposide. *Br. J. Haematol.*, **113**: 339–346, 2001.
29. Orr, R. M., Talbot, D. C., Aherne, G. W., Fisher, T. C., Serafinowski, P., and Harrap, K. R. 2'-Deoxycytidine kinase deficiency is a major determinant of 2-chloro-2'-deoxyadenosine resistance in lymphoid cell lines. *Clin. Cancer Res.*, **1**: 391–398, 1995.
30. Johansson, M., and Karlsson, A. Differences in kinetic properties of pure recombinant human and mouse deoxycytidine kinase. *Biochem. Pharmacol.*, **50**: 163–168, 1995.
31. Hirota, Y., Yoshioka, A., Tanaka, S., Watanabe, K., Otani, T., Minowada, J., Matsuda, A., Ueda, T., and Wataya, Y. Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res.*, **49**: 915–919, 1989.
32. Gandhi, V., Estey, E., Keating, M. J., Chucrallah, A., and Plunkett, W. Chlorodeoxyadenosine and 1- β -D-arabinofuranoxylcytosine in patients with acute myelogenous leukemia: pharmacokinetic, pharmacodynamic, and molecular interactions. *Blood*, **87**: 256–264, 1996.
33. Wilson, P. K., Szabados, E., Mulligan, S. P., and Christopherson, R. I. Comparative effects of cladribine, fludarabine and pentostatin on nucleotide metabolism in T- and B-cell lines. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **30**: 833–842, 1998.
34. Seto, S., Carrera, C. J., Wasson, D. B., and Carson, D. A. Inhibition of DNA repair by deoxyadenosine in resting human lymphocytes. *J. Immunol.*, **136**: 2839–2843, 1986.
35. Carrera, C. J., Terai, C., Lotz, M., Curd, J. G., Piro, L. D., Beutler, E., and Carson, D. A. Potent toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward human monocytes *in vitro* and *in vivo*. A novel approach to immunosuppressive therapy. *J. Clin. Investig.*, **86**: 1480–1488, 1990.
36. Parker, W. B., Shaddix, S. C., Rose, L. M., Shewach, D. S., Hertel, L. W., Secrist, J. A., III, Montgomery, J. A., and Bennett, L. L., Jr. Comparison of the mechanism of cytotoxicity of 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-arabinofuranosyl)-adenine, 2-chloro-9-(2-deoxy-2-fluoro- β -D-ribofuranosyl)adenine, and 2-chloro-9-(2-deoxy-2,2-difluoro- β -D-ribofuranosyl)adenine in CEM cells. *Mol. Pharmacol.*, **55**: 515–520, 1999.
37. Bello, L. J. Regulation of thymidine kinase synthesis in human cells. *Exp. Cell Res.*, **89**: 263–274, 1974.
38. Johnson, L. F., Rao, L. G., and Muench, A. J. Regulation of thymidine kinase enzyme level in serum-stimulated mouse 3T6 fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **138**: 79–85, 1982.
39. Hengstschläger, M., Pfeilstöcker, M., and Wawra, E. Thymidine kinase expression: a marker for malignant cells. In: *Purine and Pyrimidine Metabolism in Man*, pp. 455–460. New York: Plenum Press, 1998.
40. Spasokoukotskaja, T., Sasvari-Szekely, M., Keszler, G., Albertioni, F., Eriksson, S., and Staub, M. Treatment of normal and malignant cells with nucleoside analogues and etoposide enhances deoxycytidine kinase activity. *Eur. J. Cancer*, **35**: 1862–1867, 1999.
41. Csapo, Z., Sasvari-Szekely, M., Spasokoukotskaja, T., Talianidis, I., Eriksson, S., and Staub, M. Activation of deoxycytidine kinase by inhibition of DNA synthesis in human lymphocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **61**: 191–197, 2001.

Chapitre III

Analyse de la résistance de la ribonucléotide réductase à la CdA dans les cellules EHEB

Ce chapitre présente certains des résultats obtenus au cours d'un travail de fin d'études (Duhayon, 2002), qui visait à comprendre pourquoi l'inhibition de la RR dans les cellules EHEB nécessitait une concentration en CdA beaucoup plus élevée que celle qui avait été déterminée dans la lignée leucémique CCRF-CEM (Griffig et al., 1989).

Il a d'abord été confirmé à l'aide d'un test au MTT que la lignée leucémique CCRF-CEM était bien beaucoup plus sensible à la CdA que la lignée EHEB (figure 9). De même, nous avons vérifié à l'aide d'un test *in situ* identique à celui décrit dans le chapitre précédent que la RR des cellules CCRF-CEM était complètement inhibée en présence de CdA 1 μM , une concentration qui était quasi sans effet sur la RR des cellules EHEB (figure 10, à comparer à la figure 3 de l'article présenté au chapitre II).

La moindre sensibilité à la CdA de la RR des cellules EHEB pouvait être due à une altération de ses propriétés cinétiques, ou à une moindre capacité à accumuler le CdATP. En effet, c'est par l'intermédiaire de ce métabolite que la CdA inhibe la RR (voir section 1.4.1.). Le CdATP est un des plus puissants inhibiteurs connus de cette enzyme. Selon Griffig et al. (1989), la valeur de l' IC_{50} pour le CdATP, déterminée sur une RR non purifiée, avec le CDP comme substrat, est de 0,28 μM à comparer avec un IC_{50} de 45 μM pour le dATP, l'effecteur négatif physiologique de l'enzyme. La RR étant une enzyme dont l'activité est particulièrement difficile à mesurer, nous avons commencé par vérifier si la concentration en CdATP atteinte en présence d'une même concentration de CdA était comparable dans les deux lignées cellulaires. Ainsi que l'illustre la figure 11, l'accumulation de CdATP dans les cellules EHEB s'est montrée de loin inférieure à celle mesurée dans les cellules CCRF-CEM, et ce particulièrement aux concentrations en CdA les plus faibles. L'incorporation de CdA dans l'ADN était elle aussi beaucoup moins importante dans les cellules EHEB (figure 12).

Pour évaluer correctement l'effet du CdATP sur les enzymes, il nous fallait connaître sa concentration intracellulaire, et donc le volume de la cellule. Celui-ci a d'abord été déterminé à l'aide d'un appareil Coulter. Les volumes obtenus par cette technique furent de 150 fl pour les cellules EHEB et de 80 fl pour les cellules CCRF-CEM. Cette dernière valeur nous a grandement surpris étant donné que des valeurs proches de 1000 fl sont habituellement rapportées dans la littérature pour ces cellules (Griffig et al., 1989 ; Plunkett et al., 1997). Face à cette discordance, il nous a été proposé de déterminer le volume de ces deux types de lymphoblastes à partir de leur diamètre. Celui-ci a été mesuré à l'aide d'un microscope optique et d'une vis micrométrique, et le volume calculé en utilisant la formule du volume

d'une sphère. Un volume de 1911 fl a été calculé pour les cellules EHEB, et de 983 fl pour les cellules CCRF-CEM, cette dernière valeur correspondant tout à fait à celles données dans la littérature. Le tableau 1 compare les valeurs de CdATP, exprimées en μM , dans les cellules EHEB et CCRF-CEM à plusieurs concentrations de CdA. Ce mode d'expression des résultats accentue encore la différence entre les deux types cellulaires. A des concentrations de CdA inférieures ou égales à 2 μM , la concentration en CdATP est environ 30 fois plus élevée dans les cellules CCRF-CEM que dans les cellules EHEB. Nous pensons que cette différence dans la concentration du CdATP explique, au moins partiellement, la différence d'inhibition de la RR exercée par la CdA entre les deux lignées cellulaires.

Au départ, nous pensions que l'accumulation de CdATP dans les cellules EHEB était comparable à celle rapportée dans la littérature pour d'autres types cellulaires, alors qu'elle est en réalité bien plus faible. L'erreur provient du fait que le volume cellulaire utilisé pour le calcul de la concentration du CdATP dans les cellules EHEB était au départ erroné. Nous avons en effet utilisé la valeur donnée par l'appareil Coulter qui était de 150 fl, ce qui a mené à une surestimation de la concentration du CdATP.

Afin d'expliquer la différence d'accumulation de CdATP entre la lignée EHEB et CCRF-CEM, nous avons comparé l'activité dCK dans les deux types cellulaires. Nous avons observé que l'activité dCK mesurée en présence de CdA 50 μM valait 90 ± 3 pmoles/min/mg protéines et 365 ± 27 pmoles/min/mg protéines dans les cellules EHEB et CCRF-CEM, respectivement. Par Western blot, nous avons également observé que la quantité de dCK était plus faible dans les cellules EHEB que dans les cellules CCRF-CEM.

L'ensemble de ces données a permis de considérer les résultats précédemment publiés sous un jour nouveau. Nous proposons actuellement que la relative résistance des cellules EHEB à la CdA est due, au moins partiellement, à l'accumulation réduite de CdATP dans ces cellules, ce qui mène (1) à une moindre incorporation de ce dernier dans l'ADN, (2) à une moindre inhibition de la ribonucléotide réductase, (3) à une moindre inhibition de la synthèse d'ADN et finalement à une moindre cytotoxicité. L'accumulation réduite de CdATP dans les cellules EHEB pourrait être expliquée par une activité réduite de la dCK.

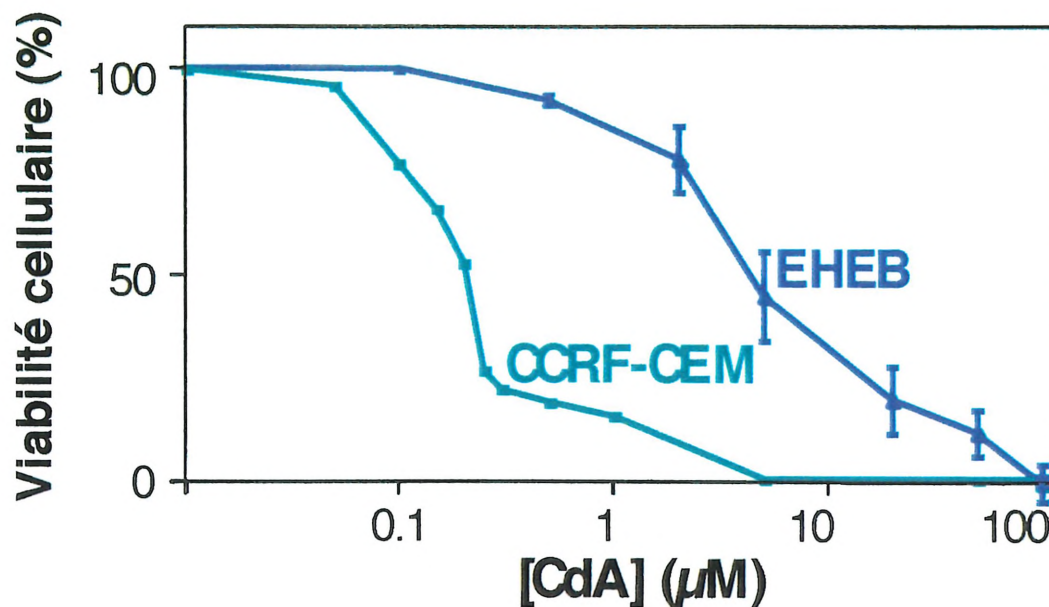


Figure 9: Influence de la concentration en CdA sur la viabilité des cellules EHEB et des cellules CCRF-CEM.

Les cellules EHEB et les cellules CCRF-CEM ont été incubées pendant 96 et 24 heures, respectivement, en présence de concentrations croissantes de CdA avant la réalisation du test MTT.

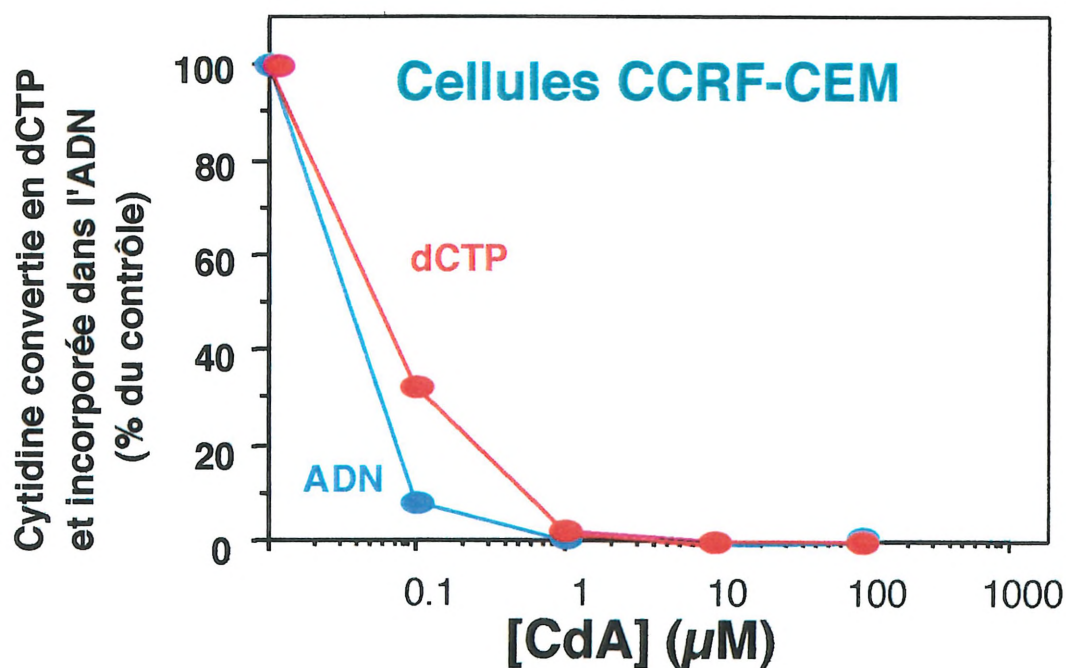


Figure 10: Influence de la concentration en CdA sur l'activité de la ribonucléotide réductase des cellules CCRF-CEM mesurée *in situ*.

Après une incubation de 24 heures en présence de concentrations croissantes en CdA, les cellules CCRF-CEM ont été incubées pendant 1 heure en présence de [³H] cytidine. La radioactivité incorporée dans le dCTP et l'ADN a ensuite été mesurée.

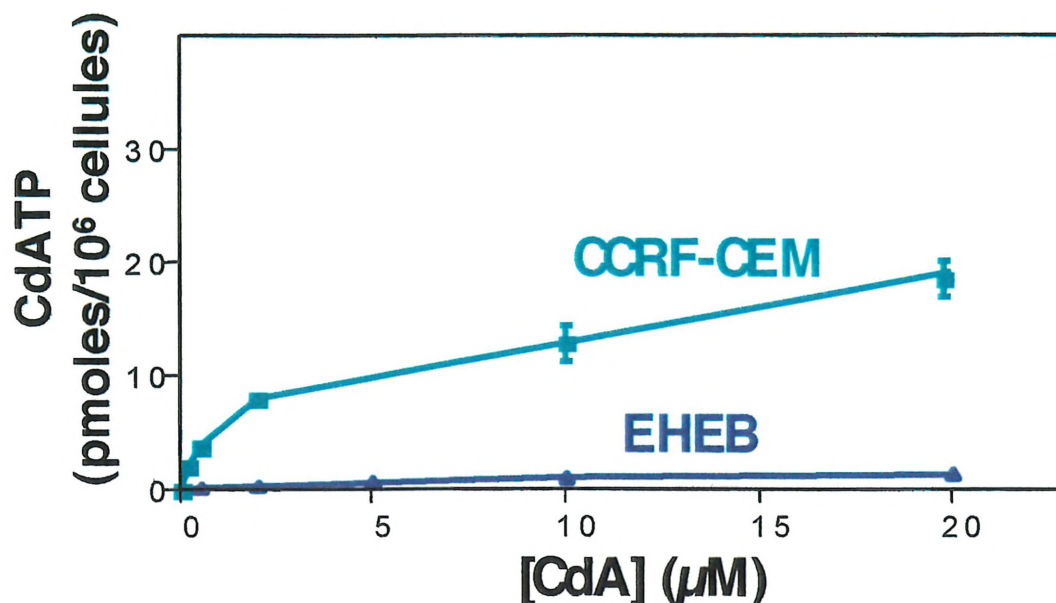


Figure 11: Influence de la concentration en CdA sur le taux de CdATP dans les cellules EHEB et CCRF-CEM.

Les cellules ont été incubées pendant 4 heures en présence de concentrations croissantes en $[8-^3\text{H}]$ CdA. Les nucléotides formés ont été séparés par HPLC et les concentrations ont été calculées à partir de la radioactivité spécifique de la CdA.

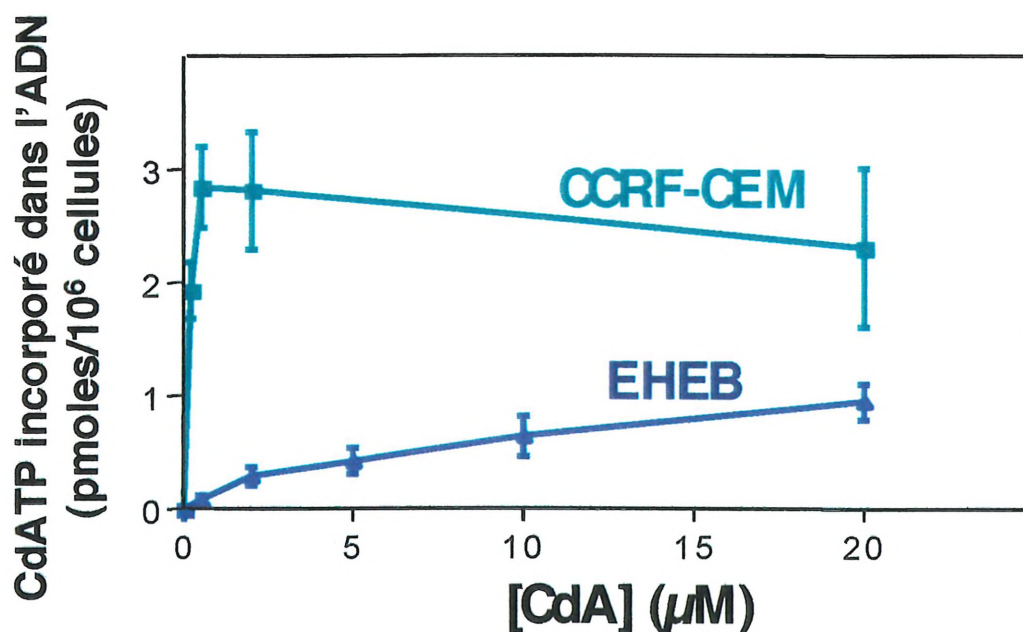


Figure 12: Incorporation du CdATP dans l'ADN des cellules EHEB et CCRF-CEM.

Les cellules ont été incubées pendant 4 heures en présence de concentrations croissantes en $[8-^3\text{H}]$ CdA.

[CdA] (μM)	[CdATP] (μM) CCRF-CEM (A)	[CdATP] (μM) EHEB (B)	A/B
0,5	$4 \pm 0,3$	$0,14 \pm 0,02$	29
2	$8 \pm 0,3$	$0,24 \pm 0,1$	33
10	13 ± 2	$0,6 \pm 0,07$	22
20	19 ± 2	$0,78 \pm 0,08$	24

Tableau 1: Comparaison des concentrations en CdATP, exprimées en μ M, à différentes concentrations en CdA dans les cellules CCRF-CEM et EHEB.

Les cellules ont été incubées pendant 4 heures en présence de concentrations croissantes de CdA. Les nucléotides formés ont été séparés par HPLC. Les concentrations en CdATP ont été calculées à partir de la radioactivité spécifique de la CdA. Les résultats sont des moyennes $\pm$ SEM de 3 expériences indépendantes.

Chapitre IV

Activation par la CdA

du cycle cellulaire des cellules EHEB:

implication dans l'apoptose

Les numéros des figures mentionnés ci-dessous correspondent à ceux des figures du manuscript intitulé "Apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxyadenosine is associated with cell cycle activation in the B-cell leukemia cell line EHEB", soumis à Oncogene, qui est joint à ce chapitre à la page 73.

Si les résultats présentés dans le chapitre précédent permettaient de comprendre pourquoi la lignée leucémique EHEB était peu sensible à la CdA, ils n'expliquaient pas pourquoi la CdA provoquait dans cette lignée après 24 h d'incubation une augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire.

Notre première démarche fut de déterminer si l'augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire était due à une accélération de l'entrée en phase S des cellules ou à un ralentissement de leur progression dans cette phase. Pour répondre à cette question, nous avons analysé l'évolution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire à différents temps qui suivent l'addition de CdA. Les résultats ont montré (figure 1) que la première modification induite par la CdA après 6 - 8 h d'incubation était une augmentation du nombre de cellules en début de phase S, suivie plus tard d'une augmentation du nombre de cellules en fin de phase S, cette progression de cellules dans la phase S étant accompagnée d'une diminution quasi équivalente de cellules dans la phase G1. Ces observations suggéraient que la CdA stimule le passage des cellules de la phase G1 vers la phase S. Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que des cellules qui avaient été synchronisées en phase G1 repassaient plus rapidement en phase S lorsqu'elles étaient incubées en présence de CdA qu'en son absence (figure 2). Nous avons finalement démontré par des expériences de « pulse-chase » que les cellules qui s'accumulaient en phase S après incubation en présence de CdA provenaient bien du pool de cellules en phase G1 (figure 3).

Une enzyme-clé dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire, et dont l'activation peut provoquer une accélération de l'entrée en phase S, est la protéine kinase cdk2. Comme le montre la figure 4 (A et B), nous avons observé que la CdA augmentait son activité. Cette augmentation d'activité ne serait pas due à une augmentation de l'expression de la cycline E (figure 4E), sa sous-unité régulatrice au cours de la transition G1/S, mais serait plutôt le résultat d'une augmentation de l'expression de la cdk2 elle-même (figures 4C et D).

Une des cibles de la cdk2 est la protéine Rb, dont la phosphorylation est cruciale pour le transit des cellules de la phase G1 vers la phase S. En accord avec l'augmentation d'activité

de la cdk2 et avec l'hypothèse d'une stimulation par la CdA de l'entrée en phase S, nous avons observé que la CdA augmentait le taux de phosphorylation de la protéine Rb (figure 5).

L'activation de cdk2 par la CdA pouvait paraître surprenante. En effet, la CdA, comme d'autres analogues de nucléosides, fait partie de la catégorie des agents qui endommagent l'ADN, ce qui peut se traduire au niveau moléculaire par une élévation du taux de p53, laquelle peut entraîner à son tour une augmentation de la transcription de p21, un des inhibiteurs protéiques de la cdk2. Bien que nous ayons observé une augmentation de la phosphorylation de p53, ainsi qu'une augmentation de son expression (figures 6A et B), nous n'avons jamais noté d'élévation de p21, mais au contraire une diminution de son expression (figure 6C). De même, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la protéine p27 (figure 6D), un autre inhibiteur protéique de la cdk2. La diminution de l'expression de p21 et p27 pourrait être un (des) élément(s) qui a favorisé l'activation de la cdk2.

Comme l'activation de la cdk2 a été associée à plusieurs reprises à l'induction de l'apoptose par des agents divers, tels que des rayons γ ou la dexaméthasone, nous avons examiné si elle pouvait être impliquée aussi dans l'apoptose induite par la CdA. Pour répondre à cette question, nous avons testé l'effet d'inhibiteurs de la cdk2, comme la roscovitine, sur l'activation de la caspase-3, une enzyme dont l'activation est caractéristique du processus apoptotique. A une concentration de 20 μ M, la roscovitine supprime complètement l'entrée en phase S du cycle cellulaire et sa stimulation par la CdA (figure 7), et réduit d'au moins 50 % l'activation de la caspase-3 induite par la CdA (figure 8). Ce résultat indique que l'activation de la cdk2 joue un rôle dans l'apoptose induite par la CdA.

De l'ensemble de ces résultats, nous concluons que l'augmentation de la synthèse d'ADN ainsi que du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire, provoquée par la CdA dans les cellules EHEB, est le résultat d'une accélération du passage des cellules de la phase G1 vers la phase S, et que cette accélération est probablement la conséquence d'une activation de la cdk2 par la CdA. Il apparaît de plus que l'activation du cycle cellulaire induite par la CdA dans les cellules EHEB ne s'oppose pas à la mort cellulaire par apoptose, mais y contribue.

Apoptosis induced by 2-chloro-2'-deoxyadenosine is associated with cell cycle activation in the B-cell leukemia cell line EHEB

Sabine Cardoen¹, Eric Van Den Neste^{1,2}, Caroline Smal¹, Jean-François Rosier³, Augustin Ferrant², Georges Van den Berghe¹, and Françoise Bontemps¹

¹Laboratory of Physiological Chemistry, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology, Brussels, Belgium, ²Department of Hematology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium, and ³Tumoral Metabolism Research Unit, C. H. Jolimont-Lobbes, La Louvière, Belgium

Grant support: This work was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (Télévie, FRSM, Crédit au Chercheur), by the Belgian Federal Service for Scientific, Technical and Cultural Affairs, and by private foundations: Bauchau, Maisin, and Salus Sanguinis. C. Smal is a Télévie Fellow since October 1, 2003.

Requests for reprints: F. Bontemps, Laboratory of Physiological Chemistry, Christian de Duve Institute of Cellular Pathology (ICP), Avenue Hippocrate, 75, UCL-ICP 7539, B-1200 Brussels, Belgium. Phone: + 32 2 7647539; Fax: + 32 2 7647598.

E-mail: bontemps@bchm.ucl.ac.be

Running title: Cell cycle and apoptosis activation by CdA

Key words: G1/S transition, CDK2, roscovitine, caspase-3, lymphocyte

ABSTRACT

Purpose: 2-Chloro-2'-deoxyadenosine (CdA) is a nucleoside analog that induces apoptosis in resting and proliferating lymphocytes, and is active in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Its cytotoxicity in dividing cells is considered to result from inhibition of DNA synthesis. Paradoxically, in the B-CLL cell line EHEB, induction of cell death by CdA is concomitant with an increase of DNA synthesis, due to an increase in the proportion of cells in S phase of the cell cycle. The purpose of this study was to investigate the mechanisms of this effect and whether it is involved in CdA-induced apoptosis.

Experimental design: The progression of the cell cycle upon incubation with CdA was analyzed by flow cytometry using double labeling with propidium iodide and bromodeoxyuridine, which allows simultaneous analysis of DNA content and DNA synthesis. The effect of CdA on several proteins implicated in the regulation of cell cycle, including the cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), was also examined.

Results: Flow cytometry experiments showed that CdA promotes the transition of EHEB cells from G1 to S phase. Accordingly, CdA also increased retinoblastoma protein phosphorylation and CDK2 activity. This activation was associated with an increased CDK2 expression and with a decline in the levels of p27 and p21, the latter occurring despite accumulation of p53. Roscovitine, a CDK2 inhibitor, suppressed the activation of cell cycle by CdA and significantly reduced the activation of caspase-3 induced by this nucleoside analog.

Conclusions: Increase of DNA synthesis induced by CdA in the EHEB cell line is the result of a stimulation of the entry of cells into S phase, involving an increase of CDK2 activity. This activation of the cell cycle contributes to CdA-induced apoptosis.

INTRODUCTION

⁴CdA, a deoxyadenosine analog resistant to deamination by adenosine deaminase, is an effective drug for lymphoproliferative malignancies, particularly hairy cell leukemia and B-CLL (1, 2). To exert its antileukemic effects, CdA requires intracellular conversion to its triphosphate derivative CdATP, considered the active metabolite of CdA (3). CdATP mainly accumulates in lymphoid cells because of their high content in dCK, the rate-limiting enzyme in the activation of nucleoside analogs. CdATP is a potent inhibitor of ribonucleotide reductase, which supplies cells with deoxyribonucleotides needed for DNA synthesis (4). In addition, CdATP can be incorporated into growing DNA strands, causing chain termination (reviewed in 5). Together, these actions produce inhibition of DNA synthesis, leading to DNA lesions and eventually to apoptosis by p53-dependent pathways (reviewed in 6, 7). CdATP can also disrupt the integrity of the mitochondria, causing cytochrome c release (8), and co-operate with cytochrome c and Apaf-1 to activate caspase-3, a mechanism that is independent of p53 activation (8, 9). All these properties of CdATP explain the cytotoxicity of CdA for both dividing and resting cells (10, 11).

In previous work (12), we have studied the effects of CdA in EHEB cells, a continuous cell line derived from B-CLL lymphocytes (13). EHEB cells were found less sensitive to CdA than B-CLL lymphocytes and various other leukemic cell lines, most likely owing to a several-fold lower activity of dCK in EHEB cells (14). Surprisingly, whereas CdA has been shown to inhibit DNA synthesis in numerous types of leukemic cells (4, 10, 15, 16), we observed an increase of thymidine incorporation into DNA in EHEB cells incubated for 24 h with CdA. This augmentation of DNA synthesis was maximal at concentrations of CdA around its IC₅₀, i. e. 5 – 10 μ M. At these concentrations of CdA, flow cytometry analysis showed an increase in the proportion of cells in S phase of the cell cycle, which were BrdU-positive (12).

In the present study, we investigated the mechanisms by which CdA enhances DNA synthesis in EHEB cells. Flow cytometry experiments indicated that CdA stimulates entry of the cells into S phase. Accordingly, CdA also augmented the activity of CDK2, a crucial kinase for the progression of cells from G1 to S phase (17), and the phosphorylation of Rb, the substrate of CDK2 at the G1/S transition. Because activation of CDK2 has been shown to correlate with the onset of apoptosis in many cellular models, including thymocytes (18, 19), neurons (20, 21), endothelial cells (22), and hepatoma cells (23), we have examined whether CdA-induced cell cycle activation plays a role in apoptosis induced by this nucleoside analog in EHEB cells. Part of this work has been presented at a symposium (24).

MATERIALS AND METHODS

Materials. CdA (>99.9% purity) was synthesized and supplied by Prof. J. Marchand (Laboratory of Organic Chemistry, Louvain-la-Neuve, Belgium). Stock solutions of CdA were prepared in ethanol/150 mM NaCl (1:1 by volume). BrdU, PI, FITC-conjugated anti-BrdU antibodies and aphidicolin were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (Bornem, Belgium). The mouse monoclonal BrdU-specific BR3 antibody (MD 5300) was from Caltag Laboratories, Inc. (San Francisco, CA, USA). FCS was purchased from Cambrex Bio Sciences (Verviers, Belgium), RPMI 1640 was from Life-Technologies, Inc. (Merelbeke, Belgium) and all tissue culture reagents were from Gibco (Eggenstein, Germany). Ac-DEVD-AMC and AMC were from Alexis, Biochemicals (Q-Bio-gene, Carlsbad, CA, USA). Histone H1 was from Roche Applied Science

(Penzberg, Germany). [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (10 mCi/ml) was from Amersham Biosciences (Rosendaal, The Netherlands). Roscovitine and olomoucine were from Calbiochem (Merck Biosciences, VWR Leuven, Belgium). Protein A/G Sepharose beads were from Oncogene Research Products (Merck, Darmstadt, Germany).

Cell culture and synchronization. The EHEB cell line was purchased from DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Culture (Braunschweig, Germany). Cells were cultured in RPMI 1640 medium with Glutamax, supplemented with 10% heat-inactivated FCS, at 37°C in humidified air containing 5 % CO₂. When used in combination with CdA, roscovitine or olomoucine, dissolved in DMSO, was added 60 min before.

In some experiments, EHEB cells were synchronized at the G1/S boundary by a 72 h-incubation with 3 μM aphidicolin, or in G1 phase by a 72 h-culture in RPMI 1640 medium without FCS. Release into the cell cycle was achieved by washing the cells twice with the drug-free culture medium, containing FCS.

Cell cycle analysis. Bivariate flow cytometric analysis was performed using FITC-conjugated anti-BrdU antibody to identify nascent DNA and PI for total DNA content (25). The day before the experiment, cells were resuspended at a concentration of 0.2×10^6 cells /ml and allowed to recover overnight. After incubation for the indicated times with 10 μM CdA, cells were pulse-labeled for 60 min with 1 μM BrdU, and collected immediately at the end of the BrdU-labeling. In some experiments, cells were first pulse-labeled with 1 μM BrdU for 1 h, washed twice with warm cell culture medium to remove any unincorporated BrdU, and then incubated for 24 h with or without 10 μM CdA. Collected samples contained 8×10^6 cells. BrdU detection was performed by standard procedures, as described previously (12). Data acquisition was performed on a FACScan fluorescence-activated cell analyzer (Becton Dickinson) and analyzed using the CellQuest I software (Becton Dickinson). Dot plots generated by FACScan analysis show DNA content on the *X* axis (linear) and DNA synthesis on the *Y* axis (log). Both cell cycle distribution and DNA synthesis capacity can be estimated by gating BrdU-labeled (S-phase) from unlabeled, and single (2N) from double (4N) DNA content nuclei.

Western blot analysis. For Rb analysis, 10×10^6 cells were lysed in 250 μl of lysis buffer containing 20 mM Tris, pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.01% PTSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and 1 mM Na₃VO₄, and disrupted by three freeze-thawing. For analysis of the other proteins, 10×10^6 of cells were lysed in 250 μl of lysis buffer containing 20 mM Hepes, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 0.01% PTSF, 1 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin and 1 mM Na₃VO₄. Lysates were cleared by centrifugation at 14,000 x g for 10 min at 4°C and stored at -20°C. The protein content on each sample was determined using the Bio-Rad protein assay (Biorad Laboratories, Hemel Hempstead, U.K.). Cellular proteins (50 – 100 $\mu\text{g/lane}$) were resolved on 7.5 - 12% SDS-polyacrylamide (depending on protein size), and transferred to Hybond C-extra membranes (Amersham Biosciences, Rosendaal, The Netherlands). Membranes were blocked with 5% fat-free milk for 1 h, probed overnight at 4°C with specific primary antibodies as recommended by the manufacturer, and then incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated antimouse or antirabbit IgG secondary antibodies (Sigma). Immunocomplexes were visualized with the enhanced chemiluminescence kit (Amersham Biosciences). The primary antibodies used

were mouse anti-p53 (sc-126), rabbit anti-phospho-p53 [(ser 15)(sc-11764-R)], mouse anti-p21 (sc-6246), mouse anti-p27 (sc-1641), rabbit anti-cyclin E (sc-481), mouse anti-CDK2 (sc-6248) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), mouse anti-Rb (554136) (PharMingen, San Diego, CA, USA), rabbit anti-phospho-Rb [(ser 795) (9301)] (Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany). Equal loading of protein was assessed using a α -actin primary antibody (A-5441) (Sigma).

Immunoprecipitation and CDK2 assay. After a 24 h-incubation with increasing concentrations of CdA, EHEB cells (10×10^6 cells/condition) were pelleted by centrifugation at $1,200 \times g$ for 5 min and washed twice with ice-cold PBS. They were then lysed on ice for 20 min in 250 μ l of lysis buffer containing 25 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5% sodium deoxycholate, 20 mM β -glycerophosphate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.2 mM EDTA, pH 8, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM Na_3VO_4 , pH 10, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 μ g/ml aprotinin, and 20 μ g/ml leupeptin. After centrifugation at $14,000 \times g$ for 15 min, the supernatants were collected and used immediately. For each CDK2 kinase assay, 330 μ g of protein extract were mixed with 2 μ g of anti-CDK2 antibody (sc-163) (Santa Cruz Biotechnology) on a rocker for 3 h at $4^\circ C$. To collect the immune complexes, 30 μ l of 50% protein A/G Sepharose beads were added to the mixture, which was then further incubated with rotation for 1 h at $4^\circ C$. The beads were washed twice with lysis buffer and once with kinase buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM EGTA, pH 7.0, 10 mM $MgCl_2$, and 1 mM dithiothreitol). The immunoprecipitates were incubated with 30 μ l of kinase buffer containing 1 μ g/sample of histone H1, 20 μ M cold ATP and 6 μ Ci of $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$. After 30 min at $37^\circ C$, 30 μ l of 2X SDS sample loading buffer was added to terminate the reaction. The mixture was then boiled for 5 min and centrifuged. Histone H1 was resolved on a 10% SDS-polyacrylamide gel and incorporation of ^{32}P was analyzed by autoradiography. Alternatively, the ^{32}P incorporated into histone H1 was measured as previously described (26). Briefly, after 15 and 30 min of incubation at $37^\circ C$, aliquots (10 μ l) of the reaction mixture were spotted on 1.5 cm^2 pieces of Whatman P81 cellulose papers, which were then washed five times (for 5 min each time) in a solution of 1% phosphoric acid. The radioactivity of the papers was determined by scintillation counting. The CDK2 activity was expressed in cpm incorporated into histone H1 per min.

Fluorogenic assay of caspase-3 activity. For each assay, 4×10^6 EHEB cells were pelleted by centrifugation at $1,200 \times g$ for 5 min and washed twice with ice-cold PBS. The cell pellets were kept at $-80^\circ C$ until use. They were then lysed on ice for 30 min in 125 μ l of lysing buffer containing 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 1% Nonidet P-40, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml antipain and 5 mM benzamidine. The supernatants of total cell lysates were taken after centrifugation at $16,000 \times g$ for 10 min. Caspase-3 activity was determined by incubating, at $37^\circ C$, 100 μ l of cellular extract in 1 ml of a reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM dithiothreitol, and 37.5 μ M Ac-DEVD-AMC. The fluorescence of the free 7-amino-4-methylcoumarine released upon proteolytic cleavage of the substrate was monitored using a spectrofluorometer with a pair of excitation/emission wavelength of 360/460 nm. Arbitrary fluorescence units were quantified with reference to calibration curves ranging from 1 to 10 nmol AMC.

Semiquantitative reverse transcription-PCR. Total RNA of 5×10^6 of EHEB cells was extracted with the AquaPure RNA isolation kit (Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by RT from 5 μ g of RNA using oligo(dT) primer (Fermentas, St-Leon-Rot, Germany)

and RevertAid H Minus M-MuLV Reverse transcriptase (Fermentas). One-fortieth of cDNA was used for amplification by PCR in a total volume of 50 μ l, using 1 unit of DNA polymerase (Biotools, Madrid, Spain), 0.2 mM dNTP mixture, and 0.6 μ M of the following specific CDK2 primers: 5'-GCTTTCTGCCATTCTCATCG-3' (sense strand) 5'-GTCCCCAGAGTCCGAAAGAT-3' (antisense strand). The thermal cycle conditions used were as follows: 1 cycle at 94°C for 5 min, 25 cycles at 94°C for 30 sec, 56°C for 45 sec, 72°C for 1 min and one cycle at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed on ethidium bromide-stained agarose gel and photographed.

Data analysis. All experiments have been repeated two times or more. The results of experiments repeated at least three times are given as the means $\pm$ SE. Significance was estimated by the paired two-tailed Student's *t* test.

RESULTS

Effect of CdA on cell cycle progression. The paradoxical increase in the proportion of BrdU-positive S phase cells observed in EHEB cells after a 24 h-incubation with 10 μ M CdA (12) could be due to an acceleration of the entry of cells into S-phase or to a delay in the progression therein. To discriminate between these two possibilities, we analyzed cell cycle distribution at shorter time points following the addition of CdA. As in our previous work, DNA content and DNA synthesis activity were measured simultaneously by double labeling with PI and BrdU (Fig. 1A). The first modification, which became obvious 8 h after the addition of CdA (*arrow*), was an increase of early S phase cells, i.e. cells with a DNA content close to 2 N, but BrdU-positive. This increase in early S phase was followed at 16 and 24 h by an increase in the number of mid-late S phase cells, which was maximal at 24 h. After 48 h, cytotoxic effects of CdA became visible with diminution of BrdU incorporation and appearance of apoptotic cells (sub-G1 region, *bracket*). We never observed accumulation of cells in the G2/M phase, but rather a slight decrease. The evolution of the distribution of cells in each phase of the cell cycle upon incubation with CdA is depicted in Fig. 1B. It appears that maximal changes took place between 8 and 24 h after the addition of CdA and that the 2-fold increase in the proportion of cells in S phase, observed after 16-24 h, was mirrored by a nearly equivalent decrease in the proportion of cells in G1 phase.

Our observation that the first detectable effect of CdA on cell cycle was an increase of cells in early S phase suggested that CdA stimulates the entry into S phase. To verify this hypothesis, we examined the effect of CdA on the release into the cell cycle of cells synchronized in G1 phase, either at the G1/S border by aphidicolin (Fig. 2A), or at the restriction point by serum deprivation (Fig. 2B). A 60-min pulse of BrdU was performed immediately after the release (0 h), or after 24 h. At zero time, the proportion of BrdU-labeled cells was 2- to 3-fold lower than in an asynchronous cell population. After a 24 h-incubation without CdA, this proportion was barely modified, which accords with the relatively long doubling time of this cell line (50-70 h). On the other hand, after a 24 h-incubation in the presence of 10 μ M CdA, the proportion of cells in S phase was increased by more than 2-fold (*arrows*), whether the cells had been synchronized by aphidicolin or by serum deprivation. These results show that more cells had re-entered into S phase upon incubation with CdA than in control conditions, which accords with the hypothesis that CdA promotes the transition of cells from G1 to S phase, rather than delay their progression through the S phase.

Figure 1 A

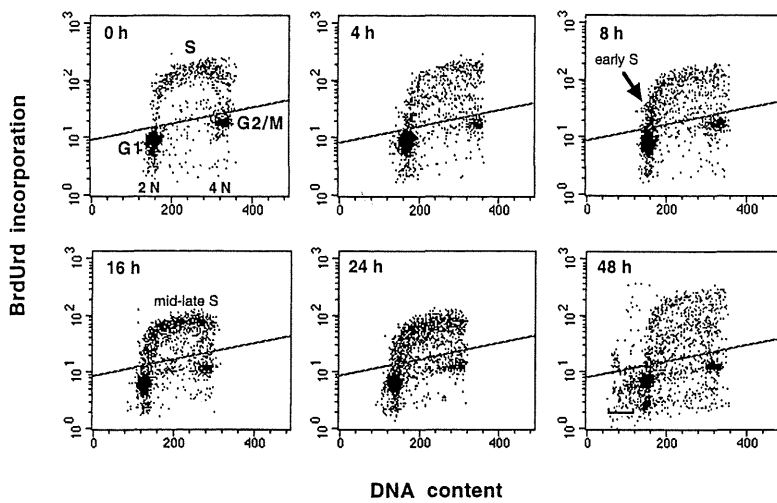


Figure 1 B

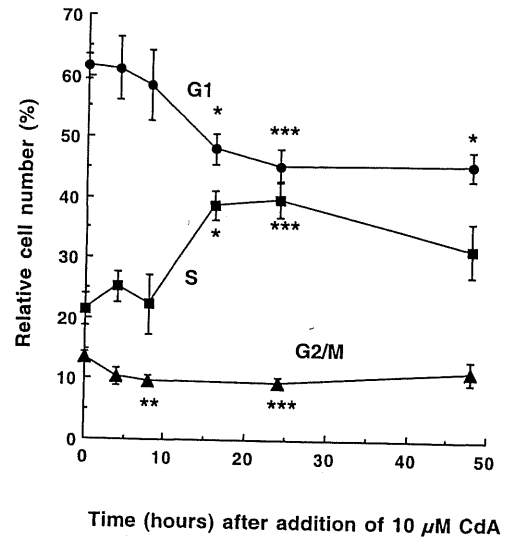


Figure 1. Effect of CdA on cell cycle progression. EHEB cells were incubated for various times with 10 μ M CdA, then pulsed with BrdU for 60 min, and stained for DNA synthesis with FITC-conjugated BrdU antibody and for DNA content with PI. (A) Scattergrams obtained by FACScan analysis. The dashed lines separate the BrdU-incorporating cells (S phase) from those that did not incorporate BrdU (G1 and G2/M phases). (B) Evolution of the distribution of cells within the cell cycle upon incubation with CdA. Separation of the regions around the G1, S, and G2/M sub-populations in scattergrams, such as shown in Fig. 1A, allowed determination of the percentages of populations within the cell cycle. Results are means $\pm$ SE of at least 3 independent experiments. Significance relative to time zero: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 2

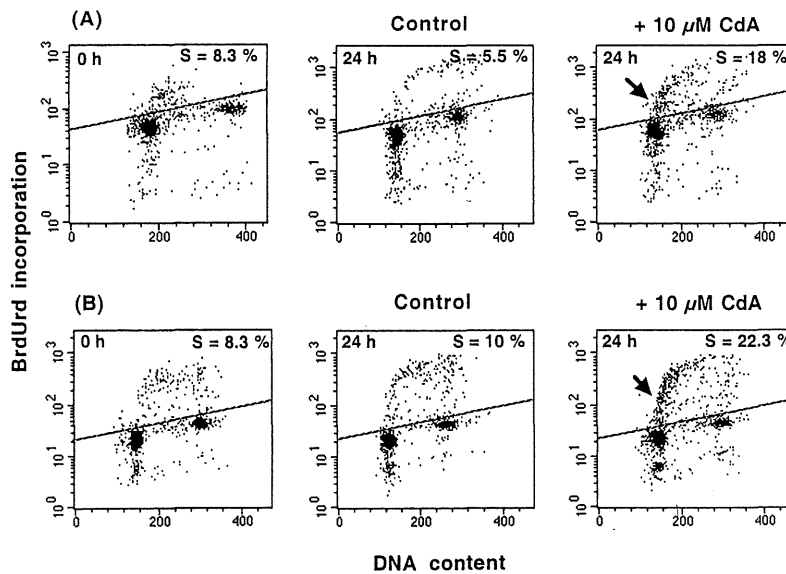


Figure 2. Effect of CdA on the release of synchronized cells. EHEB cells were synchronized either by a 72 h-incubation in the presence of 3 μ M aphidicholin (A) or by a 72 h-serum starvation (B). They were pulsed with BrdU for 60 min immediately after the release (0 h) or after a 24 h-incubation in the absence or in the presence of 10 μ M CdA, and examined for DNA synthesis and DNA content by FACScan analysis.

Figure 3

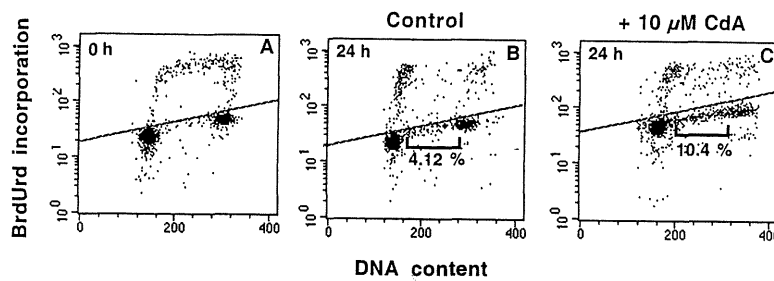


Figure 3. Effect of CdA on the pulse-chase of BrdU. EHEB cells were pulsed with BrdU for 60 min, washed (A), and subsequently incubated for 24 h in the absence (B) or in the presence (C) of 10 μ M CdA. Simultaneous analysis for DNA synthesis and DNA content was performed by FACScan analysis, immediately (0 h) or 24 h after the BrdU-pulse.

Figure 4

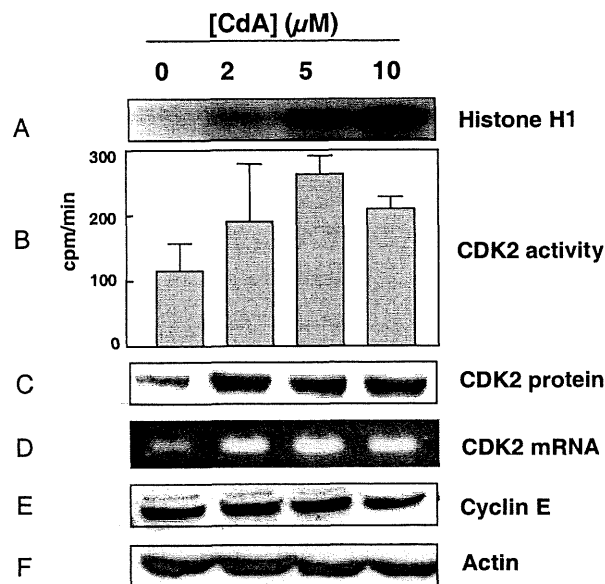


Figure 4. Effect of CdA on CDK2 and cyclin E. EHEB cells were incubated for 24 h in the presence of increasing concentrations of CdA. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies specific for CDK2, and the precipitates were analyzed for kinase activity using histone H1 as a substrate. Radioactivity of histone H1 was detected by autoradiography after SDS-PAGE (A) or measured after binding to phosphocellulose papers (B). In the last case, results shown are the means $\pm$ SE of 4 separate experiments. The amounts of CDK2 (C) and cyclin E (E) were analyzed by Western blot, and CDK2 mRNA (D) was assessed by RT-PCR. Actin protein levels (F) were used as a loading control for Western blotting analysis.

In order to confirm that the cells entering S phase under CdA indeed arise from the pool of G1 cells, EHEB cells were pulse-labeled with BrdU for 1 h, washed free of BrdU, and then incubated without or with 10 μ M CdA. This approach allows to analyze the progression of both BrdU-labeled and -unlabeled cells through the cell cycle. Comparison of dot plots obtained by FACScan analysis at 0 h (immediately after BrdU washing, Fig. 3A) and following a 24-h chase period in the absence of BrdU, showed that BrdU-unlabeled cells that were originally in G1 phase had moved into S-phase (Fig. 3 B and C, *brackets*). These cells, characterized by an S phase DNA content, but lacking BrdU, were more than twice numerous in the presence of CdA (Fig. 3C) than in its absence (Fig. 3B). These results provide further evidence that CdA accelerates the progression of cells from G1 to S phase.

Effect of CdA on CDK2, cyclin E and Rb. The effect of CdA on early events during the cell cycle led us to investigate its effect on CDK2, which, associated with cyclin E, is the major kinase that allows progression from G1 to S phase (27). We measured CDK2 activity by its ability to incorporate 32 P from [32 P]ATP into histone H1. Histone H1 radioactivity was first detected by autoradiography after SDS-PAGE electrophoresis. Fig. 4A shows that CDK2 activity dose-dependently increased 24 h after the addition of CdA. In further experiments, we counted the radioactivity of histone H1 bound to phosphocellulose papers. Variations in the basal level of CDK2 and in the extent of this activation were observed. Nevertheless, activation of CDK2 always happened in the presence of CdA (Fig. 4B). Moreover, the protein expression and mRNA of CDK2, as shown by Western blotting (Fig. 4C) and RT-PCR (Fig. 4D), respectively, both increased under incubation with CdA. On the other hand, the expression of cyclin E, the regulatory cyclin subunit of CDK2 in G1/S transition, was not modified under incubation with CdA (Fig. 4E).

The ultimate event in the pathway that leads to G1 progression and entry into S phase of the cell cycle is the phosphorylation of Rb, which is a target of CDK2. Phosphorylation of Rb causes the release of the general transcription factor E2F, which then stimulates the transcription of genes involved in DNA replication (28-30). In lysates from growing EHEB cells, a fast-migrating, hypophosphorylated form of Rb as well as a slower migrating hyperphosphorylated Rb form could be detected (Fig. 5A). Upon incubation with 10 μ M CdA, the amount of hyperphosphorylated form of Rb time-dependently increased. Similar results were obtained in cells synchronized by a 72-h serum deprivation, in which Rb was nearly exclusively under hypophosphorylated form (0 h). After release, the emergence of an hyperphosphorylated form of Rb was more marked in the presence of CdA than in its absence (Fig. 5B), especially at 24 h. In accordance with these results, an increase of the phosphorylation of Rb on serine 795 was also observed (Fig. 5C).

Effect of CdA on p53, p21 and p27 levels. CdA has been shown to induce accumulation of p53 and of its downstream target p21 (WAF1/CIP1) in B-CLL lymphocytes (31) and in colorectal tumor cells (32). These changes should lead, contrary to what we observed in EHEB cells, to arrest of the cell cycle at the G1/S checkpoint. Indeed, p21 inhibits CDK2 activity by associating with the cyclin E-CDK2 complex (17, 33). We therefore examined the effect of CdA on the levels of p53 and p21 in EHEB cells. CdA dose-dependently raised the phosphorylation of p53 at serine 15 (Fig. 6A), which is critical for its stabilization, and the amount of p53 protein (Fig. 6B). However, the accumulation of p53 was not followed by an increase of its transcriptional target p21, which was rather decreased 24 h after the addition of CdA (Fig. 6C). The

Figure 5

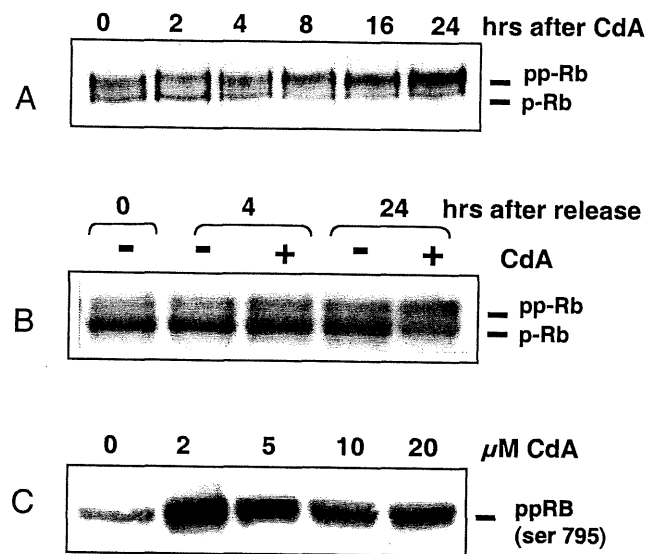


Figure 5. Effect of CdA on the phosphorylation of Rb. Asynchronous EHEB cells (A, C) or EHEB cells synchronized by a 72 h-serum starvation (B) were incubated in the absence or in the presence of 10 μ M CdA for the indicated times (A, B), or with increasing concentrations of CdA for 24 h (C). Cell lysates were analyzed by Western blot for total Rb (A, B) or for Rb phosphorylated on serine 795 (C).

Figure 6

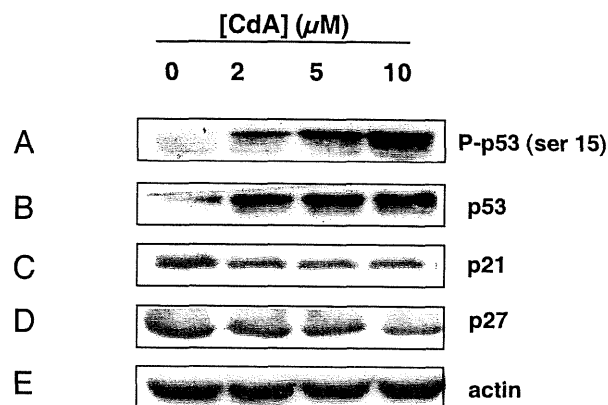


Figure 6. Effect of CdA on p53, p21 and p27. The phosphorylation of p53 on serine 15 (A) and the amount of p53 (B) were analyzed by Western blot in cells incubated for 24 h with increasing concentrations of CdA. The expression levels of p21 (C) and p27 (D) were also determined. Actin levels (E) were used as a loading control.

Figure 7

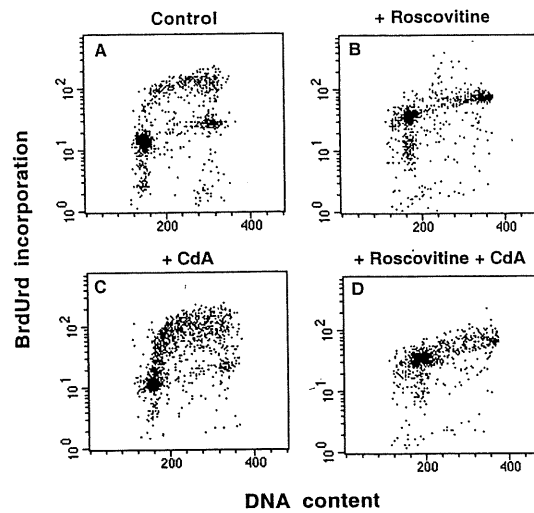


Figure 7. Effect of roscovitine on cell cycle progression. After 1 h of preincubation with or without 20 μ M roscovitine, EHEB cells were incubated for 24 h in the absence or in the presence of 10 μ M CdA. Cells were pulsed with BrdU for the last 60 min of incubation, and examined for DNA synthesis and DNA content by FACScan analysis.

Figure 8

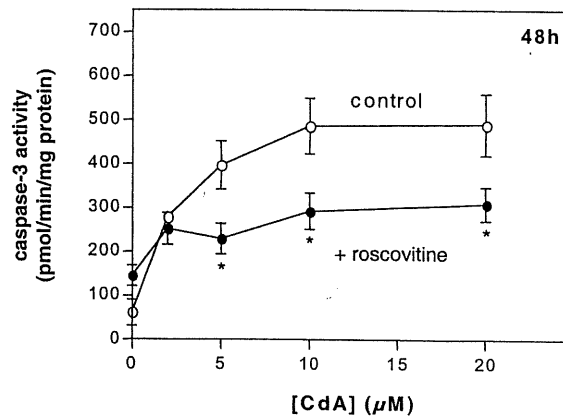


Figure 8. Effect of roscovitine on the activation of caspase-3 by CdA. After 1 h-preincubation with or without 20 μ M roscovitine, EHEB cells were incubated with increasing concentrations of CdA for 48 h. Results are means $\pm$ SE of 3 independent experiments. Significance relative to the absence of roscovitine: * P < 0.05.

expression of p27, another inhibitor of CDK2 and a key regulator of cell cycle progression in lymphocytes (27, 34), was also reduced by CdA (Fig. 6D).

Effect of inhibitors of CDK2 on CdA-induced apoptosis. In the last years, activation of the cell cycle, and particularly of CDK2, has been associated with induction of apoptosis (18, 21, 22, 35-37). In order to unravel whether activation of CDK2 contributes to apoptosis induced by CdA in EHEB cells, we used roscovitine, a purine analog that inhibits the activity of CDK2 by specific binding to the ATP-binding pocket of the enzyme (38). Using flow cytometry, we observed that roscovitine, at a concentration of 20 μ M, suppressed DNA synthesis activity in control cells (Fig. 7A and 7B), and also completely abrogated the stimulation of entry into S-phase by CdA (Fig. 7C and 7D). The effect of this concentration of roscovitine was investigated on CdA-induced activation of caspase-3, a key executioner of apoptosis. As expected, CdA time- and dose-dependently increased caspase-3 activity in EHEB cells (open circles, Fig. 8). Roscovitine alone also caused an increase of caspase-3 activity, but nevertheless significantly reduced, by 40 % at least, the activation of caspase-3 induced by CdA (closed circles, Fig. 8). Similar results were obtained in the presence of 50 μ M olomoucine, another inhibitor of CDK2 (not shown).

DISCUSSION

Most nucleoside analogs, including CdA, exert their cytotoxicity by blocking DNA synthesis (6). However, in the B-cell leukemic cell line EHEB, the cytotoxicity of CdA is observed concomitantly with an increase in DNA synthesis (12). The studies reported here show that this effect of CdA on DNA synthesis is explained by an activation of the cell cycle and that this activation contributes to apoptosis.

As demonstrated previously, the increase of DNA synthesis observed in EHEB cells incubated in the presence of CdA is due to an increase in the proportion of cells in S phase of the cell cycle (12). In the present report, we extend these findings by showing that CdA promotes the transition of cells from G1 to S phase. We indeed firstly demonstrated that the first modification elicited by CdA within S phase is an enhanced incorporation of BrdU by early S phase-cells, the same event being observed only later in mid-late S phase-cells (Fig. 1). Secondly, we observed that the release of cells synchronized in G1 is accelerated in the presence of CdA (Fig. 2) and thirdly, that cells moving into S phase upon incubation with CdA originate from G1 phase, as displayed by BrdU-pulse experiments (Fig. 3). In addition, the phosphorylation of Rb, of which the phosphorylation state is generally used as an indicator of the commitment of the cells to enter S phase (39, 40), is enhanced in the presence of CdA (Fig. 5).

The activity of CDK2 is crucial for sufficient phosphorylation of Rb and G1/S transition (30). We observed that CDK2 activity was enhanced during incubation with CdA (Figs 4 A,B), which may account for the accelerated entry of cells into S phase. Activation of CDK2 does not seem to be due to an increased synthesis of cyclin E, the corresponding regulatory cyclin subunit of CDK2 in G1/S transition, since its level was not modified by CdA (Fig. 4E). It could be due, at least partly, to an increase of CDK2 synthesis, since both the mRNA (Fig. 4D) and the amount of CDK2 (Fig. 4C) are augmented upon incubation with CdA. Besides an increase of CDK2 expression, the reduction in the levels of p27 and p21 (Fig. 6), two CDK2 inhibitors at the G1/S transition (41, 42), could also play a role in this aberrant activation of CDK2 in apoptotic cells.

Decreased expression of p21 and p27 could be hypothetically attributed to mechanisms such as cleavage by caspase-3 (22, 43-45), or destruction by the proteasome system (46, 47).

That p53 accumulates after the addition of CdA (Fig. 6) accords with previous reports (31, 32). However, in the latter studies, p21, a direct target of p53, also accumulates contrary to what is observed in EHEB cells. Such a divorce between p53 and p21 protein accumulation has already been reported in other models, showing that the target genes that are activated in response to p53 accumulation may depend on the apoptotic stimulus or on the cell type (19, 48, 49). Whichever the reason for the lack of p21 upregulation after CdA in our model, it may explain that the cell cycle is not arrested and can even be activated in response to CDK2 activation.

The accumulation of p53 observed in EHEB cells in response to CdA can be related to incorporation of CdA into their DNA (12). This could constitute a form of DNA damage and trigger the activity of one or more DNA damage sensor protein kinases leading to phosphorylation and stabilization of p53 (6). One can hypothesize that DNA synthesis continues despite the incorporation of CdA into DNA because CdAMP incorporated in DNA is a weak chain terminator (50).

A major finding of our study was that activation of the cell cycle occurs at concentrations of CdA which are cytotoxic and induce apoptosis. It has been speculated that apoptosis may result from a form of aberrant cell cycling called "mitotic catastrophe" (51, 52). Moreover, recent evidence suggest that cell cycle and apoptosis are intertwined, and that an enzyme in one system might also have an important role in the other system. In particular, CDK2 has been shown to play a role in stimulating apoptosis induced by various chemical or physical treatments (19, 21, 23, 36, 37, 53). Like in these studies, we have assessed the role of CDK2 in CdA-induced apoptosis by using chemical inhibitors of this protein kinase. We found that roscovitine significantly decreases the extent of activation of caspase-3 by CdA at 48 h (Fig. 8). This effect is even more convincing considering that roscovitine by itself induces some apoptosis, as already observed in other models including B-CLL lymphocytes (45, 54, 55). While roscovitine is relatively specific for CDK2 inhibition, effects on other kinases, particularly CDK1 that controls the G2/M transition, have also been shown (56). However, CDK1 has most probably not been activated by CdA since there is a decrease of cells in G2/M phase in the presence of the nucleoside analog (Fig. 1). Thus, although we cannot ascertain that the effects of roscovitine are restricted to CDK2 inhibition, we show that its ability to suppress the activation of the cell cycle by CdA (Fig. 7) is associated with a decrease of CdA-induced apoptosis.

The question remains how CdA-induced activation of CDK2 could contribute to apoptosis. In thymocytes, CDK2, activated in response to apoptotic stimuli, was found to phosphorylate p53, leading to a transactivation of Bax and alterations of mitochondrial permeability (19), indicating that CDK2 could phosphorylate and hence activate apoptotic regulators. In our model, we can also hypothesize that activation of CDK2 and of the cell cycle has favored the incorporation of CdA into DNA and thereby the activation of pro-apoptotic pathways. Accordingly, preliminary experiments have shown that the incorporation of CdA into DNA increases exponentially during the first 24 h of incubation (not shown).

In conclusion, our study shows a new mode of cellular response to CdA, involving activation of CDK2 and of the cell cycle, which does not oppose to cell death, but rather contributes to it. It remains to

investigate if these effects are restricted to the EHEB cell line and whether they may participate in apoptosis induced by other nucleosides analogs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr S. Bach for expert advice concerning CDK2 assay.

REFERENCES

1. Delannoy A. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine: clinical applications in hematology. *Blood Rev* 1996;10:148-66.
2. Goodman GR, Beutler E, Saven A. Cladribine in the treatment of hairy-cell leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;16:101-16.
3. Carson DA, Wasson DB, Kaye J, et al. Deoxycytidine kinase-mediated toxicity of deoxyadenosine analogs toward malignant human lymphoblasts in vitro and toward murine L1210 leukemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6865-9.
4. Griffing J, Koob R, Blakley RL. Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. *Cancer Res* 1989;49:6923-8.
5. Plunkett W, Gandhi V. Nucleoside analogs: cellular pharmacology, mechanisms of action, and strategies for combination therapy. In: Cheson BD, Keating MJ, Plunkett W, editors. *Nucleoside analogs in cancer therapy*. New York: Marcel Dekker; 1997.p.1-35.
6. Sampath D, Rao V, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 2003;22:9063-74.
7. Pettitt AR. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;121:692-702.
8. Genini D, Adachi S, Chao Q, et al. Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* 2000;96:3537-43.
9. Leoni LM, Chao Q, Cottam HB, et al. Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9567-71.
10. Carson DA, Wasson DB, Taetle R, Yu A. Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood* 1983;62:737-43.
11. Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest* 1985;75:377-83.
12. Cardoen S, Van Den Neste E, Smal C, et al. Resistance to 2-chloro-2'-deoxyadenosine of the human B-cell leukemia cell line EHEB. *Clin Cancer Res* 2001;7:3559-66.
13. Saltman D, Bansal NS, Ross FM, Ross JA, Turner G, Guy K. Establishment of a karyotypically normal B-chronic lymphocytic leukemia cell line; evidence of leukemic origin by immunoglobulin gene rearrangement. *Leuk Res* 1990;14:381-7.
14. Smal C, Cardoen S, Bertrand L, et al. Activation of deoxycytidine kinase by protein kinase inhibitors and okadaic acid in leukemic cells. *Biochem Pharmacol* 2004;68:95-103.
15. Huang MC, Ashmum RA, Avery TL, Kuehl M, Blakley RL. Effects of cytotoxicity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-bromo-2'-deoxyadenosine on cell growth, clonogenicity, DNA synthesis, and cell cycle kinetics. *Cancer Res* 1986;46:2362-8.
16. Hirota Y, Yoshioka A, Tanaka S, et al. Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res* 1989;49:915-9.
17. Bartek J, Lukas J. Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 2001;13:738-47.
18. Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJ. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* 1998;17:7209-18.
19. Hakem A, Sasaki T, Kozieradzki I, Penninger JM. The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J Exp Med* 1999;189:957-68.
20. Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol* 1998;143:457-467.

21. Katchanov J, Harms C, Gertz K, et al. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. *J Neurosci* 2001;21:5045-53.
22. Levkau B, Koyama H, Raines EW, et al. Cleavage of p21Cip/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* 1998;1:553-63.
23. Choi KS, Eom YW, Kang Y, et al. Cdc2 and Cdk2 kinase activated by transforming growth factor- β 1 trigger apoptosis through the phosphorylation of retinoblastoma protein in FaO hepatoma cells. *J Biol Chem* 1999;274:31775-83.
24. Cardoen S, Van Den Neste E, Smal C, et al. Effects of 2-chloro-2'-deoxyadenosine on the cell cycle in human leukemia CCRF-CEM and EHEB cell lines. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic acids* 2004;14:25-9.
25. Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:5573-7.
26. Mettrey Y, Gompel M, Thomas V, et al. Aloisines, a new family of CDK/GSK-3 inhibitors. SAR study, crystal structure in complex with CDK2, enzyme selectivity, and cellular effects. *J Med Chem* 2003;46:222-36.
27. Sherr CJ. The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000;60:3689-95.
28. Shan B, Durfee T, Lee WH. Disruption of RB/E2F-1 interaction by single point mutations in E2F-1 enhances S-phase entry and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:679-84.
29. Helin K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:28-35.
30. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 1999;98:859-69.
31. Gartenhaus RB, Wang P, Hoffman M, Janson D, Rai KR. The induction of p53 and WAF/CIP1 in chronic lymphocytic leukemia cells treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *J Mol Med* 1996;74:143-7.
32. Galmarini CM, Voorzanger N, Falette N, et al. Influence of p53 and p21^{WAF1} expression on sensitivity of cancer cells to cladribine. *Biochem Pharmacol* 2003;65:121-9.
33. Harper JW, Adami GR, Wei NB, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993;75:805-16.
34. Wagner EF, Hleb M, Hanna N, Sharma S. A pivotal role of cyclin D3 and cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in the regulation of IL-2-, IL-4-, or IL-10-mediated human B cell proliferation. *J Immunol* 1998;161:1123-31.
35. Meikrantz W, Schlegel R. Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 1996;271:10205-9.
36. Borgne A, Golsteyn RM. The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis. *Prog Cell Cycle Res* 2003;5:453-9.
37. Verdaguer E, Jorda EG, Canudas AM, et al. Antiapoptotic effects of roscovitine in cerebellar granule cells deprived of serum and potassium: a cell cycle-related mechanism. *Neurochem Int* 2004;44:251-61.
38. Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997;243:527-36.
39. Sherr CJ. The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* 1994;4:15-8.
40. Herwig S, Strauss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem* 1997;246:581-601.
41. Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-82.
42. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13:1501-12.
43. Zhou BB, Li H, Yuan J, Kirschner MW. Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:6785-90.
44. Zhang Y, Fujita N, Tsuruo T. Caspase-mediated cleavage of p21Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. *Oncogene* 1999;18:1131-8.
45. Kim SG, Kim SN, Jong HS, et al. Caspase-mediated Cdk2 activation is a critical step to execute transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* 2001;20:1254-65.
46. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 1995;269:682-5.

47. O'Nions J, Allday MJ. Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2. *Oncogene* 2003;22:7181-91.
48. Attardi LD, Lowe J, Brugarolas J, Jacks T. Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *EMBO J* 1996;15: 3693-701.
49. Gottifredi V, Shieh S, Taya Y, Prives C. p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1036-41.
50. Chunduru S, Appleman J, Blackley RL. Activity of human DNA polymerases alpha and beta with 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate as a substrate and quantitative effects of incorporation on chain extension. *Arch Biochem Biophys* 1993;302:19-30.
51. Evan GI, Brown M, Whyte M, Harrington E. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:825-34.
52. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004;23:2825-37.
53. Kim J, Kwon YJ, Park ES, et al. Human cytomegalovirus (HCMV) IE1 plays role in resistance to apoptosis with etoposide in cancer cell line by cdk2 accumulation. *Microbiol Immunol* 2003;47:959-67.
54. Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* 1999;59:1903-10.
55. Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* 2004;18:747-55.
56. Meijer L. Chemical inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* 1996;6:393-7.

Footnote

⁴The abbreviations used are: CdA, 2-chloro-2'-deoxyadenosine; CdATP, 2-chloro-2'-deoxyadenosine triphosphate; CLL, chronic lymphocytic leukemia; dCK, deoxycytidine kinase; BrdU, bromodeoxyuridine; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; Rb, retinoblastoma; PI, propidium iodide; RT, reverse transcription.

Chapitre V

Discussion générale et perspectives

Le but initial de ce travail était d'approfondir le mécanisme d'action de la CdA en étudiant ses effets dans la lignée leucémique EHEB, une lignée dérivée de lymphocytes LLC-B. Les premières expériences ont montré que cette lignée était moins sensible à la CdA que d'autres lignées leucémiques comme la lignée CCRF-CEM ou que des lymphocytes LLC-B. En cherchant à comprendre la cause de cette moindre sensibilité, nous avons découvert un nouveau mode de réponse cellulaire à la CdA, qui implique une activation de la cdk2 et du cycle cellulaire et qui contribue au processus apoptotique.

1. Résistance à la CdA de la lignée leucémique EHEB

Nous avons considéré que les cellules EHEB étaient résistantes à la CdA, mais cette résistance n'est que relative. En effet, la CdA induit dans ces cellules, une activation de la caspase-3, qui entraîne la mort par apoptose, tout comme dans les lymphocytes LLC-B ou dans les cellules CCRF-CEM, mais à des concentrations de CdA qui sont au moins 25 fois plus élevées. Comme expliqué dans l'introduction, le métabolite actif de la CdA est le CdATP, et l'incapacité à en accumuler suffisamment dans la cellule est très souvent une cause de résistance. En comparant directement les concentrations de CdATP atteintes dans les cellules CCRF-CEM et EHEB, nous avons observé qu'elles étaient 20 à 30 fois plus faibles chez ces dernières à une même concentration de CdA.

Les conséquences de cette faible accumulation de CdATP dans les cellules EHEB sont une moindre inhibition de la ribonucléotide réductase et une moindre incorporation de CdA dans l'ADN, qui mènent conjointement à une moindre inhibition de la synthèse d'ADN. Effectivement, l'inhibition de la synthèse d'ADN dans les cellules EHEB après 4 heures d'incubation en présence de CdA n'est que très modérée et n'est observée qu'à des concentrations en CdA supérieures à 5 μ M, ce qui contraste avec d'autres études rapportées dans la littérature qui montrent qu'une concentration en CdA de 1 μ M inhibe déjà complètement la synthèse d'ADN (Carson *et al.*, 1980; Carson *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 1986; Arner *et al.*, 1989; Hirota *et al.*, 1989; Sasvari-Szekely *et al.*, 1998). En outre après 24 h, il n'y a plus d'inhibition de la synthèse d'ADN, mais au contraire une stimulation (voir section 2 de ce chapitre), ceci malgré le fait que la concentration du CdATP s'est maintenue constante tout au long de l'incubation (résultat non publié).

Nous avons au départ écarté l'hypothèse d'une moindre accumulation de CdATP comme cause de résistance des cellules EHEB à la CdA car les concentrations en CdATP que nous avons mesurées nous semblaient comparables à celles rapportées dans la littérature. Les comparaisons n'étaient cependant pas faciles, du fait que les valeurs de CdATP étaient souvent exprimées en pmoles/10⁶ cellules et que la concentration réelle du CdATP dépend du volume cellulaire, lequel varie d'un type de cellule à l'autre. C'est seulement lorsque nous avons comparé directement les concentrations en CdATP atteintes dans les cellules EHEB avec celles atteintes dans les cellules CCRF-CEM que nous nous sommes rendus compte que nous avions sous-estimé le volume des cellules EHEB et de ce fait surestimé leur concentration en CdATP. La raison pour laquelle le CdATP s'accumule moins dans les cellules EHEB que dans d'autres lignées leucémiques est une dCK peu active. En effet, lorsque l'activité de cette enzyme est mesurée parallèlement dans les cellules EHEB, dans les lymphocytes LLC-B et dans les cellules CCRF-CEM, les valeurs les plus faibles sont celles obtenues dans les cellule EHEB (Cardoen *et al.*, 2004; Smal *et al.*, 2004). Des expériences de Western blot ont également montré que la dCK était moins exprimée dans les cellules EHEB que dans les deux autres types cellulaires (résultat non publié).

2. Activation par la CdA du cycle cellulaire des cellules EHEB et implication dans l'apoptose

Notre observation que l'incorporation de thymidine dans l'ADN était nettement augmentée après 24 h d'incubation en présence de CdA et que cette stimulation se produisait à des concentrations qui étaient cytotoxiques nous a d'abord grandement surpris. En effet, plusieurs auteurs proposent que les analogues de nucléosides induisent l'apoptose suite à l'inhibition de la synthèse d'ADN qu'ils provoquent et à l'accumulation de cassures de brins qui en résulte (Hirota *et al.*, 1989; Huang *et al.*, 1995; Achanta *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001; Sampath *et al.*, 2003). Dans les cellules EHEB, il apparaît clairement que l'absence d'inhibition de la synthèse d'ADN n'empêche pas la CdA d'exercer sa cytotoxicité, ce qui suggère que l'inhibition de la synthèse d'ADN n'est pas nécessairement un prérequis à l'induction de l'apoptose par la CdA. Ce fait était déjà admis pour les lymphocytes quiescents, comme les lymphocytes LLC-B, dans lesquels l'induction de l'apoptose par la

CdA ne peut être la conséquence d'une inhibition de la synthèse d'ADN puisque ces cellules n'en synthétisent pas (Carson et al., 1983; Pettitt, 2003), mais n'avait jamais été envisagé pour des lymphocytes qui se divisent. Si la synthèse d'ADN peut se poursuivre dans les cellules EHEB malgré la présence de CdA, c'est probablement, d'une part, parce que la concentration de CdATP atteinte dans ces cellules est insuffisante pour inhiber complètement la ribonucléotide réductase et, d'autre part, parce que le CdAMP incorporé dans l'ADN ne gêne que faiblement l'action de la polymérase α (Chunduru *et al.*, 1993).

Comme l'indiquent les expériences de cytométrie de flux, l'augmentation de synthèse d'ADN observée en présence de CdA n'est pas le résultat d'une réelle augmentation de la vitesse de sa synthèse, mais plutôt d'une augmentation du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire, c'est-à-dire du nombre de cellules qui synthétisent de l'ADN. Les expériences de cytométrie de flux ont en outre montré que l'augmentation du nombre de cellules EHEB en phase S du cycle cellulaire est due à une stimulation par la CdA de leur passage de la phase G1 vers la phase S. Cette stimulation serait la conséquence d'une activation de la cdk2, une protéine kinase dont l'activation est nécessaire pour la transition G1/S. Habituellement, l'activation de la cdk2 résulte d'une augmentation de l'expression de la cycline E (Meijer, 2003), ce qui ne se produit pas après addition de CdA dans les cellules EHEB. Par contre, nous avons observé, parallèlement à l'expression de la cdk2, une augmentation de son expression, ainsi qu'une diminution de l'expression de ses inhibiteurs p21 et p27, événements qui peuvent contribuer à l'augmentation de l'activité de cette kinase.

A une concentration de 20 μ M, la roscovitine, un inhibiteur de la cdk2, supprime complètement l'entrée en phase S du cycle cellulaire et sa stimulation par la CdA, et réduit d'au moins 50% l'activation de la caspase-3 induite par la CdA. Ce résultat indique que l'activation de la cdk2 et/ou du cycle cellulaire joue un rôle dans l'apoptose induite par la CdA dans les cellules EHEB. Le fait que la roscovitine ne supprime pas complètement l'activation de la caspase-3 observée en présence de CdA dans les cellules EHEB suggère que l'activation de la cdk2 par la CdA dans ces cellules n'est pas indispensable à l'induction de l'apoptose mais qu'elle la favorise. Plusieurs auteurs avaient déjà décrit que l'activation de la cdk2, par des agents chimiques ou des traitements physiques, était nécessaire ou contribuait à l'apoptose dans divers types cellulaires (Meikrantz *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Gil-Gomez *et al.*, 1998; Levkau *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1999; Choi *et*

al., 1999; Borgne *et al.*, 2003; Verdaguer *et al.*, 2004; Granes *et al.*, 2004), mais ce fait n'avait encore jamais été décrit dans des lymphocytes incubés en présence d'analogues de nucléosides.

Nos études ont ainsi révélé un nouveau mode de réponse cellulaire à la CdA, qui implique l'activation de la cdk2 et/ou du cycle cellulaire et qui favorise la mort par apoptose. Nous ne savons cependant pas encore si c'est l'activation de la cdk2 ou l'activation du cycle cellulaire qui est déterminante pour cet effet. Il a été décrit que la cdk2 pouvait phosphoryler p53 dans les thymocytes, ce qui pourrait l'activer, augmenter son activité transcriptionnelle, et aboutir à une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Hakem *et al.*, 1999). Nous avons effectivement mesuré une augmentation de la phosphorylation et de l'expression de p53, qui est très précoce, mais nous ne savons pas encore si elle résulte de l'activation de la cdk2. Nous pourrions toutefois vérifier si la cdk2 phosphoryle p53 dans notre modèle cellulaire en testant l'effet de la roscovitine sur son taux de phosphorylation. Si ce n'est pas le cas, nous pourrions rechercher d'autres cibles hypothétiques de la cdk2, qui pourraient par exemple être Bcl-2 ou Bad, dont la phosphorylation par la cdk1 a été impliquée dans l'initiation de l'apoptose (Borgne et Golsteyn, 2003). L'activation du cycle cellulaire, et particulièrement de la transition G1/S, qui est la conséquence de l'activation de la cdk2, pourrait elle-même contribuer à l'apoptose en augmentant l'incorporation des analogues de nucléosides dans l'ADN au cours de sa synthèse, ce qui augmenterait encore le dommage dans l'ADN.

Nos principales observations sont récapitulées dans la figure 13.

3. Perspectives

Le fait que l'activation de cdks telles que la cdk2, la cdk1, ou la cdk4 et la cdk6, ait à plusieurs reprises été impliquée dans le processus d'apoptose, et ce dans divers types cellulaires, laisse supposer que l'activation de la cdk2 induite par la CdA dans les cellules EHEB n'est peut être pas spécifique à la CdA ni aux cellules EHEB, ou pourrait concerner d'autres cdks.

Nous aimerions de ce fait tester si l'induction de l'apoptose par d'autres analogues de nucléosides comme la fludarabine, la cytarabine, la gemcitabine ou encore la clofarabine (2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-désoxyadénosine, CAFdA), fait également intervenir

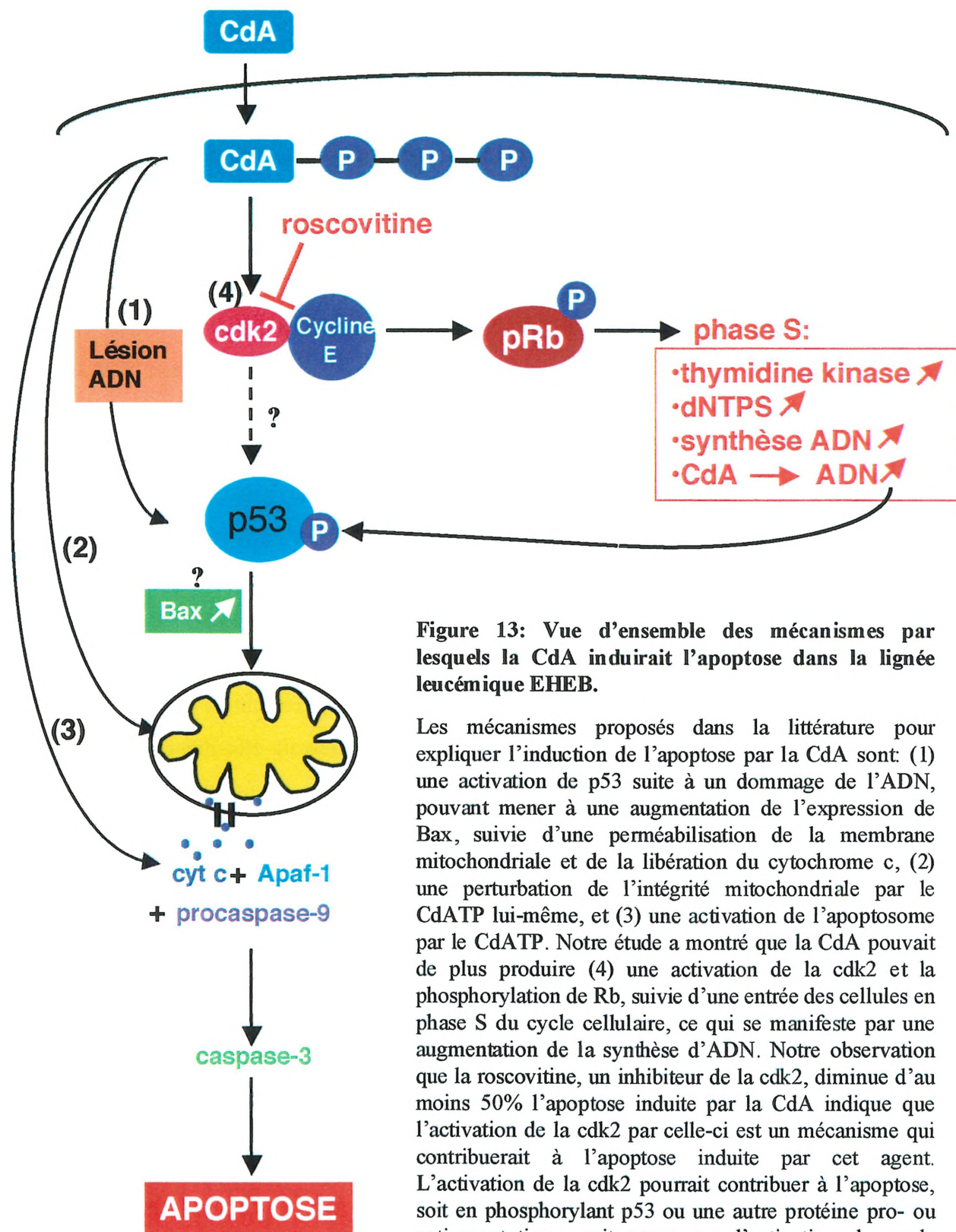


Figure 13: Vue d'ensemble des mécanismes par lesquels la CdA induirait l'apoptose dans la lignée leucémique EHEB.

Les mécanismes proposés dans la littérature pour expliquer l'induction de l'apoptose par la CdA sont: (1) une activation de p53 suite à un dommage de l'ADN, pouvant mener à une augmentation de l'expression de Bax, suivie d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale et de la libération du cytochrome c, (2) une perturbation de l'intégrité mitochondriale par le CdATP lui-même, et (3) une activation de l'apoptosome par le CdATP. Notre étude a montré que la CdA pouvait de plus produire (4) une activation de la cdk2 et la phosphorylation de Rb, suivie d'une entrée des cellules en phase S du cycle cellulaire, ce qui se manifeste par une augmentation de la synthèse d'ADN. Notre observation que la roscovitine, un inhibiteur de la cdk2, diminue d'au moins 50% l'apoptose induite par la CdA indique que l'activation de la cdk2 par celle-ci est un mécanisme qui contribuerait à l'apoptose induite par cet agent. L'activation de la cdk2 pourrait contribuer à l'apoptose, soit en phosphorylant p53 ou une autre protéine pro- ou anti-apoptotique, soit parce que l'activation du cycle cellulaire qui en résulte favorise le dommage à l'ADN en augmentant l'incorporation du CdATP dans celui-ci.

l'activation de la cdk2 ou d'une autre cdk. Des études préliminaires utilisant des microarrays (voir figures 14 et 15) nous ont montré que la gemcitabine, à la dose cytotoxique de 0,5 μ M, est capable, comme la CdA, d'induire après 24 heures l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, tels que les gènes de la cdk2, de la cycline D3, de p21 et de MYBL2, un facteur de transcription qui régule l'expression de la cdk1 et de la cycline D1. La gemcitabine induit également l'expression de gènes impliqués dans la phase S du cycle cellulaire, comme ceux de la ribonucléotide réductase, de PCNA, de la thymidilate synthase, de la dihydrofolate réductase et de la thymidine kinase 1, ainsi que de gènes impliqués dans l'apoptose, comme ceux de Bax et de Bcl-X. Au vu de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'induction de l'apoptose par la gemcitabine fasse, comme la CdA, intervenir l'activation de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Cependant, s'il y a activation de la cdk2 (ou d'une autre cdk) en présence de gemcitabine, elle ne serait pas accompagnée d'une activation du cycle cellulaire. En effet, la gemcitabine provoque dans les cellules EHEB une inhibition complète de la synthèse d'ADN et un blocage dans la progression des cellules dans le cycle cellulaire (résultat non publié). La cdk2 dans ce cas exercerait uniquement un rôle apoptotique. Il n'est pas exclu que d'autres analogues de nucléosides puissent également agir de la sorte, c'est-à-dire activer la cdk2 sans que cela ne se reflète par une activation du cycle cellulaire.

Il serait également intéressant d'étudier si une activation de la cdk2, ou d'une autre cdk, est induite par la CdA dans d'autres types de cellules leucémiques, comme les cellules CCRF-CEM, et plus particulièrement dans les lymphocytes LLC-B, et si cette activation de la cdk2 joue un rôle dans l'apoptose. Bien que les lymphocytes LLC-B soient des cellules qui sont pour la plupart quiescentes, leur cdk2 pourrait être activée suite à des stimuli apoptotiques, sans pour autant qu'elles entrent en phase S du cycle cellulaire. La faible élévation du nombre de lymphocytes LLC-B en phase S sous l'action de la fludarabine et de la CdA qui avait été notée par Petersen *et al.* (1996) est peut-être une indication qu'en effet les analogues de nucléosides activent la cdk2 dans ces cellules.

S'il apparaît certain que la roscovitine diminue l'apoptose induite par différents agents apoptotiques, il est aussi bien établi qu'elle peut induire par elle-même l'apoptose. Il a en effet été montré dans divers types de cellules cancéreuses que la roscovitine non seulement bloque le cycle cellulaire, mais induit l'apoptose (Mgbonyebi *et al.*, 1999;

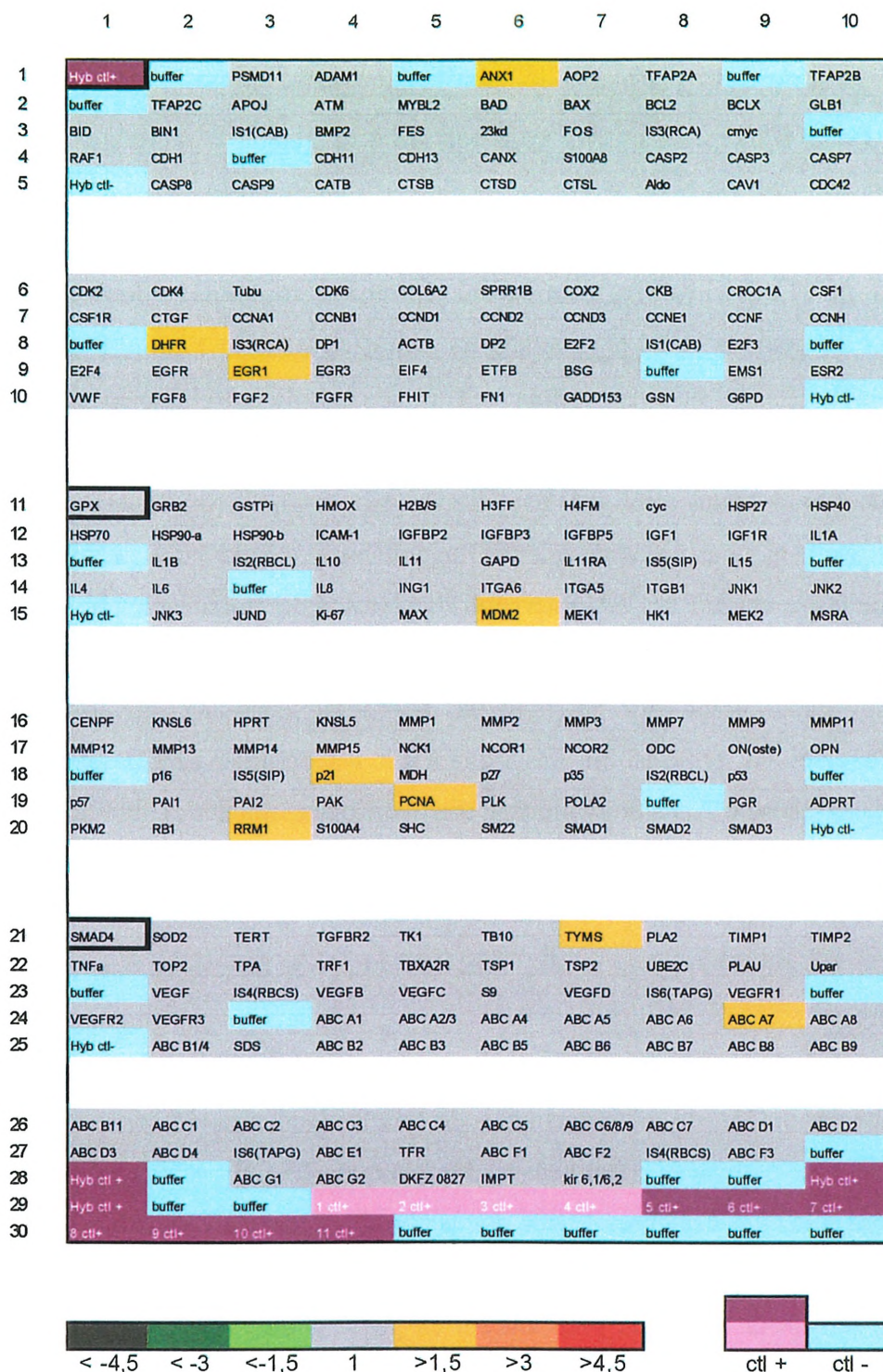


Figure 14: Effet d'une incubation de 24 heures en présence de CdA 10 μ M sur l'expression de gènes dans les cellules EHEB.

L'expression, dans ces cellules, des gènes indiqués dans le tableau a été quantifiée par la technique des microarrays après extraction de l'ARN et rapportée à leur expression dans des cellules contrôles. La CdA augmente de 1,5 à 3 fois la transcription des gènes colorés en jaune, cités ci-dessous.

ANX1: annexine 1; DHFR: dihydrofolate réductase; EGR1: early growth response 1; MDM2: mouse double minute 2; PCNA: antigène nucléaire des cellules proliférantes; RRM1: sous-unité M1 de la ribonucléotide réductase; TYMS: thymidilate synthase; ABC A7: membre de la famille des transporteurs à « ATP binding cassette ».

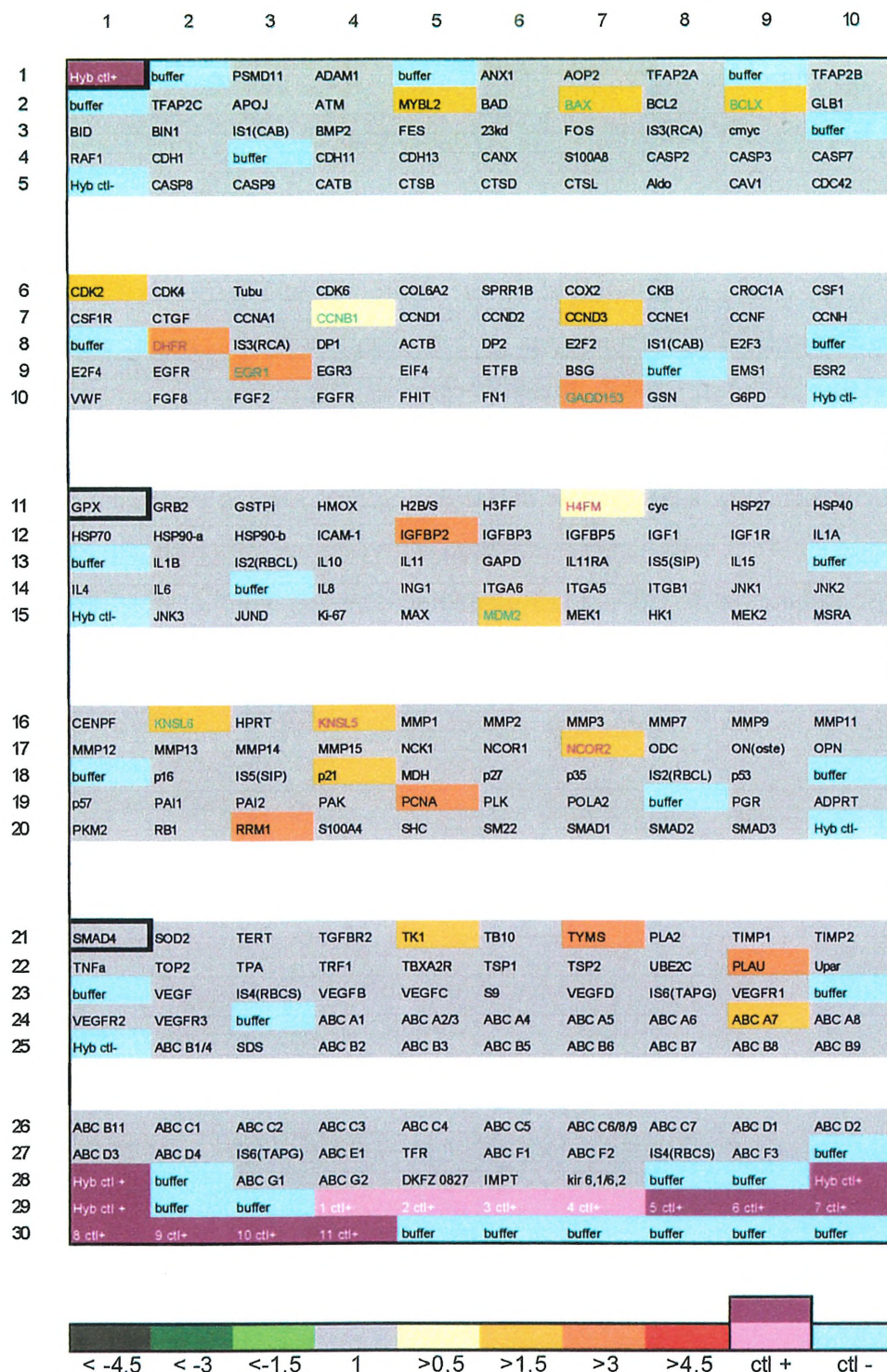


Figure 15: Effet d'une incubation de 24 heures en présence de gemcitabine 0,5 μ M sur l'expression de gènes dans les cellules EHEB.

La gemcitabine augmente de 1,5 à 3 fois la transcription des gènes colorés en jaune et de 3 à 4,5 fois celle des gènes colorés en orange.

MYBL2: v-Myb avain myeloblastosis viral oncogene homolog-like 2 ou Myb-related gene; CCNB1: cycline B1; CCND3: cycline D3; GADD153: growth arrest- and DNA damage-inducible gene; IGFBP2: insulin-like growth factor-binding protein 2; KNSL 5/6: kinesin-like 5/6; NCOR2: nuclear receptor corepressor 2; TK1: thymidine kinase 1; PLA2: activateur du plasmingène urinaire. Les autres abréviations sont reprises dans la figure 13.

Edamatsu *et al.*, 2000), ce qui en fait une molécule très attractive pour le traitement du cancer qui est souvent associé à un dérèglement du cycle cellulaire, dû à une « hyperactivation » de cdk. Un isomère de la roscovitine, Cyc202 (*R*-Roscovitine), plus sélectif et plus puissant que la roscovitine, se trouve d'ailleurs déjà en phases I et II d'essais cliniques (Benson *et al.*, 2002). Il a aussi été démontré que la roscovitine est capable d'induire l'apoptose dans les lymphocytes LLC-B, bien que la cdk2 ne soit pas active dans ces cellules (Hahntow *et al.*, 2004). Il semble donc que la roscovitine puisse, d'une part, induire l'apoptose, et d'autre part s'opposer à l'apoptose induite par d'autres stimuli. Puisqu'il est envisagé que la roscovitine puisse être utilisée dans le traitement de la LLC-B (Hahntow *et al.*, 2004), il nous semble important d'investiguer si la roscovitine diminue ou non l'apoptose induite par la CdA et la fludarabine dans les lymphocytes LLC-B, dans le cadre d'études de combinaisons d'agents de chimiothérapie.

Références

- Achanta G, Pelicano H, Feng L, Plunkett W, Huang P. Interaction of p53 and DNA-PK in response to nucleoside analogues: potential role as a sensor complex for DNA damage. *Cancer Res* **2001**;61:8723-9.
- Adams J. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **2003**;17:2481-95.
- Albertioni F, Hassan M, Silberring J, Liliemark J. Kinetics and metabolism of 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine in the isolated perfused rat liver. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* **1995**;20:225-32.
- Albertioni F, Lindemalm S, Reichelova V, Pettersson B, Eriksson S, Juliusson G, Liliemark J. Pharmacokinetics of cladribine in plasma and its 5'-monophosphate and 5'-triphosphate in leukemic cells of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* **1998**;4:653-8.
- Alessi-Severini S, Gati WP, Belch AR, Paterson AR. Intracellular pharmacokinetics of 2-chlorodeoxyadenosine in leukemia cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **1995**;9:1674-9.
- Arner ES, Spasokoukotskaja T, Juliusson G, Liliemark J, Eriksson S. Phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) in extracts of peripheral blood mononuclear cells of leukaemic patients. *Br J Haematol* **1994**;87:715-8.
- Arner ES, Eriksson S. Mammalian deoxyribonucleoside kinases. *Pharmacol Ther* **1995**;67:155-86.
- Arner ES. On the phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine (CdA) and its correlation with clinical response in leukemia treatment. *Leuk Lymphoma* **1996**;21:225-31.
- Avery TL, Rehg JE, Lumm WC, Harwood FC, Santana VM, Blakley RL. Biochemical pharmacology of 2-chlorodeoxyadenosine in malignant human hematopoietic cell lines and therapeutic effects of 2-bromodeoxyadenosine in drug combinations in mice. *Cancer Res* **1989**;49:4972-8.
- Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today* **1999**;5:216-24.
- Bartek J, Lukas J. Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **2001**;13:738-47.
- Beck FW, Eilender DS, Dandashi MH, Siddiq F, Snell DC, Godmere MA, Al-Katib AM, Mohammad RM. Factors affecting bryostatine 1-enhanced 2-CdA cytotoxicity in resistant B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Int J Mol Med* **2004**;14:113-9.
- Begleiter A, Pugh L, Israels LG, Johnston JB. Enhanced cytotoxicity and inhibition of DNA damage repair in irradiated murine L5178Y lymphoblasts and human chronic lymphocytic leukemia cells treated with 2'-deoxycoformycin and deoxyadenosine in vitro. *Cancer Res* **1988**;48:3981-6.
- Bellosillo B, Villamor N, Lopez-Guillermo A, Marce S, Bosch F, Campo E, Montserrat E, Colomer D. Spontaneous and drug-induced apoptosis is mediated by conformational changes of Bax and Bak in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2002**;100:1810-16.
- Benson C, Raynaud F, O'Donnell A, Gianella-Borradori A, Westwood R, McClue S, Workman P, Judson I. Pharmacokinetics (PK) of the oral cyclin dependent kinase inhibitor CYC202 (R-roscovitine) in patients with cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* **2002**;43:abstract 1354.
- Bernardi P, Colonna R, Costantini P, Eriksson O, Fontaine E, Ichas F, Massari S, Nicolli A, Petronilli V, Scorrano L. The mitochondrial permeability transition. *Biofactors* **1998**;8:273-81.

- Beutler E, Carson DA. 2-Chlorodeoxyadenosine: hairy cell leukemia takes a surprising turn. *Blood Cells* **1993**;19: 559-68.
- Bhalla K, Nayak R, Grant S. Isolation and characterisation of a deoxycytidine kinase-deficient human promyelocytic leukemic cell line highly resistant to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* **1984**;44:5029-37.
- Bjorklund S, Skog S, Tribukait B, Thelander L. S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* **1990**;29:5452-8.
- Bontemps F, Delacauw A, Cardoen S, Van Den Neste E, Van den Berghe G. Metabolism and cytotoxic effects of 2-chloroadenine, the major catabolite of 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Biochem Pharmacol* **2000**;59:1237-43.
- Borgne A, Golsteyn RM. The role of cyclin-dependent kinases in apoptosis. *Prog Cell Cycle Res* **2003**;5:453-9.
- Borner MM, Joncourt F, Hotz MA. Similarity of apoptosis induction by 2-chlorodeoxyadenosine and cisplatin in human mononuclear blood cells. *Br J Cancer* **1997**;76:1448-54.
- Bosanquet AG, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DJ, Dorken B, Daniel PT. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2002**;16:1035-44.
- Caligaris-Cappio F. Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* **2000**;4:5-21.
- Carrera CJ, Piro LD, Saven A, Beutler E, Terai C, Carson DA. 2-Chlorodeoxyadenosine chemotherapy triggers programmed cell death in normal and malignant lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* **1991**;309:15-8.
- Carson DA, Wasson DB, Kaye J, Ullman B, Martin DW Jr, Robins RK, Montgomery JA. Deoxycytidine kinase-mediated toxicity of deoxyadenosine analogs toward malignant human lymphoblasts in vitro and toward murine L1210 leukemia in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**;77:6865-9.
- Carson DA, Kaye J, Wasson DB. The potential importance of soluble deoxynucleotidase activity in mediating deoxyadenosine toxicity in human lymphoblasts. *J Immunol* **1981**;126:348-52.
- Carson DA, Wasson DB, Taetle R, Yu A. Specific toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine toward resting and proliferating human lymphocytes. *Blood* **1983**;62:737-43.
- Carson DA, Carrera CJ, Wasson DB, Iizasa T. Deoxyadenosine-resistant human T lymphoblasts with elevated 5'-nucleotidase activity. *Biochim Biophys Acta* **1991**;1091:22-8.
- Carson DA, Leoni LM. Hairy-cell leukemia as a model for drug development. *Best Pract Res Clin Haematol* **2003**;16: 83-9.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **2004**;23:2825-37.
- Castejon R, Vargas JA, Briz M, Berrocal E, Romero Y, Gea-Banacloche JC, Fernandez MN, Durantez A. Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **1997**;11:1253-7.
- Chandra J, Mansson E, Gogvadze V, Kaufmann SH, Albertioni F, Orrenius S. Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to a lack of calcium-dependent cytochrome c release. *Blood* **2002**;99:655-63.
- Choi KS, Eom YW, Kang Y, Ha MJ, Rhee H, Yoon JW, Kim SJ. Cdc2 and cdk2 kinase activated by transforming growth factor-beta1 trigger apoptosis through the phosphorylation of retinoblastoma protein in FaO hepatoma cells. *J Biol Chem* **1999**;274:31775-83.

Chunduru SK, Appleman JR, Blakley RL. Activity of human DNA polymerases alpha and beta with 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate as a substrate and quantitative effects of incorporation on chain extension. *Arch Biochem Biophys* **1993**;302:19-30.

Cohen A, Hirschhorn R, Horowitz SD, Rubinstein A, Polmar SH, Hong R, Martin DW Jr. Deoxyadenosine triphosphate as a potentially toxic metabolite in adenosine deaminase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **1978**;75:472-6.

Crawford CR, Ng CY, Noel LD, Belt JA. Nucleoside transport in L1210 murine leukemia cells. Evidence for three transporters. *J Biol Chem* **1990**;265:9732-6.

Csapo Z, Sasvari-Szekely M, Spasokoukotskaja T, Talianidis I, Eriksson S, Staub M. Activation of deoxycytidine kinase by inhibition of DNA synthesis in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **2001**;61:191-7.

Decker P, Muller S. Modulating poly(ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol* **2002**;3:275-83.

Delannoy A, Martiat P, Gala JL, Deneys V, Ferrant A, Bosly A, Scheiff JM, Michaux JL. 2-Chlorodeoxyadenosine (CdA) for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* **1995**;9:1130-5.

Dewson G, Snowden RT, Almond JB, Dyer MJS, Cohen GM. Conformational change and mitochondrial translocation of Bax accompany proteasome inhibitor-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemic cells. *Oncogene* **2003**;22:2643-54.

Dighiero G, Binet JL. Chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther* **1996**;38 Suppl 2:S41-61.

Dohner H, Fischer K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustka A, Hunstein W, Lichter P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood* **1995**;85:1580-9.

Dormer P, Theml H, Lau B. Chronic lymphocytic leukemia: a proliferative or accumulative disorder?. *Leuk Res* **1983**;7:1-10.

Duhayon L. Analyse de la résistance de la lignée leucémique EHEB à la 2-chloro-2'-désoxyadénosine. Mémoire présenté en **2001-2002**.

Dumontet C, Fabianowska-Majewska K, Mantincic D, Callet Bauchu E, Tigaud I, Gandhi V, Lepoivre M, Peters GJ, Rolland MO, Wyczzechowska D, Fang X, Gazzo S, Voorn DA, Vanier-Viornery A, Mackey J. Common resistance mechanisms to deoxynucleoside analogues in variants of the human erythroleukaemic line K562. *Br J Haematol* **1999**;106:78-85.

Dyson N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **1998**;12:2245-62.

Edamatsu H, Gau CL, Nemoto T, Guo L, Tamanoi F. Cdk inhibitors, roscovitine and olomoucine, synergise with farnesyltransferase inhibitors (FTI) to induce efficient apoptosis of human cancer cell lines. *Oncogene* **2000**;19:3059-68.

el Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independant of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* **1993**;82:3452-9.

Enriquez JA, Fernandez-Silva P, Perez-Martos A, Lopez-Perez MJ, Montoya J. The synthesis of mRNA in isolated mitochondria can be maintained for several hours and is inhibited by high levels of ATP. *Eur J Biochem* **1996**;237:601-10.

Eriksson S, Kierdaszuk B, Munch-Petersen B, Oberg B, Johansson NG. Comparison of the substrate specificities of human thymidine kinase 1 and 2 and deoxycytidine kinase toward antiviral and cytostatic nucleoside analogs. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**;176:586-92.

Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **1992**;69:119-28.

Evan GI, Brown L, Whyte M, Harrington E. Apoptosis and the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **1995**;7:825-34.

a Fabianowska-Majewska K, Wasiak TJ, Warzocha K, Marlewski M, Fairbanks L, Smolenski RT, Duley J, Simmonds A. A new mechanism of toxicity of 2-chlorodeoxyadenosine (2CdA). *Adv Exp Med Biol* **1994**;370:125-8.

b Fabianowska-Majewska K, Duley JA, Simmonds A. Effects of novel anti-viral adenosine analogues on the activity of S-adenosylhomocysteine hydrolase from human liver. *Biochem Pharmacol* **1994**;48:897-903.

Fabianowska-Majewska K, Tybor K, Duley J, Simmonds A. The influence of 2-chloro-2'-deoxyadenosine on metabolism of deoxyadenosine in human primary CNS lymphoma. *Biochem Pharmacol* **1995**;50:1379-83.

Fagard R, Mouas H, Dusanter-Fourt I, Devillers C, Bissieres P, Martin A, Lenoir G, Van Tan H, Feuillard J, Raphael M. Resistance to fludarabine-induced apoptosis in Epstein-Barr virus infected B cells. *Oncogene* **2002**;21:4473-80.

Filleul B, Delannoy A, Ferrant A, Zenebergh A, Van Daele S, Bosly A, Doyen C, Mineur P, Glorieux P, Driesschaert P, et al. A single course of 2-chloro-deoxyadenosine does not eradicate leukemic cells in hairy cell leukemia patients in complete remission. *Leukemia* **1994**;8:1153-6.

Flaschove M, Strumberg D, Ayscue L, Mitchell BS, Tirier C, Heit W, Seeber S, Schutte J. Structural analysis of the deoxycytidine kinase gene in patients with acute myeloid leukemia and resistance to cytosine arabinoside. *Leukemia* **1994**;8:780-5.

Foley TT, Hentosh P, Walters DE. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine: alteration of DNA: TATA element binding protein (TBP) interactions. *J Mol Model* **2004**;10:32-7.

Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **2003**;22:9030-40.

Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **1991**;88:5413-7.

Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C. Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia* **2001**;15:875-90.

Galmarini CM, Voorzanger N, Falette N, Jordheim L, Cros E, Puisieux A, Dumontet C. Influence of p53 and p21 (WAF1) expression on sensitivity of cancer cells to cladribine. *Biochem Pharmacol* **2003**;65:121-9.

Gandhi V, Plunkett W. Cellular and clinical pharmacology of fludarabine. *Clin Pharmacokinet* **2002**;41:93-103.

Garnovskaya MN, Mukhin YV, Vlasova TM, Grewal JS, Ullian ME, Tholanikunnel BG, Raymond JR. Mitogen-induced rapid phosphorylation of serine 795 of the retinoblastoma gene product in vascular smooth muscle cells involves ERK activation. *J Biol Chem* **2004**;279:24899-905.

a Gartenhaus RB, Wang P, Hoffman M, Janson D, Rai KR. The induction of p53 and WAF1/CIP1 in chronic lymphocytic leukemia cells treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *J Mol Med* **1996**;74:143-7.

b Gartenhaus RB, Wang P, Hoffmann P. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis in human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with adriamycin by using a p53-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **1996**;93:265-8.

Gati WP, Paterson AR, Belch AR, Chlumecky V, Larratt LM, Mant MJ, Turner AR. Es nucleoside transporter content of acute leukemia cells: role in cell sensitivity to cytarabine (araC). *Leuk Lymphoma* **1998**;32:45-54.

Gazziola C, Moras M, Ferraro P, Gallinaro L, Verin R, Rampazzo C, Reichard P, Bianchi V. Induction of human high K(m) 5'-nucleotidase in cultured 293 cells. *Exp Cell Res* **1999**;253:474-82.

a Genini D, Budihardjo I, Plunkett W, Wang X, Carrera CJ, Cottam HB, Carson DA, Leoni LM. Nucleotide requirements for the *in vitro* activation of the apoptosis protein-activating factor-1-mediated caspase pathway. *J Biol Chem* **2000**;275:29-34.

b Genini D, Adachi S, Chao Q, Rose DW, Carrera CJ, Cottam HB, Carson DA, Leoni LM. Deoxyadenosine analogs induce programmed cell death in chronic lymphocytic leukemia cells by damaging the DNA and by directly affecting the mitochondria. *Blood* **2000**;96:3537-43.

Giblett ER, Anderson JE, Cohen F, Pollara B, Meuwissen HJ. (1972) Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet* **1972**;2:1067-9.

Gil-Gomez G, Berns A, Brady HJM. A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J* **1998**;17:7209-18.

Goan YG, Zhou B, Hu E, Mi S, Yen Y. Overexpression of ribonucleotide reductase as a mechanism of resistance to 2,2-difluorodeoxycytidine in the human KB cancer cell line. *Cancer Res* **1999**;59:4204-7.

Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* **1997**;7:750-3.

Gottardi D, De Leo AM, Alfarano A, Stacchini A, Circosta P, Gregoret MG, Bergui L, Aragno M, Caligaris-Cappio F. Fludarabine ability to down-regulate Bcl-2 gene product in CD5+ leukemic B cells: in vitro/in vivo correlations. *Br J Haematol* **1997**;99:147-57.

Granes F, Roig MB, Brady HJM, Gil-Gomez G. Cdk2 activation acts upstream of the mitochondrion during glucocorticoid induced thymocyte apoptosis. *Eur J Immunol* **2004**;34:2781-90.

Granziero L, Ghia P, Circosta P, Gottardi D, Strola G, Geuna M, Montagna L, Piccoli P, Chilosi M, Caligaris-Cappio F. Survivin is expressed on CD40 stimulation and interfaces proliferation and apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **2001**;97: 2777-83.

Griffing J, Koob R, Blakley RL. Mechanisms of inhibition of DNA synthesis by 2-chlorodeoxyadenosine in human lymphoblastic cells. *Cancer Res* **1989**;49: 6923-8.

Hahntow IN, Schneller F, Oelsner M, Weick K, Ringshausen I, Fend F, Peschel C, Decker T. Cyclin-dependent kinase inhibitor Roscovitine induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia* **2004**;18:747-55.

Hakem A, Sasaki T, Kozieradzki I, Penninger JM. The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J Exp Med* **1999**;189:957-68.

Hakimian D, Tallman MS, Kiley C, Peterson L. Detection of minimal residual disease by immunostaining of bone marrow biopsies after 2-chlorodeoxyadenosine for hairy cell leukemia. *Blood* **1993**;82:1798-802.

Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC. Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1993**;82:1820-8.

Hapke DM, Stegmann AP, Mitchell BS. Retroviral transfer of deoxycytidine kinase into tumor cell lines enhances nucleoside toxicity. *Cancer Res* **1996**;56:2343-7.

Hartman WR, Hentosh P. The antileukemia drug 2-chloro-2'-deoxyadenosine: an intrinsic transcriptional antagonist. *Mol Pharmacol* **2004**;65:227-34.

- Harvey KJ, Lukovic D, Ucker DS. Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol* **2000**;148:59-72.
- Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2', 2'-difluorodeoxycytidine and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* **1988**;48:4024-31.
- Hengstschlager M, Denk C, Wawra E. Cell cycle regulation of deoxycytidine kinase. Evidence for post-transcriptional control. *FEBS Lett* **1993**;321:237-40.
- Hentosh P, Koob R, Blakley RL. Incorporation of 2-halogeno-2'-deoxyadenosine 5-triphosphates into DNA during replication by human DNA polymerases alpha and beta. *J Biol Chem* **1990**;265:4033-40.
- a Hentosh P, Tibudan M. In vitro transcription of DNA containing 2-chloro-2'-deoxyadenosine monophosphate. *Mol Pharmacol* **1995**;48:897-904.
- b Hentosh P, Tibudan M, Grippo P. A human factor that recognizes DNA substituted with 2-chloroadenine, an antileukemic purine analog. *Mol Carcinog* **1995**;13:245-53.
- Hentosh P, Tibudan M. 2-chloro-2'-deoxyadenosine, an antileukemic drug, has an early effect on cellular mitochondrial function. *Mol Pharmacol* **1997**;51:613-9.
- Herwig S, Strauss M. The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *Eur J Biochem* **1997**;246:581-601.
- Higashigawa M, Ido M, Nagao Y, Kuwabara H, Hori H, Ohkubo T, Kawasaki H, Sakurai M. Decreased DNA polymerase sensitivity to 1- β -D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate in P388 murine leukemic cells resistant to vincristine. *Leuk Res* **1991**;15:675-81.
- Hirota Y, Yoshioka A, Tanaka S, Watanabe K, Otani T, Minowada J, Matsuda A, Ueda T, Wataya Y. Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res* **1989**;49:915-9.
- Ho DH. Distribution of kinase and deaminase of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in tissues of man and mouse. *Cancer Res* **1973**;33:2816-20.
- Hoang AT, Cohen KJ, Barrett JF, Bergstrom DA, Dang CV. Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**;91:6875-9.
- Huang MC, Ashmun RA, Avery TL, Kuehl M, Blakley RL. Effects of cytotoxicity of 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 2-bromo-2'-deoxyadenosine on cell growth, clonogenicity, DNA synthesis, and cell cycle kinetics. *Cancer Res* **1986**;46:2362-8.
- Huang P, Chubb S, Plunkett W. Termination of DNA synthesis by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *J Biol Chem* **1990**;265:16617-25.
- Huang P, Plunkett W. Fludarabine and gemcitabine-induced apoptosis: incorporation of analogs into DNA is a critical event. *Cancer Chemother Pharmacol* **1995**;36:181-8.
- Huang P, Sandoval A, Van Den Neste E, Keating MJ, Plunkett W. Inhibition of RNA transcription: a biochemical mechanism of action against chronic lymphocytic leukemia cells by fludarabine. *Leukemia* **2000**;14:1405-13.
- Hunsucker SA, Spychala J, Mitchell BS. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterisation and role in nucleoside analog resistance. *J Biol Chem* **2001**;276:10498-504.
- Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* **2000**;352:1-17.

Idink-Mecking CA, Richel DJ, Vermes I, Schaafsma MR, Reutelingsperger C, Haanen C. Ex vivo evidence of lymphocyte apoptosis in hairy cell leukemia, induced by 2-chlorodeoxyadenosine treatment. *Ann Hematol* **1998**; 76: 25-9.

Jin YH, Yim H, Park JH, Lee SK. Cdk2 activity is associated with depolarization of mitochondrial membrane potential during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**;305:974-80.

Johansson M, Karlsson A. Cloning of the cDNA and chromosome localization of the gene for human thymidine kinase 2. *J Biol Chem* **1997**;272:8454-8.

Johnston JB, Daeninck P, Verburg L, Lee K, Williams G, Israels LG, Mowat MR, Begleiter A. p53, MDM-2, BAX and BCL-2 and drug resistance in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **1997**;26:435-49.

Jordheim LP, Cros E, Gouy MH, Galmarini CM, Peyrottes S, Mackey J, Perigaud C, Dumontet C. Characterisation of a gemcitabine-resistant murine leukemic cell line: reversion of in vitro resistance by a mononucleotide prodrug. *Clin Cancer Res* **2004**;10:5614-21.

Juliusson G, Liliemark J. Long-term survival following cladribine (2-chlorodeoxyadenosine) therapy in previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Ann Oncol* **1996**;7:373-9.

Kamiya K, Huang P, Plunkett W. Inhibition of the 3'→5' exonuclease of human DNA polymerase epsilon by fludarabine-terminated DNA. *J Biol Chem* **1996**;271:19428-35.

Karlsson K, Stromberg M, Liliemark J, Delannoy A, Johnson SA, Porwit A, Kimby E, Larfars G, Christiansen I, Nilsson G, Celsing F, Sundstorm G, Luthman M, Tidefelt U, Wallvik J, Juliusson G. Oral cladribine for B-cell chronic lymphocytic leukemia: report of a phase II trial with a 3-d, 3-weekly schedule in untreated and pretreated patients, and a long-term follow-up of 126 previously untreated patients. *Br J Haematol* **2002**;116:538-48.

Kawasaki H, Carrera CJ, Piro LD, Saven A, Kipps TJ, Carson DA. Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* **1993**;81:597-601.

Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ, McCredie KB. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **1989**;74:19-25.

Keating MJ, O'Brien S, Albitar M. Emerging information on the use of rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* **2002**;29:70-4.

Keating MJ, Chiorazzi N, Messmer B, Damle RN, Allen SL, Rai KR, Ferrarini RM, Kipps TJ. Biology and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology* **2003**;153-75.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**;26:239-57.

Kim SG, Kim SN, Jong HS, Kim NK, Hong SH, Kim SJ, Bang YJ. Caspase-mediated Cdk2 activation is a critical step to execute transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Oncogene* **2001**;20:1254-65.

Kim J, Kwon YJ, Park ES, Sung B, Kim JH, Park CG, Hwang ES, Cha CY. Human cytomegalovirus (HCMV) IE1 plays role in resistance to apoptosis with etoposide in cancer cell line by cdk2 accumulation. *Microbiol Immunol* **2003**;47:959-67.

Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* **2000**;7:223-34.

Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, Freedman A, Inghirami G, Cro L, Baldini L, Neri A, Califano A, Dalla-Favera R. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* **2001**;194:1625-38.

Klöpfer A, Hasenjäger A, Belka C, Schulze-Osthoff K, Dörken B, Daniel PT. Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* **2004**;1-11.

Konwalinka G, Schrimmer M, Hilbe W, Fend F, Geisen F, Knobelechner A, Petzer A, Thaler J. Minimal residual disease in hairy-cell leukemia after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood Cells Mol Dis* **1995**;21:142-51.

Kranenburg O, van der Eb AJ, Zantema A. Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death. *EMBO J* **1996**;15:46-54.

Kuwabara M, Tanabe K, Hiraoka W, Tamura Y, Sato F, Matsuda A, Ueda T. 2-Chlorodeoxyadenosine inhibits the repair of DNA double-strand breaks and does not inhibit the repair of DNA single-strand breaks in X-irradiated Chinese hamster V79 cells. *Chem Biol Interact* **1991**;79:349-58.

Lai Y, Tse CM, Unadkat JD. Mitochondrial expression of the human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) results in enhanced mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *J Biol Chem* **2004**;279:4490-7.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **1992**;358:15-6.

Lang TT, Selner M, Young JD, Cass CE. Acquisition of human concentrative nucleoside transporter 2 (hcnt2) activity by gene transfer confers sensitivity to fluoropyrimidine nucleosides in drug-resistant leukemia cells. *Mol Pharmacol* **2001**;60:1143-52.

Lawrenzi J, Bunnell A, Hentosh P. Nucleotide excision repair-deficient human cells in culture exhibit decreased survival after 2-chlorodeoxyadenosine treatment. *Anticancer Res* **2003**;23:3141-5.

Lens D, Dyer MJ, Garcia-Marco JM, De Schouwer PJ, Hamoudi RA, Jones D, Farahat N, Matutes E, Catovsky D. p53 abnormalities in CLL are associated with excess of polymphocytes and poor prognosis. *Br J Haematol* **1997**;99:848-57.

Leoni LM, Chao Q, Cottam HB, Genini D, Rosenbach M, Carrera CJ, Budihardjo I, Wang X, Carson DA. Induction of an apoptotic program in cell-free extracts by 2-chloro-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate and cytochrome c. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**;95:9567-71.

Levkau B, Koyama H, Raines EW, Clurman BE, Herren B, Orth K, Roberts JM, Ross R. Cleavage of p21Cip/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell* **1998**;1:553-63.

Li L, Liu X, Glassman AB, Keating MJ, Stros M, Plunkett W, Yang LY. Fludarabine triphosphate inhibits nucleotide excision repair of cisplatin-induced DNA adducts in vitro. *Cancer Res* **1997**;57:1487-94.

Liliemark J, Juliusson G. Cellular pharmacokinetics of 2-chloro-2'-deoxyadenosine nucleotides: comparison of intermittent and continuous intravenous infusion and subcutaneous and oral administration in leukemia patients. *Clin Cancer Res* **1995**;1:385-90.

Liliemark J. The clinical pharmacokinetics of cladribine. *Clin Pharmacokinet* **1997**;32:120-31.

Lim SE, Copeland WC. Differential incorporation and removal of antiviral deoxynucleotides by human DNA polymerase gamma. *J Biol Chem* **2001**;276:23616-23.

Lindemalm S, Liliemark J, Juliusson G, Larsson R, Albertioni F. Cytotoxicity and pharmacokinetics of cladribine metabolite, 2-chloroadenine in patients with leukemia. *Cancer Lett* **2004**;210:171-7.

Lotfi K, Mansson E, Spasokoukotskaja T, Pettersson B, Liliemark J, Peterson C, Eriksson S, Albertioni F. Biochemical pharmacology and resistance to 2-chloro-2'-arabino-fluoro-2'-deoxyadenosine, a novel analogue of cladribine in human leukemic cells. *Clin Cancer Res* **1999**;5:2438-44.

- Lotfi K, Mansson E, Chandra J, Wang Y, Xu D, Knaust E, Spasokoukotskaja T, Liliemark E, Eriksson S, Albertioni F. Pharmacological basis for cladribine resistance in a human acute T lymphoblastic leukaemia cell line selected for resistance to etoposide. *Br J Haematol* **2001**;113:339-46.
- Lotfi K, Mansson E, Peterson C, Eriksson S, Albertioni F. Low level of mitochondrial deoxyguanosine kinase is the dominant factor in acquired resistance to 9-beta-D-arabinofuranosylguanine cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**;293:1489-96.
- Lotfi K, Juliusson G, Albertioni F. Pharmacological basis for cladribine resistance. *Leuk Lymphoma* **2003**;44:1705-12.
- Mansson E, Spasokoukotskaja T, Sallstrom J, Eriksson S, Albertioni F. Molecular and biochemical mechanisms of fludarabine and cladribine resistance in a human promyelocytic cell line. *Cancer Res* **1999**;59:5956-63.
- Mansson E, Flordal E, Liliemark J, Spasokoukotskaja T, Elford H, Lagercrantz S, Eriksson S, Albertioni F. Downregulation of deoxycytidine kinase in leukemic cell lines resistant to cladribine and clofarabine and increased ribonucleotide reductase activity contributes to fludarabine resistance. *Biochem Pharmacol* **2003**;65:237-47.
- Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* **2000**;2:41-3.
- Marzo I, Perez-Galan P, Giraldo P, Rubio-Felix D, Anel A, Naval J. Cladribine induces apoptosis in human leukaemia cells by caspase-dependent and -independent pathways acting on mitochondria. *Biochem J* **2001**;359:537-46.
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**;97:10389-94.
- McGowan CH. Regulation of the eukaryotic cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* **2003**;5:1-4.
- Meijer L. Le cycle de division cellulaire et sa regulation. *Oncologie* **2003**;5:311-26.
- Meikrantz W, Gisselbrecht S, Tam SW, Schlegel R. Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**;91:3754-8.
- Meikrantz W, Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J Cell Biochem* **1995**;58:160-74.
- Meikrantz W, Schlegel R. Suppression of apoptosis by dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* **1996**;271:10205-9.
- Messmer D, Messmer B, Albesiano E. Direct measurement of B-CLL cell production and turnover in vivo. *Blood* **2002**;100:169a.
- Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Roscovitine induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res* **1999**;15:1903-10.
- Morabito F, Filangeri M, Callea I, Sculli G, Callea V, Fracchiolla NS, Neri A, Brugiatelli M. Bcl-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica* **1997**;82:16-20.
- Muller M, Strand S, Hug H, Heinemann EM, Walczak H, Hofmann WJ, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. 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* **1997**;99:403-13.
- Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* **1998**;188:2033-45.

- Munch-Petersen B, Piskur J, Sondergaard L. Four deoxynucleoside kinase activities from *Drosophila melanogaster* are contained within a single monomeric enzyme, a new multifunctional deoxynucleoside kinase. *J Biol Chem* **1998**;273:3926-31.
- Nagourney RA, Evans SS, Messenger JC, Su YZ, Weisenthal LM. 2-chlorodeoxyadenosine activity and cross resistance patterns in primary cultures of human hematologic neoplasms. *Br J Cancer* **1993**;67:10-4.
- Nahi H, Lehmann S, Møllgaard L, Bengtzen S, Selivanova G, Wiman KG, Paul C, Merup M. Effects of PRIMA-1 on chronic lymphocytic leukemia cells with and without hemizygous p53 deletion. *Br J Haematol* **2004**;127:285-91.
- Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* **1998**;9:585-93.
- Nomura Y, Inanami O, Takahashi K, Matsuda A, Kuwabara M. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine induces apoptosis through the Fas/Fas ligand pathway in human leukemia cell line MOLT-4. *Leukemia* **2000**;14:299-306.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **1993**;74:609-19.
- Ongkeko W, Ferguson DJ, Harris AL, Norbury C. Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *J Cell Sci* **1995**;108:2897-904.
- Orr RM, Talbot DC, Aherne WG, Fisher TC, Serafinowski P, Harrap KR. 2'-Deoxycytidine kinase deficiency is a major determinant of 2-chloro-2'-deoxyadenosine resistance in lymphoid cell lines. *Clin Cancer Res* **1995**;1:391-8.
- Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, Mellstedt H. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H treatment in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* **1997**;15:1567-74.
- Owens JK, Shewach DS, Ullman B, Mitchell BS. Resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human T-lymphoblasts mediated by mutations within the deoxycytidine kinase gene. *Cancer Res* **1992**;52:2389-93.
- Park DS, Levine B, Ferrari G, Greene LA. Cyclin dependent kinase inhibitors and dominant negative cyclin dependent kinase 4 and 6 promote survival of NGF-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci* **1997**;17:8975-83.
- Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA. Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. *J Cell Biol* **1998**;143:457-67.
- Parker WB, Bapat AR, Shen JX, Townsend AJ, Cheng YC. Interaction of 2-halogenated dATP analogs (F, Cl, and Br) with human DNA polymerases, DNA primase, and ribonucleotide reductase. *Mol Pharmacol* **1988**;34:485-91.
- Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* **2004**;18:385-93.
- Peeper DS, Parker LL, Ewen ME, Toebes M, Hall FL, Xu M, Zantema A, van der Eb AJ, Piwnicka-Worms H. A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J* **1993**;12:1947-54.
- Pepper C, Thomas A, Hidalgo de Quintana J, Davies S, Hoy T, Bentley P. Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: the role of Bcl-2 family dysregulation. *Leuk Res* **1999**;23:1007-14.
- Perez-Galan P, Marzo I, Giraldo P, Rubio-Felix D, Laserra P, Larrad L, Anel A, Naval J. Role of caspases and apoptosis-inducing factor (AIF) in cladribine-induced apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2002**;16:2106-14.

Petersen AJ, Brown RD, Gibson J, Pope B, Luo XF, Schutz L, Wiley JS, Joshua DE. Nucleoside transporters, bcl-2 and apoptosis in CLL cells exposed to nucleoside analogues in vitro. *Eur J Haematol* **1996**;56:213-20.

a Pettitt AR, Clarke AR, Cawley JC, Griffiths SD. Purine analogues kill resting lymphocytes by p53-dependent and -independent mechanisms. *Br J Haematol* **1999**;105:986-8.

b Pettitt AR, Sherrington PD, Cawley JC. The effect of p53 dysfunction on purine analogue cytotoxicity in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* **1999**;106:1049-51.

a Pettitt AR, Sherrington PD, Cawley JC. Role of poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of chronic lymphocytic leukemia cells by purine analogues. *Cancer Res* **2000**;60:4187-93.

b Pettitt AR, Cawley JC. Caspases influence the mode but not the extent of cell death induced by purine analogues in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* **2000**;109: 800-804.

Pettitt AR. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* **2003**;121:692-702.

Piro LD, Carrera CJ, Carson DA, Beutler E. Lasting remissions in hairy-cell leukemia induced by a single infusion of 2-chlorodeoxyadenosine. *N Engl J Med* **1990**;322:1117-21.

Plunkett W, Gandhi V. Nucleoside analogs: cellular pharmacology, mechanisms of action, and strategies for combination therapy. In: Cheson BD, Keating MJ and Plunkett W (eds.), *Nucleoside analogs in cancer therapy*, pp. 1-35. New York: Marcel Dekker, **1997**.

Polla BS, Banzet N, Dall'Ava J, Arrigo AP, Vignola AM. Les mitochondries, carrefour entre vie et mort cellulaire: rôle des protéines de stress et conséquences sur l'inflammation. *Médecine Sciences* **1998**;14:18-25.

Pott C, Hiddemann W. Purine analogs in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **1997**;11:25-8.

Rao VA, Plunkett W. Activation of a p53-mediated apoptotic pathway in quiescent lymphocytes after the inhibition of DNA repair by fludarabine. *Clin Cancer Res* **2003**;9:3204-12.

Reichard P. Regulation of deoxyribotide synthesis. *Biochemistry* **1987**;26:3245-8.

Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocytes CD73. *Immunol Rev* **1998**;161:95-109.

Richardson DS, Allen PD, Kelsey SM, Newland AC. Inhibition of FAS/FAS-ligand does not block chemotherapy-induced apoptosis in drug sensitive and resistant cells. *Adv Exp Med Biol* **1999**;457:259-66.

Robak T, Blonski JZ, Urbanska-Rys H, Blasinska-Morawiec M, Skotnicki AB. 2-Chlorodeoxyadenosine (Cladribine) in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia 55 years old and younger. *Leukemia* **1999**;13:518-23.

Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Konopka L, Ceglarek B, Dmoszynska A, Soroka-Wojtaszko M, Skotnicki AB, Nowak W, Dwilewicz-Trojaczek J, Tomaszewska A, Hellmann A, Lewandowski K, Kuliczowski K, Potoczek S, Zdziarska B, Hansz J, Kroll R, Komarnicki M, Holowiecki J, Grieb P. Cladribine with or without prednisone in the treatment of previously treated and untreated B-cell chronic lymphocytic leukemia-updated results of the multicentre study of 378 patients. *Br J Haematol* **2000**;108:357-68.

a Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Gora-Tybor J, Dwilewicz-Trojaczek J, Stella-Holowiecka B, Wolowiec D. Cladribine combined with cyclophosphamide is highly effective in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol J* **2002**;3:244-50.

b Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Gora-Tybor J, Hellmann A, Konopka L, Dmoszynska A, Dwilewicz-Trojaczek J, Wolowiec D. Re-treatment with cladribine-based regimens in relapsed patients with B-cell chronic

lymphocytic leukemia. Efficacy and toxicity in comparison with previous treatment. *Eur J Haematol* **2002**;69:27-36.

Robertson LE, Chubb S, Meyn RE, Story M, Ford R, Hittelman WN, Plunkett W. Induction of apoptotic cell death in chronic lymphocytic leukemia by 2-chloro-2'-deoxyadenosine and 9-beta-D-arabinosyl-2-fluoroadenine. *Blood* **1993**;81:143-50.

Rose JD, Parker WB, Someya H, Shaddix SC, Montgomery JA, Secrist JA. Enhancement of nucleoside cytotoxicity through nucleotide prodrugs. *J Med Chem* **2002**;45:4505-12.

Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* **2001**;194:1639-47.

Saltman D, Bansal NS, Ross FM, Ross JA, Turner G, Guy K. Establishment of a karyotypically normal B-chronic lymphocytic leukemia cell line; evidence of leukemic origin by immunoglobulin gene rearrangement. *Leukemia Res* **1990**;14:381-7.

Sampath D, Shi Z, Plunkett W. Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by the Chk1-Cdc25A pathway during the S-phase checkpoint activated by fludarabine: dysregulation by 7-hydroxystaurosporine. *Mol Pharmacol* **2002**;62:680-8.

Sampath D, Rao VA, Plunkett W. Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* **2003**;22:9063-74.

Sandoval A, Consoli U, Plunkett W. Fludarabine-mediated inhibition of nucleotide excision repair induces apoptosis in quiescent human lymphocytes. *Clin Cancer Res* **1996**;2:1731-41.

Sasvari-Szekely M, Spasokoukotskaja T, Szoke M, Csapo Z, Turi A, Szanto I, Eriksson S, Staub M. Activation of deoxycytidine kinase during inhibition of DNA synthesis by 2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine) in human lymphocytes. *Biochem Pharmacol* **1998**;56:1175-9.

Saven A, Piro LD. The newer purine analogs. Significant therapeutic advance in the management of lymphoid malignancies. *Cancer* **1993**;72:3470-83.

Saven A, Piro LD. 2-Chlorodeoxyadenosine: a newer purine analog active in the treatment of indolent lymphoid malignancies. *Ann Intern Med* **1994**;120: 784-91.

Schirmer M, Stegmann AP, Geisen F, Konwalinka G. Lack of cross-resistance with gemcitabine and cytarabine in cladribine-resistant HL60 cells with elevated 5'-nucleotidase activity. *Exp Hematol* **1998**;26:1223-8.

Scovassi AI, Diederich M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol* **2004**;15:1041-7.

Seto S, Carrera CJ, Kubota M, Wasson DB, Carson DA. Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *J Clin Invest* **1985**;75:377-83.

Seto S, Carrera CJ, Wasson DB, Carson DA. Inhibition of DNA repair by deoxyadenosine in resting human lymphocytes. *J Immunol* **1986**;136:2839-43.

Shao RG, Cao CX, Pommier Y. Abrogation of Chk1-mediated S/G2 checkpoint by UCN-01 enhances ara-C-induced cytotoxicity in human colon cancer cells. *Acta Pharmacol Sin* **2004**;25:756-62.

Shenkman G, Klaper R, Ness-Abramof R, Vishnitzky V, Zemer R, Ellis M, Lishner M, Manor Y, Yuckle MS, Shenkman L, Klein A. Induction of apoptosis by chlorodeoxyadenosine and dexamethasone in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **1997**;28:153-7.

- Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **1993**;73:1059-65.
- a Sherr CJ. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem Cells* **1994**;12:47-57.
- b Sherr CJ, Kato J, Quelle DE, Matsuoka M, Roussel MF. D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold Spring Harb Quant Biol* **1994**;59:11-9.
- c Sherr CJ. The ins and outs of Rb: coupling gene expression to the cell cycle clock. *Trends Cell Biol* **1994**;4:15-8.
- Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **2000**;60:3689-95.
- Shi L, Nishioka WK, Th'ng J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* **1994**;263:1143-5.
- Shi Z, Azuma A, Sampath D, Li YX, Huang P, Plunkett W. S-phase arrest by nucleoside analogues and abrogation of survival without cell cycle progression by 7-hydroxystaurosporine. *Cancer Res* **2001**;61:1065-72.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **1997**;91:325-34.
- Sjoberg AH, Wang L, Eriksson S. Substrate specificity of human recombinant mitochondrial deoxyguanosine kinase with cytostatic and antiviral purine and pyrimidine analogs. *Mol Pharmacol* **1998**;53:270-3.
- Smal C, Cardoen S, Bertrand L, Delacauw A, Ferrant A, Van den Berghe G, Van Den Neste E, Bontemps F. Activation of deoxycytidine kinase by protein kinase inhibitors and okadaic acid in leukemic cells. *Biochem Pharmacol* **2004**;68:95-103.
- Spasokoukotskaja T, Arner ES, Brosjo O, Gunven P, Juliusson G, Liliemark J, Eriksson S. Expression of deoxycytidine kinase and phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine in human normal and tumour cells and tissues. *Eur J Cancer* **1995**;31:202-8.
- Spasokoukotskaja T, Sasvari-Szekeli M, Keszler G, Albertioni F, Eriksson S, Staub M. Treatment of normal and malignant cells with nucleoside analogues and etoposide enhances deoxycytidine kinase activity. *Eur J Cancer* **1999**;35:1862-7.
- Stegmann AP, Honders MW, Kester MG, Landegent JE, Willemze R. Role of deoxycytidine kinase in an in vitro model for araC- and DAC-resistance: substrate-enzyme interactions with deoxycytidine, 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leukemia* **1993**;7:1005-11.
- Stegmann AP, Honders WH, Willemze R, Ruiz van Haperen VW, Landegent JE. Transfection of wild-type deoxycytidine kinase (dCK) cDNA into araC- and DAC-resistant rat leukemic cell line of clonal origin fully restores drug sensitivity. *Blood* **1995**;85:1188-94.
- Szondy Z. The 2-chlorodeoxyadenosine-induced cell death signalling pathway in human thymocytes is different from that induced by 2-chloroadenosine. *Biochem J* **1995**;311:585-8.
- Tanaka M, Yoshida S. Altered sensitivity to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate of DNA polymerase alpha from leukemic blasts of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* **1982**;42:649-53.
- Thomas A, El Rouby S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, Potmesil M, Newcomb EW. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* **1996**;12:1055-62.
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **1995**;267:1456-62.
- Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev* **1999**;13:152-7.

- Tseng WC, Derse D, Cheng YC, Brockman RW, Bennett LL Jr. In vitro biological activity of 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine and the biochemical actions of its triphosphate on DNA polymerases and ribonucleotide reductase from HeLa cells. *Mol Pharmacol* **1982**;21:474-7.
- Van Den Neste E, Martiat P, Mineur P, Delannoy A, Doyen C, Zenebergh A, Michaux JL, Ferrant A. 2-Chlorodeoxyadenosine with or without daunorubicin in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* **1998**;76:19-23.
- Van Den Neste E, Bontemps F, Delacauw A, Cardoen S, Louviaux I, Scheiff JM, Gillis JM, Leveugle P, Deneys V, Ferrant A, Van den Berghe G. Potentiation of antitumor effects of cyclophosphamide derivatives in B-chronic lymphocytic leukemia cells by 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Leukemia* **1999**;13:918-25.
- Van Den Neste E, Louviaux I, Michaux JL, Delannoy A, Michaux L, Sonet A, Bosly A, Doyen C, Mineur P, Andre M, Straetmans N, Coche E, Venet C, Duprez T, Ferrant A. Phase I/II study of 2-chloro-2'-deoxyadenosine with cyclophosphamide in patients with pretreated B cell chronic lymphocytic leukemia and indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* **2000**;14:1136-42.
- Van Den Neste E, Cardoen S, Husson B, Rosier J, Delacaw A, Ferrant A, Van den Berghe G, Bontemps F. 2-Chloro-2'-deoxyadenosine inhibits DNA repair synthesis and potentiates UVC cytotoxicity in chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes. *Leukemia* **2002**;16:36-43.
- Verhoef V, Sarup J, Fridland A. Identification of the mechanism of activation of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine in human lymphoid cells using mutants deficient in nucleoside kinases. *Cancer Res* **1981**;41:4478-83.
- Veuger MJ, Honders MW, Landegent JE, Willemze R, Barge RM. High incidence of alternatively spliced forms of deoxycytidine kinase in patients with resistant acute myeloid leukemia. *Blood* **2000**;96:1517-24.
- Villunger A, Egle A, Kos M, Hartmann BL, Geley S, Kofler R, Greil R. Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res* **1997**;57:3331-4.
- Wall NR, Beck FW, Al-Katib AM, Mohammad RM. Treatment-induced expression of anti-apoptotic proteins in WSU-CLL, a human chronic lymphocytic leukemia cell line. *J Drug Target* **2001**;9:329-39.
- Wan CW, Mak TW. Deoxycytidine kinase and cytosine nucleoside deaminase activities in synchronized cultures of normal rat kidney cells. *Cancer Res* **1978**;38:2768-72.
- Wang L, Karlsson A, Arner ES, Eriksson S. Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. Efficient phosphorylation of 2-chlorodeoxyadenosine. *J Biol Chem* **1993**;268:22847-52.
- Wang L, Hellman U, Eriksson S. Cloning and expression of human mitochondrial deoxyguanosine kinase cDNA. *FEBS Lett* **1996**;390:39-43.
- Wang J, Walsh K. Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science* **1996**;273:359-61.
- Warzocha K, Fabianowska-Majewska K, Blonski J, Krykowski E, Robak T. 2-Chlorodeoxyadenosine inhibits activity of adenosine deaminase and S-adenosylhomocysteine hydrolase in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Cancer* **1997**;33:170-3.
- Wattel E, Preudhomme C, Hecquet B, Vanrumbeke M, Quesnel B, Dervite I, Morel P, Fenaux P. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood* **1994**;84:3148-57.
- Wheaton S, Tallman MS, Hakimian D, Peterson L. Minimal residual disease may predict bone marrow relapse in patients with hairy cell leukemia treated with 2-chlorodeoxyadenosine. *Blood* **1996**;87:1556-60.

- Wiley JS, Jones SP, Sawyer WH, Paterson AR. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J Clin Invest* **1982**;69:479-89.
- Wilson DK, Rudolph FB, Quijcho FA. Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* **1991**;252:1278.
- Wilson PK, Szabados E, Mulligan SP, Christopherson RI. Comparative effects of cladribine, fludarabine and pentostatin on nucleotide metabolism in T- and B-cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* **1998**;30:833-42.
- Woo M, Hakem R, Soengas MS, Duncan GS, Shahinian A, Kagi D, Hakem A, McCurrach M, Khoo W, Kaufman SA, Senaldi G, Howard T, Lowe SW, Mak TW. Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* **1998**;12:806-19.
- Wright AM, Gati WP, Paterson AR. Enhancement of retention and cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine in cultured human leukemic lymphoblasts by nitrobenzylthioinosine, an inhibitor of equilibrative nucleoside transport. *Leukemia* **2000**;14:52-60.
- Wright AM, Paterson AR, Sowa B, Akabutu JJ, Grundy PE, Gati WP. Cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine and arabinosylcytosine in leukemic lymphoblasts from paediatric patients: significance of cellular nucleoside transporter content. *Br J Haematol* **2002**;116:528-37.
- Wyczechowska D, Fabianowska-Majewska K. The effects of cladribine and fludarabine on DNA methylation in K562 cells. *Biochem Pharmacol* **2003**;65:219-25.
- Yamauchi T, Nowak BJ, Keating MJ, Plunkett W. DNA repair initiated in chronic lymphocytic leukemia lymphocytes by 4-hydroperoxycyclophosphamide is inhibited by fludarabine and clofarabine. *Clin Cancer Res* **2001**;7:3580-9.
- Yang SW, Huang P, Plunkett W, Becker FF, Chan JYH. Dual mode of inhibition of purified DNA ligase I from human cells by 9-beta-D-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine. *J Biol Chem* **1992**;267:2345-9.
- Yao SL, McKenna KA, Sharkis SJ, Bedi A. Requirement of p34cdc2 kinase for apoptosis mediated by the Fas/APO-1 receptor and interleukin 1beta-converting enzyme-related proteases. *Cancer Res* **1996**;56:4551-5.
- Zaja F, Di Loreto C, Amoroso V, Salmaso F, Russo D, Silvestri F, Fanin R, Damiani D, Infanti L, Mariuzzi L, Beltrami CA, Baccarani M. BCL-2 immunohistochemical evaluation in B-cell chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia before treatment with fludarabine and 2-chloro-2'-deoxyadenosine. *Leuk Lymphoma* **1998**;28:567-72.
- Zak P, Chrobak L, Dedic K, Podzimec K. Monitoring minimal residual disease in patients with hairy cell leukemia in complete remission after treatment with 2-chlorodeoxyadenosine. *Vnitr Lek* **2000**;46:697-703.
- Zarkowska T, Mitnacht S. Differential phosphorylation of the retinoblastoma protein by G1/S cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* **1997**;272:12738-46.
- Zheng X, Johansson M, Karlsson A. Retroviral transduction of cancer cell lines with the gene encoding *Drosophila Melanogaster* multisubstrate deoxyribonucleoside kinase. *J Biol Chem* **2000**;275:39125-9.
- Zhu C, Johansson M, Permert J, Karlsson A. Enhanced cytotoxicity of nucleoside analogs by overexpression of mitochondrial deoxyguanosine kinase in cancer cell lines. *J Biol Chem* **1998**;273:14707-11.
- Zinzani PL, Tosi P, Visani G, Martinelli G, Farabegoli P, Buzzi M, Ottaviani E, Salvucci M, Bendandi M, Zaccaria A. Apoptosis induction with three nucleoside analogs on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Am J Hematol* **1994**;47:301-6.