

ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE-BIOLOGIE

Année 2006

N° attribué par la

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer
bronchopulmonaire non à petites cellules
pharmacomodulées par des substances originales naturelles
et synthétiques

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Cancérologie pré-clinique

Présentée

et soutenue publiquement par

Dimitri MOREAU

Le 23 octobre 2006, devant le jury ci-dessous

Président : M. MEFLAH Khaled, professeur Université de Nantes

Rapporteurs : M. CREPIN Michel, professeur INSERM U553, Paris

M. MULLER-FEUGA Arnaud, directeur de recherche IFREMER, Palavas-Les-Flots

Examineurs : M. BATAILLE François Régis, professeur Centre René Gauducheau, Nantes

M. JUGE Marcel, maître de conférences Université de Nantes

M. GASCAN Hugues, directeur de recherche INSERM U564, Angers

M. ROUSSAKIS Christos, *maître de conférences Université de Nantes*

Directeur de thèse : M. ROUSSAKIS Christos, maître de conférences Université de Nantes

« Le savant n'est pas l'homme qui fournit les vraies réponses,
c'est celui qui pose les vraies questions. »

Cl. Lévi-Strauss, *Le Cru et le cuit*, 1964.

Le Cancer

Dérivé du grec karkinos qui signifie crabe ou pinces, le mot latin cancer désigne le crabe ou l'écrevisse. C'est Hippocrate (460-377 avant J-C) qui, le premier, compare le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs du sein avec cet animal lorsqu'elles s'étendent à la peau. Le mot cancer prend à la fin du XV^{ème} siècle en français le sens de tumeur maligne (on trouve aussi cancre ou chancre). Ce rapprochement est justifié, par Galien (131-201), par Henri de Mondeville puis par Ambroise Paré (1509-1590), par l'aspect d'une tumeur qui présente une masse centrale d'où rayonnent des veines gonflées ou des ramifications, comme des pattes, par l'adhérence de la tumeur qui s'accroche aux tissus voisins comme avec des pinces. Au début du XIX^{ème} siècle, Récamier fera en outre remarquer que le cancer, comme le crabe ou l'écrevisse, reconstitue un fragment de chair arraché. L'adjectif cancéreux est utilisé dès le milieu du XVIII^{ème} siècle, avant de donner anticancéreux employé comme nom (1845). A partir de 1920, cancer est à l'origine de nombreux mots : cancérologie, cancérologue, cancérigène puis cancérogène, cancérophobie... qui deviennent plus courants que carcinologie (1846), carcinogène... pourtant plus satisfaisants parce que construits à partir de deux racines grecques dont la première subsiste dans carcinome. Cancer est souvent utilisé comme image (métaphore) pour qualifier un fléau social : le chômage, le racisme, la drogue, la

corruption, la pollution, les narcodollars ou encore la passion (« il y a dans nos sentiments une inclination passionnelle qui les rendra obsédants et, pour ainsi dire, cancéreux » écrit V. Jankélévitch qui évoque un instinct livré à lui-même qui prolifère indéfiniment). Comme la tumeur maligne, ces maux ont une origine interne à la société qu'ils frappent, donnent une impression de désordre, menacent l'équilibre et l'existence du milieu au sein duquel ils se développent. Cette signification devient paradoxale quand on reconnaît que l'origine de la majorité des cancers se trouve dans l'environnement, c'est-à-dire qu'ils sont provoqués par des facteurs externes.

Sommaire

I. GENERALITES

1

I.1 DEFINITION 1

I.2 LE CANCER RESULTE D'UNE PERTURBATION DE LA COMMUNICATION CELLULAIRE 1

I.2.1 *La carcinogenèse* 4

I.2.1.1. Les carcinogènes chimiques 4

I.2.1.2. Les virus à cancer 14

I.2.1.3. Les carcinogènes physiques 15

I.2.2 *Caractères généraux de la cellule cancéreuse* 18

I.2.2.1. Anomalies structurales et ultrastructurales 18

I.2.2.2. Anomalies génétiques. 20

I.2.2.3. Anomalies métaboliques 26

I.2.2.4. Comportement in vitro 27

I.3 LE CANCER EST LIE A UNE PERTURBATION DE LA DIVISION ET DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE 33

I.3.1 *Le cycle cellulaire* 35

I.3.1.1. Les phases du cycle cellulaire et leur régulation 37

I.3.1.2. Le contrôle du cycle cellulaire 38

I.3.1.3. Les points de restrictions 48

I.3.1.4. La transition G₀/G₁ 49

I.3.1.5. La phase G₁ 50

I.3.1.6. Le passage G₁/S 52

I.3.1.7. Le passage G₂/M 54

I.3.1.8. La mitose 56

I.3.2 *La mort cellulaire programmée* 60

I.3.2.1. Les différences entre nécrose et apoptose 62

I.3.2.2. Voie intrinsèque de l'apoptose 66

I.3.2.3. Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire 71

I.3.2.4. Contrôle de l'apoptose 74

I.3.2.5. Voie indépendante des caspases 76

I.3.2.6. L'apoptose nouvelle cible pour la thérapie anticancéreuse 77

II. LES CANCERS BRONCHIQUES

82

Sommaire

II.1	DEFINITION	82
II.1.1	<i>Le cancer bronchopulmonaire non à petites cellules (NSCLC)</i>	84
II.1.2	<i>Carcinome bronchopulmonaire à petites cellules (SCLC)</i>	85
II.2	EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS BRONCHIQUES (CB)	86
II.2.1	<i>Incidence et mortalité en France en 2000</i>	86
II.2.2	<i>Incidence et mortalité dans le monde</i>	86
II.2.3	<i>Variation des taux selon l'âge et le sexe</i>	87
II.3	ETIOLOGIE	88
II.3.1	<i>Tabagisme</i>	88
II.3.2	<i>Les facteurs professionnels</i>	90
II.3.2.1.	L'amiante	90
II.3.2.2.	Autres causes	91
II.3.3	<i>Les autres facteurs</i>	91
II.3.3.1.	Les pathologies pulmonaires préexistantes	91
II.3.3.2.	Les radiations ionisantes naturelles	92
II.3.3.3.	La pollution atmosphérique	92
II.3.3.4.	Les prédispositions génétiques	93
II.4	ANATOMIE PATHOLOGIQUE DES CANCERS BRONCHIQUES	93
II.4.1	<i>Les carcinomes épidermoïdes</i>	93
II.4.2	<i>Le cancer bronchique à petites cellules</i>	94
II.4.3	<i>L'adénocarcinome bronchique</i>	95
II.4.4	<i>L'épithélioma bronchique à grandes cellules</i>	96
II.5	LA CLASSIFICATION TNM	97
II.6	BIOLOGIE DU CANCER BRONCHOPULMONAIRE NON A PETITES CELLULES	100
II.6.1	<i>Les étapes de la carcinogenèse</i>	101
II.6.2	<i>Les altérations génétiques</i>	102
II.6.3	<i>Les gènes impliqués</i>	104
II.6.3.1.	La voie de signalisation RB/p16/p15/cycline D1	105
II.6.3.2.	La voie de signalisation p53/p14 ^{ARF} /MDM2	106
II.6.3.3.	Les gènes de la famille Bcl-2	108
II.6.3.4.	Le gène PTEN	108
II.6.3.5.	Le gène Ras	109
II.6.3.6.	Le gène RASSF1 (Ras association domain family protein 1)	109
II.6.3.7.	Le gène erbB1/EGF-R (Epidermal growth factor receptor)	110
II.6.3.8.	Le gène erbB2/Her-2	111
II.6.3.9.	Le gène FHIT (Fragile histidine triad)	112
II.6.3.10.	Activation de la télomérase	112
II.7	TRAITEMENTS	113
II.7.1	<i>La chirurgie</i>	113

Sommaire

II.7.2	<i>La radiothérapie</i>	114
II.7.3	<i>La chimiothérapie</i>	115
II.7.4	<i>Les résultats du traitement</i>	116
II.8	LES NOUVELLES STRATEGIES	117
II.8.1	<i>Les molécules naturelles</i>	117
II.8.1.1.	Le milieu marin nouvelle source de molécules originales	119
II.8.2	<i>Les cibles moléculaires du cancer bronchopulmonaire</i>	124
II.8.2.1.	L'oncogène ras	125
II.8.2.2.	Les oncogènes de la famille EGFR	125
II.8.2.3.	Le gène VEGF promoteur de l'angiogenèse	128
II.8.2.4.	Le facteur de transcription NF-κB	128
II.8.2.5.	Le gène suppresseur de tumeur p53	129
II.8.3	<i>Le Gène HEF1 (NEDD9) nouvelle cible moléculaire</i>	130
II.8.3.1.	Le gène et l'ARN messenger	131
II.8.3.2.	La protéine HEF1	132
II.8.3.3.	Les protéines de la famille Cas : structure et interactions	133
II.8.3.4.	Interaction : La protéine FAK	137
II.8.3.5.	Régulation/Maturation postranscriptionnelle de HEF1	140
II.8.3.6.	Fonctions de HEF1	142
III.	EVALUATION DU POTENTIEL ANTIPROLIFERATIF D'UN COMPOSE CHIMIQUE	101
III.1	LES MODELES CELLULAIRES	101
III.1.1	<i>La lignée NSCLC-N6</i>	101
III.1.1.1.	Origine	101
III.1.1.2.	Caractéristiques	102
III.1.2	<i>La lignée A549</i>	103
III.1.2.1.	Origine	103
III.1.2.2.	Caractéristiques	103
III.1.3	<i>Entretien des lignées</i>	104
III.1.4	<i>Synchronisation des cellules NSCLC-N6</i>	105
III.2	LES DIFFERENTS EXTRAITS ET MOLECULES CHIMIQUES ETUDIEES.	107
III.2.1	<i>Les microalgues</i>	107
III.2.1.1.	Les espèces	107
III.2.1.2.	Les conditions de culture : Culture discontinue	120
III.2.1.3.	Les conditions de culture : Culture continue de <i>Galdieria sulphuraria</i> .	123
III.2.2	<i>Les extractions de molécules organiques</i>	129
III.2.3	<i>Purification/identification des molécules</i>	130
III.2.4	<i>La molécule A190</i>	132
III.3	EVALUATION DU POTENTIEL ANTIPROLIFERATIF	133
III.3.1	<i>Détermination de l'inhibition de croissance (CI₅₀)</i>	133

Sommaire

III.3.2	<i>Etude de la cinétique de croissance cellulaire continue</i>	137
III.3.3	<i>Etude de la cinétique de croissance discontinue</i>	139
III.3.4	<i>Détection de l'apoptose</i>	140
III.3.4.1.	Morphologie cellulaire : marquage à l'acridine orange	140
III.3.4.2.	Fragmentation de l'ADN génomique	140
III.3.5	<i>Etude du cycle cellulaire</i>	142
IV.	ETUDE DES CIBLES MOLECULAIRES	144
IV.1	ETUDE DE LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION	144
IV.1.1	<i>Extraction d'ARN</i>	144
IV.1.2	<i>La PCR quantitative</i>	144
IV.2	ETUDE DE LA REGULATION DE LA TRADUCTION	151
IV.2.1	<i>Extraction protéique</i>	151
IV.2.2	<i>Analyse quantitative par Immunoprécipitation/Western blot</i>	152
IV.2.2.1.	Immunoprécipitation	155
IV.2.2.2.	Electrophorèse de protéine	156
IV.2.2.3.	Western Blot	157
V.	ETUDE <i>IN VIVO</i>	160
VI.	TESTS DE CYTOTOXICITE (CI₅₀) SUR LIGNEES CELLULAIRE	144
VI.1	SCREENING DES EXTRAITS MICROALGAUX	144
VI.1.1	<i>Extraction, purification et biosuivi</i>	146
VI.1.1.1.	Extrait apolaire d' <i>Odontella aurita</i>	146
VI.1.1.2.	L'extrait apolaire de <i>Galdieria sulphuraria</i>	152
VI.1.2	<i>Identification des principes actifs</i>	156
VI.1.2.1.	Le composé bioactif d' <i>Odontella aurita</i>	156
VI.1.2.2.	Les composés actifs de <i>Galdieria sulphuraria</i>	157
VI.2	A190 UNE NOUVELLE MOLECULE INNOVANTE	158
VII.	ETUDE DES CINETIQUES DE CROISSANCE	159
VII.1	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE LA FUCOXANTHINE	159
VII.2	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DU PEROXYERGOSTEROLE	163
VII.3	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE A190	164
VII.3.1	<i>Cinétique sur cellules non synchronisées</i>	165
VII.3.2	<i>Cinétique sur cellules synchronisées</i>	168
VIII.	ETUDE DE L'APOPTOSE	171
VIII.1	ACTIVITE PROAPOPTOTIQUE DE LA FUCOXANTHINE	171
VIII.2	INFLUENCE DE A190 SUR L'INDUCTION DE L'APOPTOSE	173

Sommaire

IX. ETUDE DE L'INFLUENCE D'A190 SUR LE CYCLE CELLULAIRE	176
X. INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PAR A190 SUR LES CIBLES GENOMIQUES HEF1 ET B2	182
X.1 EFFET SUR LA TRANSCRIPTION	182
X.2 EFFET SUR LA PRODUCTION DES DIFFERENTES FORMES DE LA PROTEINE HEF1	184
XI. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE <i>IN VIVO</i>	188
XII. DISCUSSION	180
XII.1 LE SCREENING DES MICROALGUES	180
XII.2 ISOLATION ET IDENTIFICATION DES MOLECULES BIOACTIVES	183
XII.2.1 <i>La fucoxanthine issue d'Odontella aurita</i>	183
XII.2.2 <i>Les molécules issues de Galdieria sulphuraria</i>	186
XII.3 A190 ET LES NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES	188
XIII. CONCLUSION, PERSPECTIVES	192
XIII.1 LE FUTUR DES MICROALGUES EN PHARMACOLOGIE	192
XIII.2 A190 REPOND AUX ATTENDES DES NOUVELLES THERAPIES CIBLEES	195

BIBLIOGRAPHIE

197

ANNEXES

243

Liste des figures

- Figure 1 :** Principales étapes de la progression des cellules vers un clone cancéreux (<http://www.baclesses.fr>). 4
- Figure 2 :** Schéma des principaux sites d'activation de l'ADN par les carcinogènes (<http://www.baclesses.fr>). 7
- Figure 3 :** Relation entre le tabagisme et le risque relatif de cancer du poumon (<http://www.baclesses.fr>). 12
- Figure 4 :** vue générale du cycle de vie de la cellule comportant quatre phases principales : G1, S, G2 et M (<http://virologie.free.fr>). 36
- Figure 5 :** Principaux complexes CDK/Cyclines et localisations de leur activité régulatrice au cours du cycle cellulaire. Les CDK4 et 6 associées à des cyclines D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par CDK2/cycline A qui intervient en G2. CDC2/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (<http://virologie.free.fr>). 39
- Figure 6 :** Régulation des complexes CDK/cyclines par phosphorylation/déphosphorylation au cours du cycle (<http://virologie.free.fr>). 45

Liste des figures

- Figure 7 :** Expression des cyclines au cours du cycle cellulaire dans la lignée HeLa (Viallard *et al.*, 2001). (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>). 48
- Figure 8 :** Représentation de la voie Ras/MAPKinase, qui permet, suite à la stimulation par des facteurs de croissance, de déclencher l'expression du gène codant la Cycline D (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>). 50
- Figure 9 :** Mode d'action du complexe Cycline D / Cdk4 sur la protéine Rb. Une fois activé, le complexe Cycline D / Cdk4 peut phosphoryler la protéine Rb (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>). 52
- Figure 10 :** Représentation schématique des conséquences de la détection de lésions à l'ADN au point de contrôle G1/S. Si l'ADN est endommagé, la transition G1-S est bloquée par les mécanismes de surveillance de l'état de l'ADN (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>). 54
- Figure 11 :** Représentation schématique des conséquences de la détection de lésions à l'ADN au point de contrôle G2/M. Si l'ADN est lésé, ou si la réplication n'est pas achevée, l'activation de plusieurs voies inhibitrices du

Liste des figures

- complexe CDK1/cycline B permet d'empêcher l'entrée en mitose (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>). 56
- Figure 12 :** Observation en microscopie à épifluorescence des différentes phases de la mitose. Le réseau de microtubules est coloré par un anticorps anti-tubulines marqué à la FITC. La chromatine et les chromosomes sont traités par un colorant spécifique qui fluoresce en rouge. Les cellules sont fixées par l'alcool, les limites cellulaires (membrane) ne sont plus visibles. 59
- Figure 13 :** Représentation schématique des différences entre apoptose et nécrose (<http://www.humpath.com>). 65
- Figure 14 :** Structure cristallinienne de la pro-caspase 7 (à gauche) et de sa forme active (à droite) (Wu *et al.*, 2001). 67
- Figure 15 :** Incidence et mortalité du cancer du poumon estimées par âge et par sexe pour l'année 2000 en France (Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000, Institut de veille sanitaire). 88
- Figure 16 :** Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse pulmonaire (Yokota, 2000). 101
- Figure 17 :** Localisation du gène HEF1 sur le chromosome 6. 131

Liste des figures

- Figure 18** : Schéma du positionnement des différents exons sur le gène HEF1. 132
- Figure 19** : Schéma des domaines conservés des protéines Cas (O'Neill *et al.*, 2000). (1) domaine Src homology 3 (SH3) qui interagit avec des protéines contenant des motifs poly-proline (PxxP) ; (2) une région contenant un grand nombre de tyrosines qui une fois phosphorylées recruteront une protéine contenant un domaine SH2 ; (3) région riche en sérine ; (4) partie C-terminale qui peut être homo ou hétérodimerisé (Law *et al.*, 1999). 134
- Figure 20** : Représentation schématique des interactions protéiques impliquant les protéines Cas au niveau des sites focaux d'adhésion (O'Neill *et al.*, 2000). 136
- Figure 21** : Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leur domaine SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 et 3*). Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines ou des facteurs de croissance et les autres protéines (Cornillon *et al.*, 2003). 139
- Figure 22** : Modifications postranscriptionnelles de la protéines p105^{HEF1}, intervenant au cours de la mitose et de l'apoptose, et produisant différentes isoformes. Le

Liste des figures

- schéma indique la présence des domaines, SH3 (Src Homology 3), SD (substrate domain) qui inclut des résidus tyrosine dont la phosphorylation régule les interactions avec les protéines SH2, SRR qui est une région riche en sérine et HLH contenue dans la région très conservé C-terminale (O'Neill & Golemis, 2001). 141
- Figure 23** : Détails des différentes étapes d'études d'un principe actif permettant de définir et de valider son potentiel anticancéreux. 101
- Figure 24** : A gauche, observation du développement d'une tumeur après xénogreffe de cellule de la lignée NSCLC-N6 chez une souris *nude*. A droite, observation microscopique (x200) de la lignée en croissance, dans son milieu de culture, fixée sur support solide. 103
- Figure 25** : Observation microscopique (x200) de la lignée A549 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide. 104
- Figure 26** : Arbre phylogénique des algues, et position des différentes espèces étudiées, d'après "Classification phylogénétique du vivant" par G. Lecointre & H. Le Guyader. Belin. 2001. 110

Liste des figures

- Figure 27** : Observation microscopique de la microalgue *Odontella aurita* (x400). 111
- Figure 28 : Observation microscopique de la microalgue *Porphyridium purpureum*, anciennement *cruentum* (<http://www.bio.utexas.edu>). 113
- Figure 29** : Observation microscopique de la microalgue *Rhodella violacea* (<http://www.bio.utexas.edu>) 113
- Figure 30** : Observation microscopique (1) et dans le milieu (2a-e) de la microalgue *Galdieria sulphuraria*. 115
- Figure 31** : Observation microscopique de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://www.bio.utexas.edu>) 116
- Figure 32** : Observation microscopique de la microalgue *Isochrysis affinis galbana* (<http://www.bio.utexas.edu>). 117
- Figure 33** : Observation microscopique de la microalgue *Rhodomonas salina* (<http://microscope.mbl.edu>). 118
- Figure 34** : Observation microscopique de la microalgue *Tetraselmis suecica* (<http://microscope.mbl.edu>). 119
- Figure 35** : Observation microscopique de la microalgue *Heterocapsa triquetra* (www.io-warnemuende.de). 120
- Figure 36** : Culture des microalgues en condition batch, avec éclairage artificiel et bullage constant (à gauche en ballon de 10 l, à droite en scobalite de 300 l). Chaque culture est

Liste des figures

- monospécifique. Cette production a été réalisé au sein de l'IFREMER de Nantes en collaboration avec le laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues. 121
- Figure 37** : Courbe de croissance théorique des microalgues en culture discontinue. 1) phase de latence ; 2) phase de croissance exponentielle ; 3) phase de ralentissement ; 4) phase stationnaire ; 5) phase de déclin. 122
- Figure 38** : Représentation du photobioréacteur LAMP 2, vue face avant et arrière, profil gauche et droit (A. Muller-Feuga). 126
- Figure 39** : Colonne de chromatographie et différentes fractions obtenues. La colonne est réalisée ici à partir d'un extrait dichlorométhane de microalgue. 132
- Figure 40** : Structure chimique de A190 (PM : 344,86) 133
- Figure 41** : Principe du test de détermination de la CI 50. Le premier puits de test recevra donc le composé dissous dans du milieu de culture à une concentration 6X par rapport à celle effectivement testée. 135
- Figure 42** : Organisation d'une plaque 96 puits pour le test de cinétique de croissance. 138
- Figure 43** : Principe de la PCR temps réel avec Technologie Sybr® green, le fluorochrome vient se fixer à la double

Liste des figures

chaîne d'ADN et peut alors émettre une fluorescence suite à une excitation (www.cgmh.org.tw). 146

Figure 44 : Représentation schématique de l'organisation d'une plaque pour un test de PCR quantitative (Ech : échantillon, Ech ARN : témoin contrôle de contamination ADN = échantillon sans reverse transcription, cible : gène d'intérêt, ref : gène contrôle). On a mis en évidence ici les différents types de PCR réalisées : une gamme étalon en répliquât avec quatre dilutions des ADNc, des contrôles de contamination de l'eau utilisée pour la préparation des mix PCR, et les amplifications des gènes pour les différents échantillons accompagnés par des contrôles de contamination ADN des ARN utilisés pour la reverse transcription. On a donc une demi-plaque pour le gène d'intérêt étudié et une demi-plaque pour le gène contrôle permettant de pondérer les résultats lors de l'analyse. On voit alors que seul 9 échantillons peuvent être analysés sur une plaque 96 puits. 149

Figure 45 : Graphique de l'évolution de la fluorescence au cours des cycles de PCR en valeur logarithmique. Représentation de la ligne de base permettant de déterminer graphiquement la valeur de Ct. 150

Liste des figures

- Figure 46** : Graphique de la gamme étalon. Relation entre les valeurs de Ct et des valeurs arbitraires attribuées en fonction de la dilution des ADNc matrices. 151
- Figure 47** : Principe de l'immunoprécipitation. L'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est mise en présence de l'extrait protéique total. L'anticorps primaire reconnaît et se couple à la protéine. Une protéine A fixée à une bille d'agarose et ensuite ajoutée. Elle est immédiatement reconnue et fixée par l'anticorps. Le nouveau complexe ainsi alourdi peut être isolé du reste des protéines par centrifugation. 153
- Figure 48** : Représentation schématique du transfert de protéine sur membrane de nitrocellulose. 158
- Figure 49** : Xénogreffe sous cutané de tumeur humaine chez une souris nude. 161
- Figure 50** : Mesure du volume tumoral. Chaque mesure est réalisée par le même manipulateur à l'aide d'un pied à coulisse électronique. 162
- Figure 51** : Proportion des différentes fractions obtenues. 148
- Figure 52** : Chromatographie en couche mince des 15 fractions de chromatographie sous vide, détaillées ci

Liste des figures

- dessus (Tableau 14). Les fractions actives sont F3j et k (entourées en rouge). 150
- Figure 53 :** Observation microscopique du traitement des cellules NSCLC-N6 par F3j à 10µg/ml (a : cellules traitées, b : cellules témoins en croissance ; x100). 151
- Figure 54 :** Proportion de chaque fraction isolée, pour les deux types de cultures (a : culture batch, b : culture continue). 154
- Figure 55 :** Structure chimique de la fucoxanthine (C₄₂H₅₈O₆, PM : 658,92). 157
- Figure 56 :** Structure chimique de la molécule Gs batch F2a (Tableau 16). Cette molécule est un stéroïde nommé peroxyergostérol (C₂₉H₄₇O₃, P.M. 443,35). 157
- Figure 57 :** Structure chimique de la molécule Gs batch F2c (Tableau 16). Cette molécule est un stéroïde nommé ergostérol (C₂₉H₄₇O₁, P.M. 411,36). 158
- Figure 58 :** Observation microscopique du traitement des cellules NSCLC-N6 par A190 à 39,4µM pendant 72h (a : cellules traitées, b : cellule témoin en croissance ; x40). 159
- Figure 59 :** Cinétiques de croissance continues avec traitement par la fucoxanthine, réalisées sur les deux lignées cellulaires : NSCLC-N6 (a), A549 (b). 160

Liste des figures

- Figure 60** : Cinétiques de croissance discontinues avec traitement par la fucoxanthine, réalisées sur les deux lignées cellulaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b). 162
- Figure 61** : Cinétiques de croissance continues avec traitement par le peroxyergostérole, réalisées sur les deux lignées cellulaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b). 163
- Figure 62** : Cinétiques de croissance continues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b). 165
- Figure 63** : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b) 166
- Figure 64** : Cinétiques de croissance continues sur cellules synchronisées traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b) 168
- Figure 65** : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules synchronisées traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b) 170

Liste des figures

- Figure 66 :** Observation de cellules marquées à l'acridine orange. Comparaison de cellules témoins et de cellules traitées par la fucoxanthine à 15µg/ml (22,76µM). Sur lignée NSCLC-N6 (a, b) et sur A549 (c, d). 172
- Figure 67 :** Observation de la dégradation de l'ADN par induction de l'apoptose lors d'un traitement par la fucoxanthine à 10 et 15µg/ml (15,18 et 22, 76µM) sur NSCLC-N6 (à gauche) et sur A549 (à droite). 173
- Figure 68 :** Observation de cellules marquées à l'acridine orange. Comparaison de cellules témoins et de cellules traitées par A190 à 39,4µM. Sur le lignée NSCLC-N6 (a, b) et A549 (c, d). 174
- Figure 69 :** Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules NSCLC-N6 (non synchronisées) dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 48h à 92,03µM. 177
- Figure 70 :** Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules NSCLC-N6 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 72h à 92,03µM. 178

Liste des figures

- Figure 71** : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux.
Comparaison des proportions de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 48h à 92,03 μ M. 179
- Figure 72** : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux.
Comparaison des proportions de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 à 92,03 μ M. 180
- Figure 73** : Histogramme représentant l'évolution de la transcription du gène HEF1 chez les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par A190 à 39,4 μ M. 182
- Figure 74** : Histogramme représentant l'évolution de la transcription du gène B2 chez les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par A190 à 39,4 μ M. 183
- Figure 75** : Electrophorèse monodimensionnelle d'un extrait de protéine totale issue de cellules NSCLC-N6 en culture. Les protéines sont révélées par un réactif colorant le SimplyBlue™, SafeStain (Invitrogen™). 184
- Figure 76** : Isolation et détection des différentes formes de la protéine HEF1 par immunoprécipitation/western blot. Les formes p115^{HEF1}, p105^{HEF1} et p65^{HEF1} ont été isolées par l'anticorps Cas-L (H-70) reconnaissant la partie C-

Liste des figures

terminale, la forme p55^{HEF1} est elle isolée grâce à l'anticorps Cas-L (2G9) reconnaissant la partie N-terminale de la protéine. La taille des différentes formes est ici révélée par le kaleidoscopeTM (Précision plus proteinTM Standards, Bio-RadTM), elle est exprimée en kiloDalton.

185

Figure 77 : Révélation de la quantité de p65^{HEF1} chez des cellules NSCLC-N6 témoins (à gauche) et des cellules traitées par A190 à 39,4μM (à droite) au cours du temps. Pour cette étude les extraits protéiques totaux ont tous été étalonnés à la même concentration. Un problème expérimental ne nous a pas permis de réaliser un contrôle avec l'anticorps anti-actin.

187

Figure 78 : Valeurs moyennes des volumes tumoraux (mm³ ± intervalle de confiance 95%) pour chacun des lots tout au long du traitement. Chaque lot contient 6 souris réparties aléatoirement. Le tableau indique les résultats du test ANOVA avec : F = statistique de Fisher, et p = seuil de signification.

189

Figure 79 : Graphique représentant les résultats des comparaisons multiples par le test de Tukey. Les axes mettent en relation les différents lots. Chaque point noir indique une différence statistiquement significative entre

Liste des figures

les deux lots comparés ($p < 0,05$), les blancs ne présentent aucune différence. Les résultats sont identiques pour les temps 10 à 24 jours.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de gènes impliqués dans différents cancers (oncogènes).	21
Tableau 2 : Exemple de gènes suppresseurs de tumeurs (GST) pouvant être mutés dans certains cas de cancer.	22
Tableau 3 : Modifications morphologiques et biochimiques observables au cours de la mort cellulaire par apoptose (Kerr <i>et al.</i> , 1972; Lazebnik <i>et al.</i> , 1993; Los <i>et al.</i> , 1999; Thornberry & Lazebnik, 1998).	61
Tableau 4 : Classification TNM des cancers bronchopulmonaires.	98
Tableau 5 : Classification des sous catégories TNM par stade.	100
Tableau 6 : Principales anomalies moléculaires observées dans les carcinomes non à petites cellules (Dy & Adjei, 2002; Rosell <i>et al.</i> , 2004b; Sozzi, 2001).	104
Tableau 7 : Exemples de molécules d'origine marine à potentiel anticancéreux en phases d'essais cliniques (Les médicaments de la mer, par J.M. Kornprobst).	120

Liste des tableaux

Tableau 8 : Récapitulatif des traitements anti-EGFR en cours d'essais clinique (Gridelli <i>et al.</i> , 2004).	127
Tableau 9 : Détail des différentes espèces utilisées pour le screening. Indication de la classe phylogénique, du nom de l'espèce, de la source de la souche et des conditions de cultures.	108
Tableau 10 : Composition des milieux de culture cités dans le Tableau 9, utilisés pour la culture en laboratoire (FW : eau douce, MW : eau de mer). Chaque milieu préparé est stérilisé par autoclavage avant utilisation.	123
Tableau 11 : Composition des différents gel de polyacrylamide utilisés pour l'électrophorèse de protéine.	156
Tableau 12 : Résultats des tests des différents extraits microalgaux sur les deux lignées cellulaires. Le tableau récapitule les différentes CI_{50} (en $\mu\text{g/ml}$) évaluées pour les extraits éthanol, dichlorométhane et aqueux de chaque espèce de microalgue (les extraits ne présentant pas d'activité sont identifiés par un tiret). Chaque test a été répété 2 à 5 fois.	144
Tableau 13 : Résultats de la première étape de purification de l'extrait dichlorométhane d' <i>O. aurita</i> (Tableau 12). Le tableau détail les solvants d'élution, la couleur et	

Liste des tableaux

l'activité cytotoxique sur NSCLC-N6 des différentes fractions obtenues par chromatographie sur colonne.	147
Tableau 14 : Détail du fractionnement de la fraction active F3 (Tableau 13) par chromatographie sous vide (). 15 fractions ont été obtenues et seulement deux présentent une activité sur NSCLC-N6.	149
Tableau 15 : Détail du fractionnement des l'extraits de <i>Galdieria sulphuraria</i> cultivée en batch ou en continue et résultats des tests de cytotoxicité réalisés sur la lignée cellulaire NSCLC-N6.	153
Tableau 16 : Détail du fractionnement par HPLC de la fraction F2 issue de l'extrait de <i>Galdieria sulphuraria</i> cultivée en batch et résultats des tests de cytotoxicité réalisés sur les lignées cellulaires NSCLC-N6 et A549.	155

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine Triphosphate
CB	: Cancer Bronchique
CDC	: Cycle de division cellulaire
CDK	: Cycline dependent de kinase
CI₅₀	: Concentration inhibitrice 50%
CIRC	: Centre Internationale de Recherche sur le Cancer
CKI	: Inhibiteur de CDK
DD	: Domaine de mort
DED	: Domaine de mort effecteur
DISC	: Complexe de signalisation inducteur de mort
ECM	: Matrice extra cellulaire
FAK	: Kinase d'adhésion focale
FTI	: Inhibiteur de farnesyl transférase
GST	: Gène suppresseur de tumeur
IAP	: Protéine inhibitrice de l'apoptose
JNK	: Jun N-terminal protein kinase
MDR	: Multidrug résistance
NSCLC	: Cancer bronchopulmonaire non à petites cellules
ODC	: Ornithine décarboxylase

Liste des abréviations

ODN : Oligodésoxynucléotide

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PTPC : Complexe de pore à perméabilité transitoire

REG : Réticulum endoplasmique granuleux

REL : Réticulum endoplasmique lisse

SCLC : Cancer bronchopulmonaire petites cellules

SH2/3 : Src homology regions 2 ou 3

SIMP : Protéine mitochondriale inter-membranaire soluble

SSH : Hybridation soustractive suppressive

TKI : Inhibiteur de tyrosine kinase

TNF : Tumor necrosis factor

Avant-propos

Avant-propos

Maladie encore rare au début du 20^{ème} siècle, le cancer du poumon est à l'origine de plus de 6 % des décès en France actuellement. Il y occupe le premier rang des décès par cancer alors que la France est considérée comme un pays à risque moyen parmi les pays occidentaux. Le cancer du poumon représente également la première cause de mortalité par cancer au niveau mondial, avec plus d'un million de décès dans le monde. Pour la mortalité comme pour l'incidence, la part masculine reste prédominante dans la plupart des pays du monde (80 % à 85 % des cas ou des décès). La découverte de nouveaux traitements anticancéreux toujours plus efficaces et spécifiques, est donc aujourd'hui primordiale.

La validation de la capacité d'une molécule à pouvoir inhiber la prolifération cancéreuse, passe par plusieurs étapes de tests commençant par la mise en évidence d'une activité au niveau cellulaire. Différentes techniques organisées selon une méthodologie très précise, permettent ensuite de définir les mécanismes d'action et de déterminer les cibles génétiques. Une des stratégies utilisées pour la découverte de nouveaux composés antiprolifératifs, passe par une investigation du potentiel bioactif d'un grand nombre de composés chimiques (le screening) sur lignées cellulaires cancéreuses, ici NSCLC-N6 (Roussakis *et al.*, 1991) et A549 (Foster *et al.*, 1998; Giard *et al.*, 1973). Ces composés peuvent avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse ou aux biotechnologie. Nous avons étudiés lors de cette thèse :

Des extraits d'origine naturelle réalisés à partir de microalgues. 10 espèces différentes issues de 7 classes phylogénétiques ont été étudiées. Les résultats des premiers tests d'activité ont permis de sélectionner plusieurs extraits pour mener une étude chimique approfondie visant à isoler et identifier les principes actifs (Moreau *et al.*, 2006).

Avant-propos

Une molécule issue de la chimie de synthèse (A190). Cette molécule est une triazine sélectionnée, parmi près de 200 analogues, grâce à des tests *in vitro*

L'activité très spécifique engendrée par un composé doit aujourd'hui viser à cibler spécifiquement les mécanismes de prolifération des cellules cancéreuses. Il nous faut donc découvrir des principes actifs capables de pharmacomoduler des gènes indispensables à la survie et à la croissance de la cellule cancéreuse. C'est pourquoi les recherches menées ici visent à décrire les mécanismes génomiques impliqués dans l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses. La mise en évidence de l'action d'une molécule au niveau génomique passe par l'étude du transcriptome et du protéome.

La découverte et la sélection de nouvelles cibles génomiques passe donc tout d'abord par la comparaison des pools ARN de cellules traitées et de cellules témoins. Il est ainsi possible de mettre en évidence une variation de l'expression génique, quelle soit positive ou négative. La compréhension de l'intérêt de la modulation d'une cible, passe alors par l'étude de son implication dans le cycle cellulaire, et par l'analyse la plus détaillée possible de sa modulation. Différentes techniques de biologie moléculaire entre alors en jeu successivement pour sélectionner un gène puis étudier sa régulation au niveau de la transcription puis de la traduction. C'est ainsi qu'au cours de différents travaux au sein du laboratoire deux cibles particulières ont pu être identifiées par RF-Differential display : le gène HEF1 et l'ARN non traduit B2 codé par une région intronique d'HEF1 (Jacquot *et al.*, 2004). Au cours de cette thèse nous avons suivi l'implication de la

Avant-propos

molécule A190 dans la modulation de ces gènes et nous avons tenter de comprendre leurs implications au niveau du cycle cellulaire (Moreau *et al.*, 2006 (submitted)). Le potentiel antitumoral de la molécule A190 a enfin été étudié au cours d'une expérimentation sur modèle animal.

Généralités

I. GENERALITES

I.1 DEFINITION

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone, la cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment et de pouvoir former des métastases.

Le cancer est un terme général pour n'importe quelle maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Les nouvelles cellules résultantes peuvent former une tumeur maligne (un *néoplasme*) ou se propager à travers le corps et former des métastases.

I.2 LE CANCER RESULTE D'UNE PERTURBATION DE LA COMMUNICATION CELLULAIRE

L'individu est constitué "d'unités cellulaires" morphologiquement individualisées, mais intégrées dans un ensemble "pluricellulaire" dynamique : l'organisme. Ce dernier, résultat de l'agencement de cellules en tissus, de tissus en organes, d'organes en systèmes, présente de nombreuses relations avec son environnement. L'organisme est un système ouvert qui réagit via des réactions complexes mais coordonnées, afin de se maintenir dans un "état

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

stationnaire" normal : l'état homéostatique. Toute cellule de l'organisme est à même de maintenir, adapter, renouveler, supprimer, de manière programmée, tout ou partie de ses constituants tant structuraux que fonctionnels, ceci dans le but de réguler et de coordonner ses métabolismes et métabolites, en les adaptant à ses besoins comme à ceux de l'individu.

La capacité de se diviser, de se spécialiser mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chacune des cellules qui composent l'organisme humain. Le déclenchement et l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'entrée dans un processus de différenciation ou dans un programme de mort cellulaire (apoptose) résultent de l'intégration au niveau cellulaire de multiples signaux, les uns positifs, les autres négatifs. Au niveau tissulaire, l'équilibre entre ces diverses destinées cellulaires est sous le contrôle de multiples boucles de régulations enchevêtrées.

Mais ces systèmes de régulation permettant un maintien de l'homéostasie sont parfois, comme c'est le cas pour les cancers, déficients. En effet, suite à l'agression de facteurs de l'environnement tels que le tabac, les rayons ionisants (Hall & Angele, 1999), certains agents chimiques (Miller & Miller, 1975) ou physiques, certains virus, ou spontanément (Lindahl & Nyberg, 1972), le génome humain subit constamment des lésions qui sont réparées (Frosina, 2000) ou non. En effet, les systèmes de réparation sont parfois défectueux ou "débordés", la cellule conserve alors certaines altérations qui touchent

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

parfois les systèmes de régulation de la prolifération. Ne répondant plus correctement aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. La cellule s'engage alors dans un processus anarchique qui conduit, par accumulation successive d'anomalies génétiques, au développement d'une cellule cancéreuse.

La biologie moléculaire et la génétique ont permis d'établir que les altérations génétiques surviennent précisément sur les éléments de régulation de la différenciation, de la division et de la mort cellulaire.

L'apparition d'un cancer s'effectue selon un processus en plusieurs étapes au cours desquelles l'accumulation d'anomalies sur différents gènes, au fil des divisions cellulaires, confère un avantage sélectif au clone malin. Les cellules, toutes issues d'une première cellule mutée (clone), forment une tumeur. Celle-ci devient de plus en plus agressive pour son environnement et échappe progressivement à tout contrôle. Si bien que des questions demeurent

Il est désormais acquis que le cancer est dû à une grave perturbation de la communication cellulaire. Il se caractérise par une prolifération cellulaire anarchique et indéfinie d'un clone cellulaire, une perte de la différenciation et une absence de mort cellulaire. Cette prolifération conduit à la destruction du tissu originel, ainsi que des tissus environnants. Sans traitement, l'envahissement conduit à la mort de l'individu.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

I.2.1 La carcinogenèse

La carcinogenèse décrit tous les mécanismes et les facteurs impliqués dans la transformation de la cellule. Plusieurs types d'inducteurs et de nombreuses étapes sont en cause dans la cancérisation d'une cellule saine.

I.2.1.1. Les carcinogènes chimiques

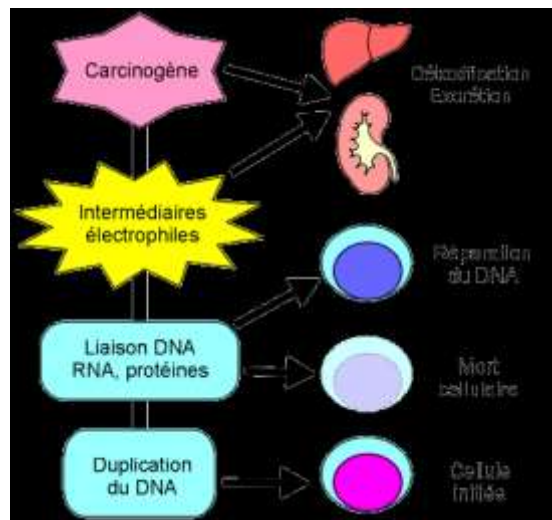


Figure 1 : Principales étapes de la progression des cellules vers un clone cancéreux (<http://www.baclesse.fr>).

I.2.1.1.1. L'initiation : première étape vers la cellule cancéreuse

L'initiation consiste en un processus irréversible et rapide par lequel une lésion définitive de l'ADN est produite, et sera transmise aux cellules filles (Figure 1). Les molécules produisant cette initiation sont appelées génotoxiques. La mutation produite est souvent le résultat

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

d'un adduit (addition d'un produit à la molécule d'ADN) entre le carcinogène chimique et un nucléotide de l'ADN (Colin Garner, 1998; Santella *et al.*, 2005) . C'est sous forme soluble que les composants électrophiles peuvent pénétrer dans les cellules et former des adduits sur l'ADN. En général, les mécanismes de réparation de l'ADN intervenant pour empêcher la transmission d'un matériel génétique altéré, pour que l'initiation survienne, une division cellulaire non contrôlée doit avoir lieu.

Les cellules initiées ne sont pas des cellules tumorales. Elles n'ont pas acquis une autonomie de croissance. On ne peut malgré tout les distinguer morphologiquement des autres cellules non initiées.

1.2.1.1.2. Diversité des structures chimiques

Les carcinogènes chimiques humains connus sont variés dans leur structure chimique et leur origine. Ils peuvent être issus des produits industriels ou être des produits naturels, et être présent dans la nourriture, l'air ou l'eau, mais ils peuvent aussi être endogènes quand il s'agit de certains produits du métabolisme (Wogan *et al.*, 2004).

Leur structure biochimique inclut :

Les hydrocarbures polycycliques aromatiques, formés par la combustion incomplète des carburants fossiles (pétrole, charbon), des aliments ou du tabac, (benzopyrène et dérivés),

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Les amines aromatiques, qui se retrouvent dans les colorants, l'industrie du caoutchouc, mais aussi la fumée de cigarette, les gaz d'échappement du diesel, les produits de pyrolyse de certains aliments (poissons grillés, huiles alimentaires),

Les nitrosamines, nitrosamides et nitrosurées, contaminants universels de la nourriture, des boissons, des cosmétiques, du tabac, l'aflatoxine B1 contaminant des cacahuètes, grains et céréales mal stockés, les fibres comme l'asbestose.

I.2.1.1.3. Les adduits

Plusieurs types d'adduits ont été décrits. Les alkylants ajoutent un radical méthyle ou éthyle sur un radical azote ou un oxygène sur l'une des 4 bases de l'ADN, ou sur le désoxyribose ou sur le radical phosphate. L'azote N7 de la guanine est le site privilégié de l'alkylation, mais c'est la liaison avec l'oxygène O6 qui est la plus importante pour la mutagenèse ou la cancérogenèse, car elle est impliquée dans l'appariement des bases ce qui engendre des erreurs de transcription (Figure 2).

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

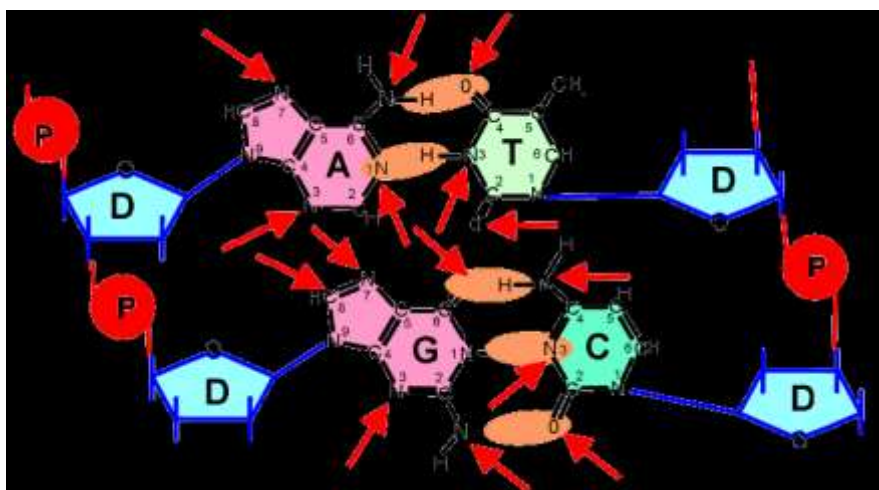


Figure 2 : Schéma des principaux sites d'activation de l'ADN par les carcinogènes (<http://www.baclessse.fr>).

Les amines aromatiques (notamment le N-2-acetylaminofluorène) ou le benzopyrène, après activation époxydique, se lient avec le carbone C8 des guanines. L'adduit, par sa masse, ne peut se glisser dans l'hélice de l'ADN, et entraîne une distorsion dans la structure hélicoïdale de l'ADN, perturbant gravement sa transcription.

D'autres types d'adduits ont été définis et étudiés : malgré leur diversité, il semble exister une homogénéité pour les adduits provoqués par le même type de structure chimique, permettant une reconnaissance du carcinogène.

Les méthodes récentes d'étude (par vecteurs nucléaires, mutagenèse ciblée, mutants, transfection de mutants, etc.) permettent de définir exactement la mutation induite par les adduits. La propriété commune à tous les types de molécules initiatrices est la présence de formes réactives dites électrophiles. Ces sites (électrons déficients) se lient

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

avec des sites riches en électrons ou nucléophiles rencontrés au niveau des protéines et de l'ADN, pour former des liaisons covalentes ou adduits. Les sites réactifs sont les nucléotides, les liaisons phosphates de l'ADN ou la base elle-même (atome d'azote, atome d'oxygène, altération des ponts hydrogènes, Figure 2).

Une lésion au niveau de l'ADN va entraîner une mutation ayant une certaine spécificité pour l'agent : on décrit une atteinte fréquente de l'O6 de la guanine aboutissant à une mutation G-> T induite par les agents alkylants, une mutation base purique vers T induite par les hydrocarbures polycycliques, une double mutation CC-> TT par les radicaux oxydants (ou encore par les rayons UV).

Les agents chimiques inducteurs sont ainsi non seulement carcinogènes mais également mutagènes, ce qui va permettre de les dépister par des tests bactériens de mutagenèse.

1.2.1.1.4. Métabolisme des carcinogènes chimiques

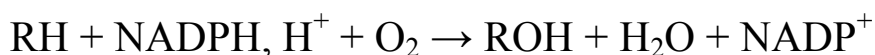
Les carcinogènes chimiques ne sont que rarement actifs par eux-mêmes à l'état natif. Les réactions métaboliques qui conduisent à la formation d'un métabolite génotoxique sont paradoxalement souvent des réactions de détoxification.

Enzymes de la phase I

Les enzymes de la phase I de détoxification catalysent la modification des groupements fonctionnels. Les monooxygénases des enzymes

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

microsomiales du cytochrome P-450 introduisent un atome d'oxygène sur le substrat biologique selon la formule :



Les principales réactions de la phase I, produites par ces monooxygénases du cytochrome P-450, sont les oxydations, des époxydations, (époxyde du chlorure de vinyle par exemple), les N-déalkylations, les déshydrogénations, et les α -hydroxylations des nitrosamines. D'autres monooxygénases ont été décrites dans les fractions microsomiales, notamment les enzymes à flavine. D'autres enzymes sont impliquées : les peroxydases (notamment celles des prostaglandines), et les réductases.

Enzymes de la phase II

Les réactions de conjugaison permettent le transport des différentes molécules peu solubles, par transferts de groupements variés (acétyle, sulfo, méthyle) de produits hydrophiles endogènes (acide glucuronique, glutathion, glycine). On aboutit à une molécule hydrosoluble pouvant être éliminée dans les urines ou la bile. Cependant, ces mécanismes aboutissent aussi à la formation de produits génotoxiques absorbables par les cellules cibles.

Parmi les enzymes, citons l'époxyde hydrolase, la glutathion S transférase, la sulfotransférase, l'UDP-glucuronyl-transférase, la méthyl-transférase, l'acétylase, etc..

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Les activités enzymatiques de la phase II varient suivant les tissus et les individus, expliquant les sensibilités variables rencontrées en clinique. La capacité d'acétylation est variable chez l'homme : on distingue des acétylateurs rapides (risque plus élevé de développer un cancer rectocolique) et des acétylateurs lents.

I.2.1.1.5. Les mécanismes de réparation de l'ADN

Après lésion de l'ADN, les enzymes de réparation vont être impliquées pour une transmission fidèle de l'ADN. Les mécanismes appelés conservatifs maintiennent l'intégrité de l'information génétique. Ils sont constitutifs et toujours présents dans la cellule, prêts à intervenir à tout instant. On décrit des insérases, des glycosylases et méthyltransférases qui réparent les lésions localisées à une base. En cas de lésion plus importante, le mécanisme d'excision et de resynthèse intervient, faisant appel aux protéines de reconnaissance uvrA, uvrB et uvrC (uvr pour ultraviolet rays), à l'endonucléase, à l'exonucléase, à l'ADN polymérase puis à une ligase.

Les mécanismes de réparation « fautifs » (système SOS) prennent le relais des systèmes de réparation conservatifs. En cas d'une agression massive, les systèmes conservatifs sont saturés, pouvant aboutir à la mort cellulaire. Les systèmes fautifs suppléent au prix d'un manque de fidélité dans la transmission du code génétique.

I.2.1.1.6. Variabilité individuelle

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

La variabilité individuelle est le reflet du polymorphisme des systèmes enzymatiques intervenant dans la détoxification des agents chimiques : métabolisation par les enzymes du cytochrome P450, dans la réparation du ADN, dans la synthèse des récepteurs membranaires et dans la cascade de transmission du signal. On définit des populations plus ou moins sensibles à la cancérisation : notion de génétique pharmacologique, permettant d'envisager dans le futur de proposer une prévention plus personnalisée.

De plus, il existe des variabilités importantes entre les espèces, rendant difficile les extrapolations des résultats sur animaux vers l'homme. Il existe une grande variabilité selon les lignées de souris, mais également d'un animal à l'autre. Le sexe, l'âge des animaux expérimentaux jouent également un rôle important.

1.2.1.1.7. Cas du tabac

La fumée de cigarette contient des produits à la fois initiateurs et promoteurs de tumeurs. Elle contient environ 4.000 substances différentes, dont de nombreux carcinogènes (Florin *et al.*, 1980) soit dans la phase volatile gazeuse (non stoppée par les filtres) : nitrosamines, nitrosodiméthylamine, nitrosopyrrolidine, soit dans la phase « solide » des particules (en principe stoppées par le filtre) : hydrocarbures aromatiques polycycliques, benzopyrène, benzo-

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

anthracène, et nitrosamines dérivés de la nicotine et des alcaloïdes proches.

Le tabac, en particulier la cigarette, est responsable d'environ 40% des morts par cancer dans notre pays. Pour les fumeurs de plus de 20 cigarettes par jour, le risque de cancer du poumon est multiplié par 20 (Figure 3).

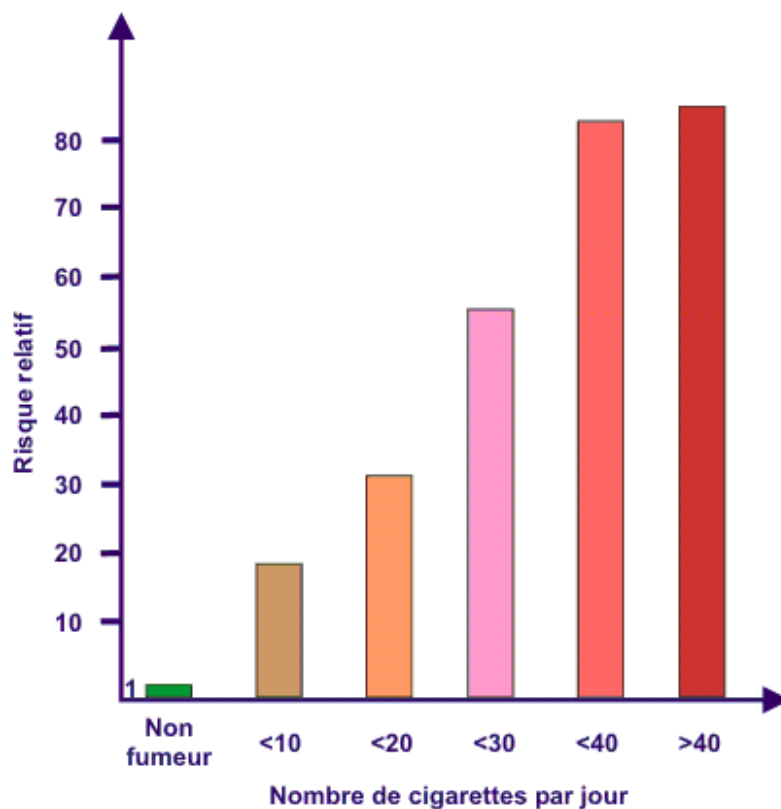


Figure 3 : Relation entre le tabagisme et le risque relatif de cancer du poumon (<http://www.baclesse.fr>).

On peut mettre en évidence une activité de mutagenèse dans les urines des fumeurs. Chez ceux-ci, on objective aussi des modifications de l'ADN des cellules lymphoïdes périphériques, sous forme d'échanges

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

chromatiniens, de micro-noyaux ou de la présence d'adduits. Ceux-ci intéressent surtout le groupement méthyle 7 du radical guanine et l'oxygène 6 de la méthyl-deoxy-guanosine. On retrouve ces adduits spécifiques du tabac, non seulement dans le poumon ou les voies aéro-digestives supérieures, mais également dans la paroi des artères ou dans le myocarde, expliquant les pathologies vasculaires associées au tabac. On détecte aussi un adduit commun entre l'ADN et l'hémoglobine, spécifique de la nicotine.

1.2.1.1.8. Effets du temps et de la dose d'exposition

Le risque relatif par cancer du poumon varie d'un facteur 188 entre fumeurs réguliers et non fumeurs. La durée de vie est plus grande de 8 ans chez les non fumeurs que chez les fumeurs. Il existe un effet dose évident entre ceux fumant entre 1-14 cigarettes par jour, 15-24 cigarettes et plus de 24 cigarettes par jour.

Les études récentes (Doll *et al.*, 2005) sur des médecins anglais fumeurs ayant arrêté de fumer avant 35 ans montrent une durée de vie à peu près identique à celle des non-fumeurs. Lorsque l'arrêt survient après 45 ans, la durée de vie s'améliore mais ne rejoint plus celle des non-fumeurs. Après 55 ans, il n'y a plus d'amélioration de la durée de vie. Ces données épidémiologiques confirment bien la notion d'effet/dose ou d'effet/durée d'exposition. La cessation du tabagisme est efficace.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

I.2.1.2. Les virus à cancer

La transmission d'un cancer par un virus est connue depuis 1908 pour la leucémie aviaire, découverte par Ellermann, et 1911 pour le sarcome aviaire du poulet décrit par Rous (Rous sarcoma). En 1930, Shope publia une étude analogue chez le lapin, et identifia un poxvirus. En 1950, l'étude de Gross sur les virus de leucémies murines fit mettre en place tout un programme de recherche sur la cancérologie virale au National Cancer Institut de Washington. Suivirent les découvertes en virologie, en technologie de l'ADN et de l'ARN, puis la découverte des oncogènes. Chez l'homme, seules des associations entre virus et cancer ont été décrites, mais une transmission directement du cancer par un virus n'est pas connue.

Deux types de virus ont été impliqués dans le déclenchement du cancer :

Les rétrovirus ou virus à ARN, à développement exclusivement cellulaire. Leur enzymologie particulière (transcriptase inverse) et leur lien avec les oncogènes en font un sujet d'étude intéressant en cancérologie. De nombreux rétrovirus tumorigènes possédant des gènes transformants v-onc, homologues de gènes cellulaires normaux c-onc, ont été identifiés. L'étude systématique des rétrovirus capables de transformer les cellules *in vitro* a permis d'identifier de nombreux oncogènes viraux correspondant chacun à la version un peu modifiée d'un (quelquefois plusieurs) oncogène(s) cellulaire(s). Leur origine

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

animale ainsi que l'emplacement chromosomique de leur homologue humain sont connus. Les oncogènes viraux proviennent de la capture de gènes de l'hôte vertébré dans lequel le virus s'est répliqué.

Les adénovirus ou virus à ADN, dont certains sont impliqués dans la genèse de certains cancers, comme le SV-40 et le virus du polyome, les papillomavirus, le virus EBV, le virus de l'hépatite B.

I.2.1.3. Les carcinogènes physiques

Deux types d'irradiation semblent favoriser le développement des cancers : les radiations ionisantes et les ultraviolets. Deux grands effets induits par les irradiations peuvent être observés : la mort cellulaire et la transformation maligne de la cellule non atteinte de façon létale, chacun de ces effets s'observant pour des doses et des circonstances variées.

I.2.1.3.1. Les radiations ionisantes

Conséquences des radiations

Les lésions dues aux radiations sont la conséquence d'une chaîne de réactions biochimiques, entraînées par l'absorption des photons. L'énergie du rayonnement est capable de rompre un certain nombre de liaisons chimiques. Elle provoque une radiolyse de l'eau, qui par déstabilisation des électrons entraîne la production de radicaux libres. Trois types de radicaux réactifs sont produits (c'est-à-dire des radicaux

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

ayant un déséquilibre d'électrons) : le radical $\text{OH}^\cdot$, le radical $\text{H}^\cdot$ et l'électron libre e^- , au milieu de molécules d'eau. Par la suite d'autres réactions interviennent produisant de l'hydrogène et du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée ou H_2O_2). Ces radicaux libres interagissent très rapidement avec les molécules voisines notamment les protéines, pour donner des lésions irréversibles.

Les études d'irradiation très sélective du noyau et du cytoplasme montrent que ce sont les lésions de l'ADN qui sont responsables de la mort cellulaire. Les atteintes (directes ou indirectes par l'intermédiaire des radicaux libres) du squelette de l'ADN aboutissent à des lésions simple brin (Hall & Angele, 1999). Cependant, ces lésions ne sont pas létales, car il existe de nombreux mécanismes de réparation, notamment des ligases qui permettent une « soudure » rapide des discontinuités simples.

La création d'un trou au niveau d'une base purique ou pyrimidique aboutit à une lésion plus lente à réparer, nécessitant l'utilisation de nombreux enzymes. L'atteinte d'une base représente un mécanisme important de production de mutations. Les mécanismes réparateurs sont très efficaces, puisque environ 80% des lésions de l'ADN sont réparées dans les 15 minutes qui suivent l'irradiation.

En fait, les lésions les plus importantes sont celles qui intéressent les interruptions double brin, qui peuvent survenir soit en relation avec une dose particulièrement importante soit sous l'effet de deux doses simultanées proches. Les photons de haute énergie produisent des

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

cassures beaucoup plus complexes sur plusieurs brins en même temps. Ces nombreuses lésions dépassent les possibilités de réparation de l'ADN.

Les réponses cellulaires à une irradiation

La dégradation du brin d'ADN entraîne la mise en oeuvre de gènes particuliers. On retrouve notamment les gènes RAD1 à RAD25. Le gène RAD3, code pour une hélicase spécifique. D'autres gènes (RAD7, RAD14, RAD16, RAD23) sont impliqués dans les processus d'excision de l'ADN perturbé, avant la réparation et dans le fonctionnement des points de contrôle. Il existe aussi de nombreux gènes autres de réparation de l'ADN après l'agression par les rayons : les gènes de réponse rapide (c-fos, c-myc, c-jun, NF-kb), les gènes du cycle cellulaire (cyclines, cdk), les facteurs de croissance et les cytokines (bFGF, PDGF, TNFa, IL-1), des enzymes cellulaires b-PKC. On décrit également des protéines plus spécifiques de l'irradiation (XIP : X-rays induced protein), qui migrent du cytoplasme vers le noyau après irradiation, évoquant un facteur de transcription spécifique à l'irradiation.

La connaissance de ces gènes pourrait avoir une importance thérapeutique. La modulation de l'expression de ces gènes, par des agents médicamenteux externes, pourrait affecter la réponse à la radiothérapie et augmenter la mort cellulaire (association de la

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

radiothérapie à la thérapie génique). De plus, le clonage et l'isolation des gènes pourraient prédire la radiosensibilité de la tumeur.

1.2.1.3.2. Le rayonnement solaire

Le soleil émet des radiations sur une très large échelle de longueur d'ondes, mais ce sont seulement les ultraviolets qui traversent en partie l'atmosphère et qui ont une énergie suffisante pour provoquer des cancers.

La réalité du rôle carcinogène du rayonnement solaire est démontré par une série d'arguments épidémiologiques très forts : les cancers épithéliaux de la peau apparaissent dans les parties du corps non protégés (face, tronc, jambes), l'incidence des tumeurs augmente lorsque l'on se rapproche de l'équateur, les cancers de la peau sont beaucoup moins fréquents dans les populations à peau foncée.

I.2.2 Caractères généraux de la cellule cancéreuse

I.2.2.1. Anomalies structurales et ultrastructurales

I.2.2.1.1. Structure

La cellule cancéreuse possède en règle générale un phénotype différent de sa cellule d'origine. On parle ainsi de cellule "transformée". Une cellule néoplasique tumorale possède un noyau souvent hypertrophié, irrégulier, pouvant présenter plusieurs nucléoles. Son caryotype est souvent anormal. Les cellules

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

cancéreuses possèdent fréquemment un cytoplasme basophile, contenant un réseau d'actine en général désorganisé. Les filaments intermédiaires présents dans les cellules transformées sont par contre souvent similaires à ceux présents dans la cellule normale homologue. Le plasmolemme est modifié, sa teneur en acides sialiques et en gangliosides est diminuée. La mobilité latérale de ses protéines intrinsèques est souvent augmentée. La quantité de fibronectines (glycoprotéines extrinsèques exoplasmiques) associées à la membrane plasmique est souvent diminuée.

1.2.2.1.2. Ultrastructure

Le nombre de mitochondries est souvent diminué et l'ultrastructure de ces dernières modifiée (quantité de crêtes réduite). Certaines enzymes mitochondriales sont altérées ou quantitativement réduites. C'est le cas de la F1-ATPase, des MAO, de la glutamate-deshydrogénase. Le génome mitochondrial est parfois anormal. Ainsi, dans certains types de leucémies la quantité d'ADN mitochondrial est amplifiée, et le génome se présente sous forme de chaînon(s) de molécules d'ADN circulaire. Le réticulum endoplasmique présente fréquemment des citernes anormales et le rapport REG/REL est souvent diminué. L'Appareil de Golgi peut être hypertrophié.

I.2.2.2. Anomalies génétiques.

I.2.2.2.1. Les oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs

Des gènes normaux, a posteriori dénommés proto-oncogènes, codent pour des protéines impliquées à différents niveaux dans la prolifération cellulaire. Certaines formes mutées de ces gènes, les oncogènes, codent pour des protéines de stimulation qualitativement et/ou quantitativement plus puissantes, lesquelles sont capables d'induire et/ou maintenir une prolifération cellulaire excessive.

A contrario, des gènes suppresseurs de tumeur (GST) codent pour des protéines normales, inhibitrices de la prolifération cellulaire, mais des mutations peuvent rendre ces dernières inactives, privant ainsi les cellules des "freins" homéostatiques capables de limiter leur prolifération.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Tableau 1 : Exemples de gènes impliqués dans différents cancers (oncogènes).

Gènes codant pour des facteurs de croissance (FC) ou pour leurs récepteurs (R).	
PDGF	"Platelet Derived Growth Factor", FC, gliomes malins (tumeurs cérébrales).
erb-B	R de l'EGF ("Epidermal Growth Factor"), glioblastome (tumeur cérébrale).
erb-B2 ou HER-2	R de FC, cancer du sein, de l'ovaire.
RET	R de FC, cancer de la thyroïde.
Gènes impliqués dans l'amplification de la transduction de messages de stimulation.	
Ki-ras	Cancer du poumon.
N-ras	Leucémies.
Gènes codant pour des facteurs de transcription activateurs de gènes de prolifération.	
C-myc	Leucémies, cancer du sein, de l'estomac, du poumon.
N-myc	Neuroblastome, glioblastome.
L-myc	Cancer du poumon.
Gènes codant pour d'autres facteurs.	
Bcl-2	Code pour une protéine qui, normalement, bloque le suicide cellulaire (apoptose). Lymphome B.
Bcl-1	(ou PRAD1). Code pour la cycline D1 (Cf. Cycle Cellulaire). Cancer du sein, de la tête et du cou.
MDM2	Code pour un antagoniste de la protéine codée par le gène p53 suppresseur de tumeur. Sarcomes, et nombreuses autres tumeurs.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Tableau 2 : Exemple de gènes suppresseurs de tumeurs (GST) pouvant être mutés dans certains cas de cancer.

Gènes codant pour des protéines cytoplasmiques.	
APC	Cancer du colon, de l'estomac.
DPC4	Code pour une molécule impliquée dans une voie de signalisation inhibant la prolifération cellulaire. Cancer du pancréas.
NF-I	Code pour une protéine inhibant la protéine Ras stimulant la prolifération cellulaire. Neurofibrome, pheochromocytome, leucémie myeloïde chronique.
NF-2	Meningiome, ependymome, schwannome.
Gènes codant pour des protéines nucléaires.	
MTS-I	Code pour la protéine p16 qui constitue un frein essentiel de l'horloge du cycle cellulaire. Divers cancers.
RB	Code pour la protéine RB qui constitue un frein essentiel du cycle cellulaire. Rétinoblastome, ostéosarcome, cancer de la vessie, cancer du poumon (petites cellules), cancer du sein.
p53	Code pour la protéine p53, qui peut interrompre la division cellulaire et déclencher l'apoptose (suicide) des cellules anormales. Divers cancers.
WTI	Cancer du rein (Tumeur de Wilms).
Gènes codant pour d'autres protéines.	
BRCA-1	Cancer du sein et de l'ovaire.
BRCA-2	Cancer du sein.
VHL	Cancer du rein.

1.2.2.2.2. Mécanismes d'activation des oncogènes

Intégration virale

Deux cas d'intégration du génome viral ont été identifiés : insertion de l'ADN viral au niveau d'un gène régulateur aboutissant à un gène chimère à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride ou insertion au hasard du virus qui possède ses propres séquences activatrices.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Mutation ponctuelle

Dans une séquence codante pour un proto-oncogène aboutissant à une modification fonctionnelle de l'oncoprotéine. Les mutations faux-sens entraînant la substitution d'un acide aminé par un autre, sont capables d'activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation substitutive de la protéine.

Délétion

Les délétions, qui aboutissent le plus souvent à une perte de fonction, peuvent parfois entraîner une activation ou une inhibition anormale de certains gènes, si elles touchent une région régulatrice.

Exemple : l'activation du proto-oncogène Erb B qui code pour le récepteur à l'EGF peut résulter de la délétion de la partie extra-membranaire et le domaine kinase intracytoplasmique est alors actif de façon constitutive.

Réarrangement structural

Des altérations chromosomiques (translocations, inversions...) peuvent avoir pour conséquence moléculaire la formation d'un gène hybride généré par la fusion de régions codantes entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Exemple : Les translocations t(2 ; 13)(q35 ; q14) et t(1 ; 13)(p36 ; q14) sont constamment observées dans les rhabdomyosarcomes alvéolaires.

Amplification génique

L'amplification correspond à une augmentation anormale du nombre de copies du gène dans la cellule, les copies surnuméraires se trouvant alors, soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de minichromosomes surnuméraires, les chromosomes double-minute (DM). Cette amplification entraîne généralement une augmentation du niveau de l'expression du gène. *Exemple* : Les proto-oncogènes *c-myc* et *N-myc* sont souvent amplifiés dans les tumeurs solides.

Dérégulation de l'expression, stabilisation d'un ARNm codant pour une oncoprotéine

Les proto-oncogènes, lors de translocations chromosomiques, peuvent être déconnectés de leur environnement moléculaire normal et placé sous le contrôle inapproprié d'autres séquences à l'origine d'une modification de leur expression.

I.2.2.2.3. Altérations des gènes suppresseurs de tumeurs

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction des gènes suppresseurs dans les tumeurs solides sont variées. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions, d'anomalies de

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

méthylation des promoteurs inhibant la transcription. La voie biologique contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et passant par les gènes suppresseurs p53, p16 et RB (cf. I.3.1), est la voie la plus fréquemment altérée dans les cancers. Par exemple, l'inactivation constitutionnelle du gène suppresseur RB est à l'origine des formes héréditaires de rétinoblastome et représente également un facteur de risque génétique pour le développement d'ostéosarcomes. Chez l'adulte, les mutations somatiques de RB sont observées dans les cancers du sein ou du poumon à petites cellules. Le mélanome malin familial peut résulter de mutations constitutionnelles de p16 ou de CDK et les mutations somatiques de p16 sont très fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides. Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène constituent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales. Les altérations constitutionnelles de BRCA1 sont à l'origine des formes héréditaires de cancers du sein et de l'ovaire. Les mutations somatiques de bax ont été identifiées dans des tumeurs du colon.

I.2.2.3. Anomalies métaboliques

L'anomalie la plus fréquente consiste en une capacité accrue des cellules cancéreuses à utiliser la voie glycolytique pour la production d'ATP. Bien que la capacité glycolytique des cellules cancéreuses soit en règle générale supérieure à celle des cellules normales, il n'est pas pour autant permis d'établir une relation de cause à effet entre l'accroissement de la glycolyse intracellulaire et l'état cellulaire cancéreux.

Les cellules cancéreuses ont une propension à sécréter des facteurs de croissance et des protéases. Elles produisent également davantage de polyamines que les cellules normales. Ces molécules sont indispensables à la prolifération cellulaire et dérivent de la décarboxylation de l'ornithine en présence d'ornithine décarboxylase (ODC) : l'activité ODC est accrue dans les cellules cancéreuses. Cette enzyme est codée par un proto-oncogène situé dans l'espèce humaine sur les chromosomes 2 et 7. Le gène de l'ODC est situé à proximité immédiate d'un autre proto-oncogène, le N-myc.

Les cellules malignes peuvent également acquérir une résistance à certaines drogues antitumorales (cytostatiques à noyau aromatique hydrophobique), par l'intermédiaire de protéines transmembranaires du plasmolème comme par exemple la P-gp (Permeability glycoprotein'). Cette protéine est responsable de ce que l'on appelle la

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

« MultiDrug Resistance » (MDR). Dans l'espèce humaine les 2 gènes MDR1 et MDR2 sont également situés sur le chromosome 7.

I.2.2.4. Comportement in vitro

I.2.2.4.1. Immortalité.

À la différence des cellules normales, les cellules cancéreuses peuvent proliférer et donc être cultivées indéfiniment. Cette immortalité serait due, d'une part à la défaillance de systèmes de contrôle du cycle cellulaire, d'autre part à la présence d'une enzyme spécifique aux cellules cancéreuses, la télomérase (cf. I.2.2.4.2).

I.2.2.4.2. Présence de télomérase

In vitro, la prolifération de cellules embryonnaires humaines normales n'excède pas en moyenne 50 divisions. Les cellules présentent des signes de sénescence puis normalement meurent. Au bout d'un certain nombre de cycles cellulaires, des cellules vont entrer en apoptose, mais d'autres vont résister, et devenir immortelles. Elles se diviseront alors à l'infini.

Dans une population cellulaire normale il existe donc un « compteur de cycles » dénombrant les divisions cellulaires. Ce « compte-tour » est situé au niveau des télomères des chromosomes. Ces fragments d'ADN vont au cours de chaque phase S (réplication) se raccourcir. Après un certain nombre de divisions (environ 50), les télomères

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

devenus trop courts vont envoyer un message induisant les cellules à entrer en sénescence. Si les cellules n'entrent pas en sénescence, un dernier raccourcissement des télomères déclenchera un chaos chromosomique (chromosomes fusionnés, disloqués...) fatal à la cellule normale.

Mais, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses restaurent à chaque tour de cycle leurs fragments d'ADN télomérique détruits. Cette « maintenance » des télomères est due à la présence d'une enzyme : la télomérase. Cette enzyme qui est présente dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses est par contre absente de la majorité des cellules normales. L'immortalité des cellules cancéreuses serait due en grande partie à la présence de cette enzyme. La télomérase constitue sans nul doute une cible de première importance pour ce qui est du traitement du cancer.

1.2.2.4.3. Réduction des besoins en facteurs de croissance

Les cellules cancéreuses sont moins dépendantes que les cellules normales de l'apport en facteur de croissance. Ceci peut au moins en partie s'expliquer par l'existence de perturbations au niveau des systèmes de signalisation intracellulaire. A l'état normal, nombre de proto-oncogènes codent pour des protéines normales participant à la transduction de messages d'origine extracellulaire capables de stimuler/inhiber la prolifération cellulaire (via des récepteurs

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

membranaires spécifiques). A l'état cancéreux, la mutation d'un proto-oncogène (oncogène) peut provoquer l'activation continue d'une voie métabolique de prolifération cellulaire. En cas de cancer, il existera ainsi des perturbations de la cascade des signaux cytoplasmiques, et/ou de l'activité de facteurs de transcription nucléaires.

Exemple de perturbation de la cascade des signaux cytoplasmiques : protéine Ras

Des protéines normales codées par les proto-oncogènes "ras" (gènes normaux) transmettent à l'état normal des signaux de stimulation, dans le sens : récepteur aux facteurs de croissance ; protéine Ras activée transférant une information dans le cytoplasme. Si les gènes ras sont mutés (oncogènes), les protéines synthétisées sous contrôle de ces oncogènes sont constamment activées, même en l'absence de facteur de croissance. Ces produits d'oncogènes que sont les protéines Ras hyperactives, sont présents dans 25 % des cas de tumeurs solides (épithélium respiratoire, digestif, cutané).

Exemple de perturbation de l'activité de facteurs de transcription nucléaires : protéines Myc

Les cellules normales produisent des facteurs de transcription Myc en cas de stimulation de leurs récepteurs de surface par des facteurs de croissance. Ces protéines activent des gènes de prolifération cellulaire. L'oncogène myc produira d'importantes quantités de protéine nucléaire Myc, et cela en l'absence de facteurs de croissance.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

De manière similaire, les gènes codant pour des récepteurs peuvent être aussi des oncogènes : dans ces conditions, des récepteurs anormaux émettront en continu des signaux de prolifération dans le cytoplasme. Les cellules de cancer du sein ou de l'ovaire possèdent ainsi fréquemment des récepteurs anormaux (Erb-B2 ou HER-2, Tableau 1).

I.2.2.4.4. Prolifération indépendante de l'ancrage, perte de l'inhibition de contact

Dans les tissus normaux, les cellules adhèrent les unes aux autres ainsi qu'à la matrice extracellulaire. C'est le cas des épithéliums, siège de la majorité des cancers. Des molécules assurant l'adhérence intercellulaire par l'intermédiaire de jonctions non communicantes, maintiennent les cellules à leur place. En cas de cancer, ces molécules sont absentes et/ou anormales. Dans de nombreux types de carcinomes, une molécule d'adhérence cellulaire nommée Cadherine-E, est partiellement ou totalement absente de la surface des cellules cancéreuses. On sait de plus que dans des lignées cellulaires exprimant peu la Cadherine-E, les cellules sont d'autant plus malignes que l'expression de cette protéine à la surface des cellules est faible ; inversement, le caractère invasif de lignées cellulaires cancéreuses peut être supprimé en transférant dans ces cellules le gène codant pour la Cadherine-E. Enfin, des mutations du gène codant pour cette

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

glycoprotéine d'adhérence (Cadherine-E) sont observées dans nombre de carcinomes humains.

L'adhérence à la matrice extracellulaire permet aux cellules normales de survivre et de proliférer. Les cellules normales ne peuvent se multiplier *in vitro* qu'en adhérant à une surface « solide ». Cet ancrage est en grande partie assuré par des glycoprotéines transmembranaires du plasmolème qui se lient à la matrice extracellulaire : les intégrines. Des cellules normales "libres", à qui on ne fournit pas de support solide, cessent ainsi de croître, parce que l'activité de protéines nucléaires commandant la croissance et la division cellulaire (ex: complexe cycline E-CDK2, Cf. "Cycle Cellulaire") diminue quand les cellules ne disposent pas d'ancrage. Dans ces conditions de "non-ancrage", de nombreux types cellulaires entrent en apoptose. Les cellules cancéreuses n'ont pas besoin d'être ancrées pour survivre et proliférer (Schwartz, 1997), leur complexe cycline E-CDK2 reste en effet continuellement actif, qu'elles soient ancrées ou non.

1.2.2.4.5. Rôle des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs de nature glycoprotéique qui se lient à des composants de la matrice extracellulaire. Leurs fonctions sont essentielles pour la migration cellulaire. Elles régulent des voies de signalisation qui contrôlent l'organisation du squelette et la survie cellulaire. Mais elles sont également impliquées dans l'activation de protéases qui dégradent les membranes basales des tissus. A ce titre,

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

elles peuvent intervenir directement sur les processus de dissémination et d'invasion tumorale. Ainsi, certaines intégrines sont surexprimées dans certains cancers, alors que d'autres sont diminuées dans d'autres cancers. Les intégrines peuvent également acquérir une affinité accrue vis-à-vis de leur ligand, ce qui facilite la migration de cellules tumorales (Hood & Chersesh, 2002). Dans le même temps en activant leurs voies de survie, les intégrines protègent de l'apoptose les cellules en migration.

1.2.2.4.6. Résistance à l'apoptose

A l'état normal, les cellules endommagées ou dérégulées possèdent un système de sauvegarde vis-à-vis de l'organisme, système capable de provoquer leur "suicide" ou apoptose. Ainsi, des lésions irréparables de l'ADN, l'activation d'un oncogène ou encore l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs déclenchent l'apoptose (cf. I.3.2), ce qui élimine un risque potentiel pour l'organisme. Les tumeurs apparaissant dans les tissus pourraient provenir des rares cellules génétiquement anormales ayant échappé à l'apoptose. L'inactivation de la protéine p53 (un acteur important du déclenchement de l'apoptose, Tableau 2 ; (Levine, 1997) de même que la production excessive de protéine Bcl-2 (qui bloque le suicide cellulaire, Tableau 1) confèrent aux cellules cancéreuses une résistance à l'apoptose. Des traitements restaurant l'apoptose des cellules cancéreuses devraient constituer dans l'avenir

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

de nouvelles armes thérapeutiques anticancéreuses (Alam, 2003; Au *et al.*, 1997; Makin & Dive, 2001).

I.3 LE CANCER EST LIE A UNE PERTURBATION DE LA DIVISION ET DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE

Des progrès considérables ont été accomplis dans l'identification et l'analyse des signaux qui stimulent ou au contraire freinent la division cellulaire. Parmi les gènes qui stimulent la division cellulaire figurent les gènes appelés "proto-oncogènes". Le premier oncogène humain a été identifié en 1981, il appartient à la famille ras, ce sont des protéines membranaires impliquées dans des voies de signalisation et dans la stimulation de la prolifération (Parada & Weinberg, 1983). En 20 ans, plusieurs centaines d'oncogènes ont été isolés et la liste n'est pas close. L'action des oncogènes est dominante : une mutation sur une seule copie du gène suffit à déclencher une division cellulaire anormale.

Ces gènes jouent un rôle majeur dans la synthèse des protéines qui transmettent à la cellule le signal signifiant qu'elle doit se diviser. Ces protéines sont présentes à la surface des membranes, dans le cytoplasme ou encore dans le noyau où elles contrôlent la transcription des gènes. Dans les conditions normales, elles sont activées de manière transitoire puis inactivées après avoir transmis le signal. Lorsque ces protéines sont activées de manière permanente,

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

elles transmettent, en dehors de toute régulation, le signal de division cellulaire.

Mais la stimulation incontrôlée de la prolifération ne suffit pas à rendre la cellule cancéreuse, il faut aussi que le système de régulation négative de la division cellulaire soit altéré. Ceci concerne l'autre ensemble de gène impliqué dans la cancérisation : les gènes suppresseurs de tumeurs (Harris *et al.*, 1969). Contrairement à la situation des oncogènes, ces gènes ont une action dite récessive, c'est à dire que les deux copies du gène doivent être mutées pour qu'il n'y ait plus la fonction de frein à la division cellulaire. Le plus connu, le gène p53, est muté dans 70% des cancers humains (Levine, 1997).

Le génie génétique et le programme de décryptage du génome ont accéléré l'identification des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. La description des acteurs de la régulation est certes utile mais on ne peut en rester là. Le plus important est de comprendre la fonction précise de ces gènes, de caractériser les protéines pour lesquelles ils codent et surtout, d'identifier les réseaux de régulation de ces gènes.

Les connaissances acquises permettent d'ores et déjà, de fonder sur des bases objectives des protocoles thérapeutiques qui visent à gêner les cellules tumorales dans leur développement. L'objectif aujourd'hui est donc de comprendre au mieux les mécanismes particuliers de prolifération des cellules cancéreuses pour permettre la découverte de nouveaux traitements plus spécifiques. L'efficacité de ces nouvelles

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

stratégies n'est pas encore toujours totalement établie, mais il est clair qu'elle dépendra de la connaissance des différents niveaux de régulation cellulaire et de leurs interactions.

I.3.1 Le cycle cellulaire

La division cellulaire a été décrite il y a 150 ans et fait l'objet de très nombreuses études en raison de son caractère fondamental. C'est un processus essentiel au développement embryonnaire mais également pendant toute la vie de l'organisme adulte. Un adulte humain à environ 100.000 milliards de cellules, toutes originaires d'une même cellule, la cellule œuf fertilisée. Tous les jours près d'un milliard de cellules doivent être renouvelées, ce qui représente 20 millions de divisions cellulaires par seconde. Ce processus extrêmement complexe en plusieurs phases (Figure 4), est régulé par un grand nombre de protéines intervenant transitoirement et dans un ordre définit (cf. I.3.1.1). Parfois des erreurs surviennent, pouvant favoriser la cancérogenèse. On comprend alors aisément l'importance de son étude, pour la compréhension de l'apparition et du développement des cancers.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

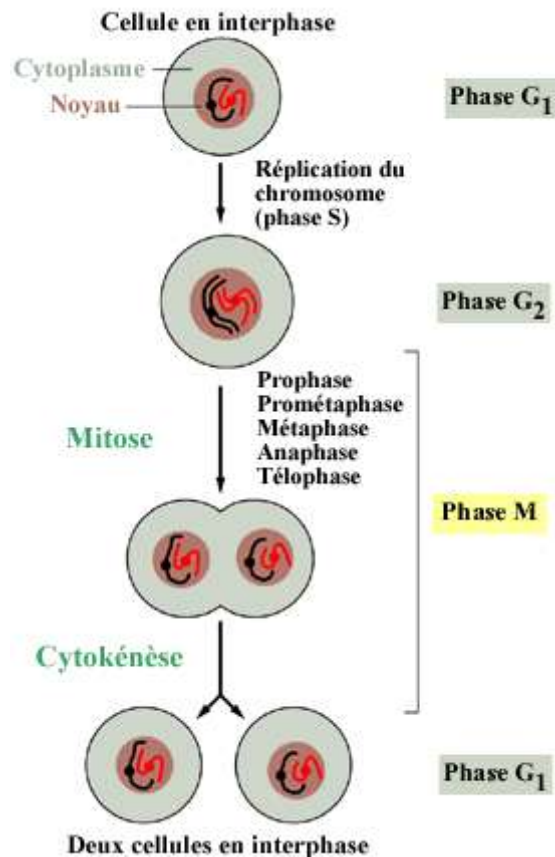


Figure 4 : vue générale du cycle de vie de la cellule comportant quatre phases principales : G₁, S, G₂ et M (<http://virologie.free.fr>).

Avant qu'une cellule puisse se diviser, il faut qu'elle grandisse jusqu'à une certaine taille, qu'elle duplique ses chromosomes, qu'elle sépare ses chromosomes avec une distribution exacte entre les 2 cellules filles. Ces mécanismes fondamentaux sont hautement conservés à travers l'évolution et opèrent de la même manière chez tous les organismes eucaryotes.

I.3.1.1. Les phases du cycle cellulaire et leur régulation

Lorsqu'elles ne se divisent pas, les cellules sont dites en phase de quiescence ou G0. C'est sous l'effet de signaux mitogènes (cf. I.3.1.2, Figure 5) que les cellules vont entrer dans un cycle de division. Le cycle est classiquement divisé en quatre phases : G1 (de « Gap », intervalle), S, G2 et M (Figure 4).

Durant la première phase (phase G1), la cellule croît et devient plus large. Il y a synthèse des protéines. Lorsqu'elle atteint une certaine taille, elle passe le point de restriction (cf. I.3.1.6), à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence de facteurs mitogènes. Elle entre alors dans la deuxième phase (phase S), dans laquelle débute la synthèse de l'ADN. La cellule duplique son matériel génétique (réplication de l'ADN). Durant la phase suivante (phase G2), la cellule contrôle que la réplication de l'ADN a bien été réalisée (réparation post-répllicative) et prépare la division cellulaire. La désorganisation de l'enveloppe nucléaire (par phosphorylation des lamines), la compaction des chromosomes (par phosphorylation des condensines et des histones), caractérisent le début de la phase M ; l'alignement des chromosomes dupliqués à la métaphase, la séparation des chromatides-sœurs (par dégradation de cohésines) à l'anaphase de la mitose, et enfin la cytokinèse, événement qui caractérise la fin de la mitose.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

A travers ce mécanisme, les deux cellules filles sont dotées des mêmes chromosomes que ceux de la cellule mère. Après la division, les cellules retournent en phase G1 et le cycle cellulaire est bouclé. La durée du cycle cellulaire varie entre les différents types de cellules (chez l'homme, il existe plus de 200 types cellulaires). Chez la plupart des cellules de mammifère, elle dure entre 10 et 30 heures. Les cellules en phase G1 ne poursuivent pas toujours le cycle cellulaire, elles peuvent quitter le cycle cellulaire et entrer en phase d'attente (phase G0).

I.3.1.2. Le contrôle du cycle cellulaire

Pour les organismes eucaryotes vivants, il est indispensable que les différentes phases du cycle cellulaire soient précisément coordonnées. Les phases doivent suivre un ordre correct, et une phase doit être terminée avant que la phase suivante ne démarre. Ces différentes étapes sont contrôlées par les complexes CDK/cyclines (cf. I.3.1.2.1, I.3.1.2.2). Les erreurs de coordination peuvent conduire à des altérations chromosomiques. Des chromosomes ou des parties de chromosomes peuvent être perdus, réarrangés ou distribués de manière inéquitable entre les deux cellules filles. C'est pourquoi de nombreux mécanismes de contrôle assurent une sorte de contrôle qualité à chaque étape (points de restrictions, cf. I.3.1.3) et bloquent le déroulement du cycle lorsqu'une anomalie est détectée. Les erreurs

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

commises par ces systèmes de vérification peuvent engendrer l'apparition d'une cellule cancéreuse.

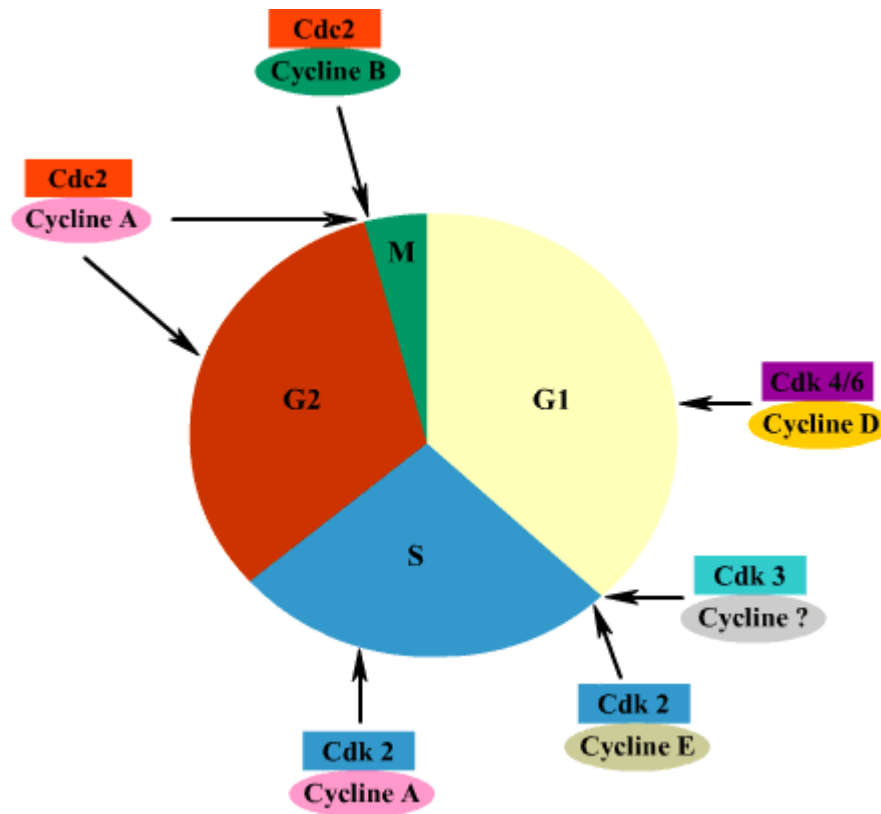


Figure 5 : Principaux complexes CDK/Cyclines et localisations de leur activité régulatrice au cours du cycle cellulaire. Les CDK4 et 6 associées à des cyclines D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par CDK2/cycline A qui intervient en G2. CDC2/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (<http://virologie.free.fr>).

1.3.1.2.1. Les CDK (Cyclin Dependant Kinase)

C'est Leland Hartwell qui, par des méthodes d'étude génétique sur *Saccharomyces cerevisiae*, identifia une centaine de gènes impliqués spécifiquement dans le contrôle du cycle cellulaire : ces gènes sont appelés gènes CDC (Cell Division Cycle). Un de ces gènes, appelé

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

CDC28, contrôle la première étape de progression vers la phase G_1 et fût pour cela appelé gène « start ». Paul Nurse découvrit chez la levure *Schizosacharomyces pombe* un gène équivalent à celui trouvé par Leland Hartwell, contrôlant la transition G_1/S , mais également la transition G_2/M . Il a montré ensuite que ce gène contrôle également d'autres phases du cycle cellulaire. En 1987, il découvre son équivalent humain, qu'il appelle CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1, ou $p34^{cdc2}$). Ce gène encode pour une protéine qui est membre de la famille des CDK.

Toutes les kinases ont dans leur extrémité NH2 terminale une séquence xGxPxxxxREx (où x représente n'importe quel acide aminé). Il s'agit d'une région conservée qui correspond au domaine de liaison aux cyclines (Ducommun *et al.*, 1991; Endicott *et al.*, 1994). Les CDK sont au nombre de huit.

CDK1 (ou $p34^{cdc2}$) est la première CDK décrite chez l'homme, elle est absente des cellules quiescentes. Dans les cellules qui prolifèrent, elle peut être détectée tout au long du cycle mitotique, mais la concentration de son ARN messenger varie au cours du cycle, avec un minimum en phase G_1 (Fisher & Morgan, 1994). L'activité enzymatique de CDK1 ne se manifeste que pendant une période très courte à la transition G_2/M , entraînant le déclenchement de celle-ci. L'initiation de la mitose est dirigée de façon temporelle et spatiale par une cascade de phosphorylation de protéines qui aboutit à l'activation du complexe cycline B1/CDK1 (Ohi & Gould, 1999). Durant la phase

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

S, CDK1 s'associe à la cycline B synthétisée. CDK1 peut aussi être activée par la cycline A avant l'activation par la cycline B.

CDK2 acquiert une activité kinase en association avec la cycline A ou E (Demetrick *et al.*, 1994; Pines & Hunter, 1990). L'activité kinase du complexe cycline E/CDK2 se manifeste aussi dès la phase G₁, atteint son maximum en début de phase S, puis disparaît (Demetrick *et al.*, 1994; Pines & Hunter, 1990). Cette kinase, en association avec la cycline E, est indispensable à la mise en route de la réplication de l'ADN (Tsai *et al.*, 1993). Durant la phase S, la cycline E est remplacée dans ce complexe par la cycline A (Lees *et al.*, 1992).

À la différence de la plupart des CDK connues, CDK4 n'a pas d'activité kinase sur les histones H1. Ses partenaires régulateurs sont les cyclines D (Matsushime *et al.*, 1992). Le complexe cycline D1/CDK4 devient actif comme kinase au milieu de la phase G₁, avec une activité maximale à la transition G₁/S, et reste détectable jusqu'à la mitose (Matsushime *et al.*, 1994). CDK4 pourrait être un régulateur spécifique de certains types de cellules.

CDK5 est retrouvée à des taux élevés dans les neurones et joue un rôle essentiel dans le métabolisme cérébral. CDK5 est particulière car elle n'est pas activée par une cycline et possède des activateurs qui lui sont propres (Sharma *et al.*, 1999).

CDK6 forme des complexes avec toutes les cyclines D. Elle a une activité kinase sur pRb. Après la stimulation des lymphocytes T par la

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

PHA, cette activité se manifeste dès le milieu de la phase G₁ (Meyerson & Harlow, 1994).

CDK7 phosphoryle CDK1, CDK2 et CDK4 respectivement sur les résidus thréonine (Thr) 161, 160 et 172, ce qui conditionne leur activation comme kinase des histones H1. Elle se lie à la cycline H et subit une phosphorylation sur la Thr 170 pour acquérir l'activité kinase (homologie avec les Thr 161 de CDK1, 160 de CDK2 et 172 de CDK4 toutes faisant l'objet de phosphorylations activatrices). Le complexe cycline H/CDK7 est dénommé CAK (CAK : CDK activating kinase). Ni l'expression de la protéine CDK7, ni son activité enzymatique ne varient au cours du cycle mitotique des cellules proliférantes, ce qui suggérerait un mécanisme particulier gouvernant son action sur les autres CDK (Darbon *et al.*, 1994). CDK8 est le partenaire CDK de la cycline C.

Quatre niveaux de régulation contribuent à l'activité transitoire des CDK

L'assemblage transitoire des complexes CDK/cyclines est lié à une durée de vie des cyclines généralement courte.

Des modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations et des déphosphorylations, conduisent à l'activation ou à l'inactivation des CDK.

Une association transitoire avec des inhibiteurs protéiques. Il en existe deux types, la famille Ink4, qui interfère avec la fixation de la cycline D, et la famille Cip/Kip, qui se fixe sur les complexes CDK/cyclines

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

et les inactives (Coqueret, 2003). Malgré cela, p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont nécessaires pour l'assemblage du complexe CDK4/cycline D et sa translocation dans le noyau. En revanche, ces protéines sont des inhibiteurs de CDK2/cycline E.

Les changements de localisation intracellulaire sont en général également régulés par phosphorylation déphosphorylation.

La liaison à une cycline est indispensable

Une CDK a une structure bilobaire (De Bondt *et al.*, 1993; Knighton *et al.*, 1991a; Knighton *et al.*, 1991b) et lie son substrat et l'ATP dans une partie située entre les deux lobes. Dans sa forme inactive monomérique, une CDK se lie à l'ATP dans une conformation qui rend impossible une attaque nucléophile par un substrat hydroxyle sur le pont β - γ phosphate de l'ATP. De plus, une partie conservée de la kinase (appelée boucle T), cache la fente catalytique et empêche la liaison aux substrats. L'activité des CDK est régulée de façon post-transcriptionnelle par leur liaison aux cyclines. Cette liaison engendre des changements conformationnels de la CDK permettant l'accès au site catalytique et rendant possible les phosphorylations activatrices et inhibitrices en ce qui concerne certaines CDK. Par exemple, en se liant à la kinase CDK2, la cycline A modifie l'orientation de l'ATP dans la fente catalytique et provoque un déplacement de la boucle T (Jeffrey *et al.*, 1995; Johnson & O'Reilly, 1996). Ces deux événements ont pour conséquence une neutralisation des deux facteurs principaux

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

qui gardent CDK2 dans une forme inactive. Les régions de la cycline A et de CDK2 qui interagissent entre elles, sont conservées parmi les autres membres des cyclines et des CDK.

La liaison à la cycline permet la phosphorylation (Figure 6)

La liaison à la cycline ne suffit pas pour activer une CDK. La liaison à une cycline fait qu'une CDK devient accessible à l'action du complexe CAK qui phosphoryle un résidu thréonine (Thr161 pour CDK1, 160 pour CDK2) au niveau de la boucle T (Marshall, 1994). La boucle T devient ainsi positionnée en situation C-terminale loin de la fente catalytique ce qui, dans l'exemple concernant CDK2 et la cycline A, stabilise le complexe cycline A/CDK2 (Jeffrey *et al.*, 1995).

Il existe en fait 2 niveaux de régulation par phosphorylation des complexes CDK/Cyclines : une phosphorylation inhibitrice ou activatrice (ou une déphosphorylation) directe sur les CDK, et une régulation indirecte via la phosphorylation inhibitrice ou activatrice des complexes régulateurs. En effet, la phosphorylation d'une CDK n'est pas forcément synonyme d'activation. Seule la phosphorylation de Thr (160 ou 161 selon la kinase) est activatrice. La phosphorylation de Thr14 et tyrosine (Tyr) 15 (qui s'effectue par des kinases telles que wee1 et/ou Myt1 ou Mik1 selon les espèces) inhibe la CDK. Pour être active, une CDK doit donc être déphosphorylée sur la Thr 14 et la Tyr

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

15 ; c'est le rôle de la phosphatase CDC25 (Dunphy & Kumagai, 1991; Sebastian *et al.*, 1993).

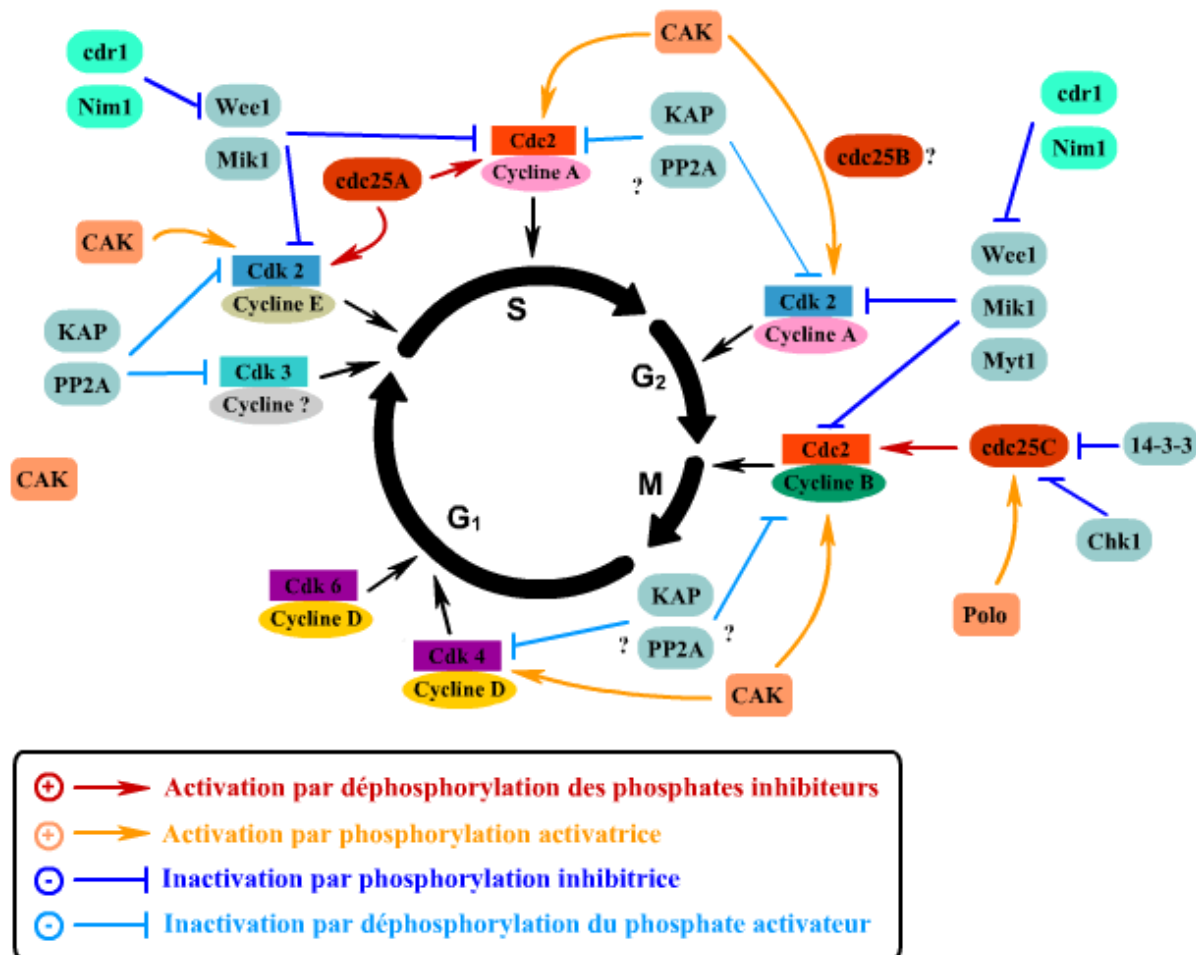


Figure 6 : Régulation des complexes CDK/cyclines par phosphorylation/déphosphorylation au cours du cycle (<http://virologie.free.fr>).

Régulation par les CKI (Cyclin Dependant Kinase Inhibitor)

Un troisième niveau de régulation des complexes CDK/Cyclines est apparu avec la découverte des inhibiteurs de CDK, les CKI. L'intervention des CKI permet de comprendre comment les signaux

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

extra- et intracellulaires régulent la progression du cycle cellulaire. D'autre part, le fait que les CKI soient, soit des suppresseurs de tumeurs soit régulée par ceux-ci, permet d'établir le lien entre le cycle et le développement des tumeurs. Les CKI exercent leur activité inhibitrice en s'associant avec les CDK ou le complexe CDK/Cycline. Elles peuvent bloquer l'engagement d'une phase mais peuvent également agir au cours d'une phase du cycle cellulaire.

Les CKI sont réparties en deux groupes :

La famille des Ink4 (Inhibitor of CDK4) qui comprend $p16^{\text{INK4a/MTS1/CDKN2/CDK4I}}$, $p15^{\text{INK4b/MTS2}}$, $p18^{\text{INK4c/INK6A}}$, et $p19^{\text{INK4d/INK6B}}$ qui sont codées par un unique gène. C'est protéines inhibent spécifiquement CDK4/6 (Noh *et al.*, 1999; Sherr & Roberts, 1995) et constituent ainsi les principaux régulateurs de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb) (Seto *et al.*, 1992) et donc de la progression du cycle cellulaire.

La famille Cip/Kip (CDK Inhibiting Protein) représentée par $p21^{\text{WAF1/Cip1}}$, $p27^{\text{Kip1/ICK/PIC2}}$ (Polyak *et al.*, 1994; Ponce-Castaneda *et al.*, 1995; Russo *et al.*, 1996; Slingerland *et al.*, 1994; Toyoshima & Hunter, 1994) et $p57^{\text{Kip2}}$. ces protéines partagent la propriété d'inhiber la plupart des complexes CDK/Cycline.

La progression du cycle est arrêtée suite à la détection d'anomalie au niveau de l'ADN par p53. En effet, le taux de p53 augmente lorsque l'ADN est endommagé. p53 peut alors conduire la cellule vers l'apoptose ou stimuler la réparation de l'ADN ou provoquer l'arrêt du

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

cycle (Sanchez *et al.*, 1997). L'arrêt en G₁ (Deng *et al.*, 1995) est en effet induit par p53 qui active la transcription du gène Cip1 codant pour p21 (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993), inhibiteur de CDK4/Cycline D et CDK2/Cycline E.

Il est à noter que p21 n'est pas le seul médiateur de p53. p21 serait plutôt impliqué dans les processus de différenciation en tant que promoteur de l'arrêt du cycle. D'après des études récentes p21 semble aussi avoir une activité antiapoptotique (Javelaud *et al.*, 2000; Stewart *et al.*, 1999).

Les inhibiteurs chimiques de Cdk

Les CDK sont régulées par l'intervention de molécules activatrices ou inhibitrices, à des moments précis du cycle cellulaire. Les inhibiteurs chimiques des Cdk sont susceptibles d'agir sur leurs cibles en interférant avec la liaison aux substrats ou à l'ATP, en interagissant avec les sites activateurs des CDK, en empêchant l'activation par les cyclines, en mimant l'activation des CKI, en agissant sur le mécanisme de destruction des cyclines ou en intervenant dans la localisation cellulaire du complexe.

I.3.1.2.2. Les Cyclines

Tim Hunt découvre au début des années 80 les premières molécules de cyclines. Les cyclines sont des protéines formées et dégradées au cours du cycle cellulaire (Figure 7). Elles ont été appelées cyclines car

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

leur concentration varie périodiquement au cours du cycle cellulaire. La dégradation périodique de ces protéines est un mécanisme important du contrôle du cycle cellulaire.

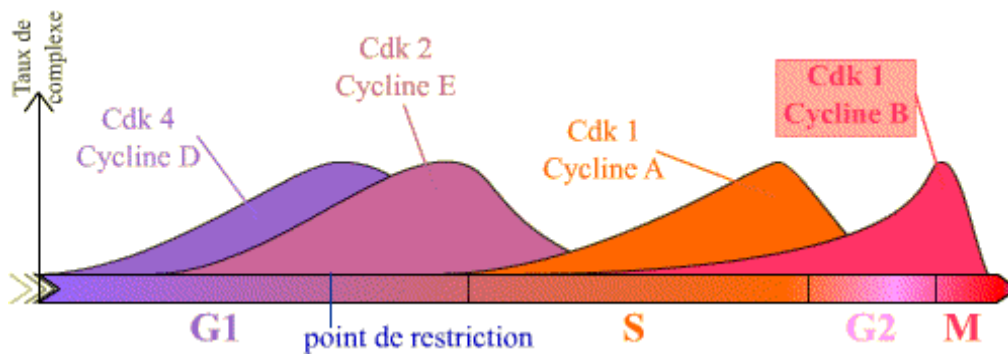


Figure 7 : Expression des cyclines au cours du cycle cellulaire dans la lignée HeLa (Viallard *et al.*, 2001). (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>).

Les cyclines, comme les CDK, ont été conservées chez toutes les espèces au cours de l'évolution. On dénombre aujourd'hui 10 cyclines différentes chez l'homme. Les cyclines sont définies par une région commune d'environ 100 acides aminés appelée cyclin box qui sert à lier et à activer les CDK (Kobayashi *et al.*, 1992; Lees & Harlow, 1993).

I.3.1.3. Les points de restrictions

Il existe plusieurs transitions au cours du cycle cellulaire. Une transition correspond à un changement unidirectionnel de la cellule qui se déplace d'un état où elle effectuait un certain nombre de processus vers un autre état où elle va effectuer d'autres processus.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Pour que les événements cellulaires se fassent dans un ordre voulu, il faut que chaque étape précédant un événement soit complètement et correctement effectuée. Il existe des circuits de régulation qui sont des mécanismes de surveillance, qui contrôlent l'achèvement de certains événements cruciaux pour la cellule et ainsi autorisent la survenue d'une transition et la progression dans le cycle. Il y a deux classes de circuits : les mécanismes intrinsèques opérant à chaque cycle cellulaire pour ordonner des événements successifs ; les mécanismes extrinsèques induits seulement pour agir quand un défaut est détecté (altération de l'ADN par exemple). La perte de ces voies de contrôle réduit la fidélité des événements cellulaires tels que la réplication et la ségrégation chromosomique. De telles altérations peuvent conduire à une prolifération non contrôlée et à la cancérisation.

I.3.1.4. La transition G0/G1

Il existe une grande variété de facteurs mitogènes qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de tyrosine kinases ou encore couplés à des protéines G (de type Rho ou Ras). Ce sont des cascades impliquant des protéines kinases qui conduisent, en général, à la stimulation de la transcription de gènes essentiels pour l'entrée en division (en particulier les cyclines D et les CDK) (Figure 8). Une autre voie importante de l'entrée en division, est celle de l'oncogène Myc. Myc forme un dimère avec la protéine Max, dimère qui active la

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

transcription des gènes de cyclines D et de Cdc25A, de CDK4, et de E2F (Wanzel *et al.*, 2003).

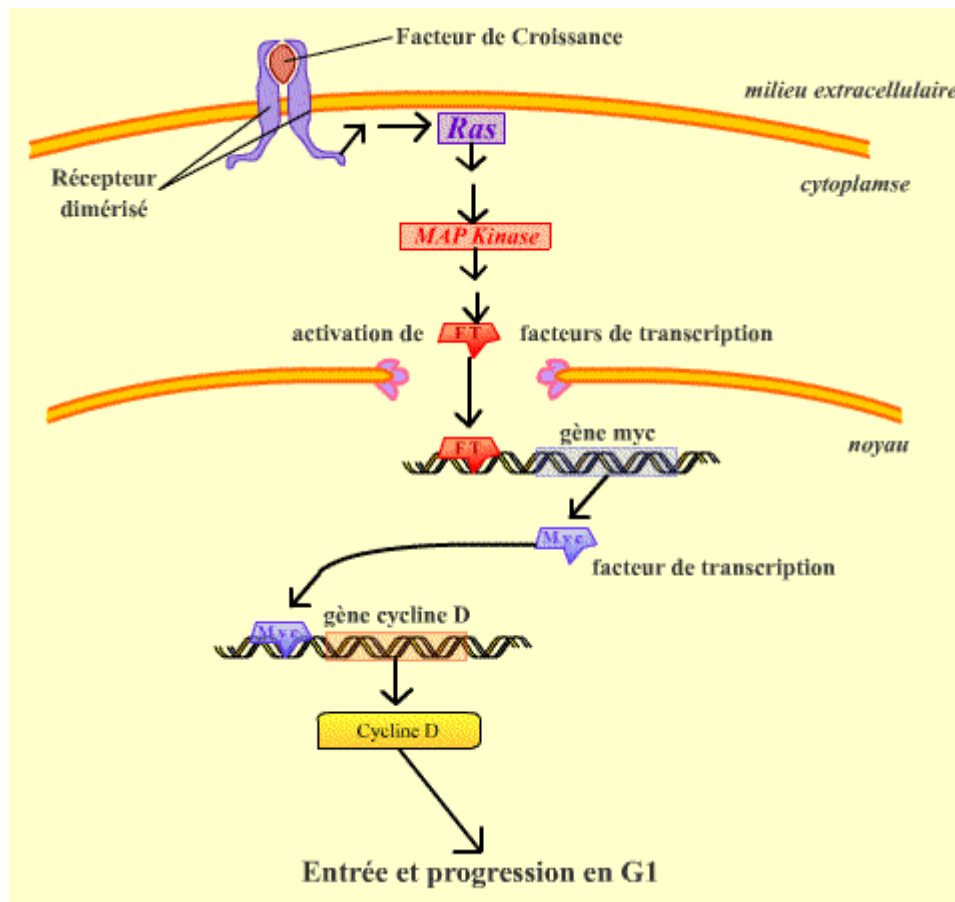


Figure 8 : Représentation de la voie Ras/MAPKinase, qui permet, suite à la stimulation par des facteurs de croissance, de déclencher l'expression du gène codant la Cycline D (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>).

I.3.1.5. La phase G1

Le cycle commence par la transcription d'un certain nombre de gènes, tels que les cyclines D et E, $p21^{Cip1}$, $p27^{Kip1}$ et des gènes sous le contrôle de facteurs de transcription de la famille E2F (ex : cycline E).

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Les cellules sont maintenues en G1 grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb, p107 et p130. Ces suppresseurs de tumeurs peuvent bloquer le cycle cellulaire en s'associant avec un facteur E2F (Figure 9). En effet, en complexe avec pRb, les facteurs E2F, associés au cofacteur de transcription DP, restent inactifs : pRb, p107 et p130 maintiennent donc la cellule en G1.

Les CDK 4 et 2 sont responsables de la phosphorylation de pRb, qui conduit à la dissociation du complexe Rb/E2F et donc, à la libération de facteurs E2F actifs (Bates *et al.*, 1994; Matsushime *et al.*, 1994; Meyerson & Harlow, 1994). Une phosphorylation supplémentaire de pRb par CDK2/cycline E (Hatakeyama *et al.*, 1994; Tsai *et al.*, 1993) permet la libération complète des facteurs E2F. La famille E2F régule l'expression de gènes impliqués dans la transition G1/S, mais aussi de gènes codant pour des protéines contrôlant la réplication (Mcm, CDC6) des enzymes nécessaires à la synthèse d'ADN. On comprend pourquoi les inhibiteurs de CDK, des familles Ink4 et Cip1/Kip1, en maintenant pRb sous forme hypophosphorylée, donc liée à E2F, constituent des inhibiteurs puissants du cycle cellulaire. L'inactivation de ces inhibiteurs permet donc la progression de la cellule à travers la phase G1 et la transition G1/S.

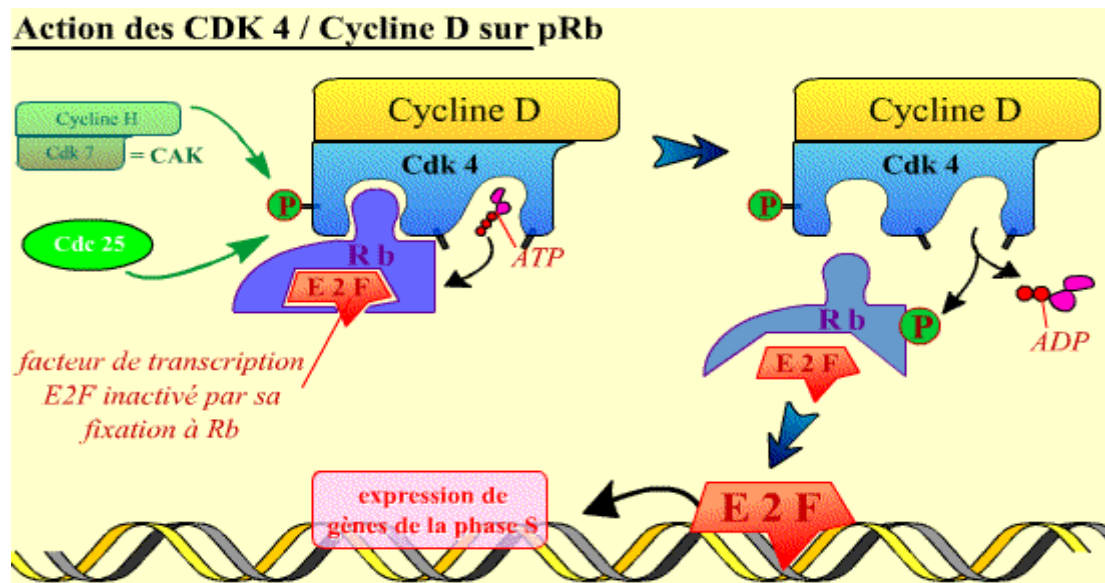


Figure 9 : Mode d'action du complexe Cycline D / Cdk4 sur la protéine Rb. Une fois activé, le complexe Cycline D / Cdk4 peut phosphoryler la protéine Rb (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>).

I.3.1.6. Le passage G₁/S

La transition G₁/S commence tout d'abord par l'assemblage d'un complexe pré-répliatif (pre-RC). L'Orc (origin recognition complex), un complexe de six sous-unités, lie l'ATP puis se fixe sur l'ADN au niveau des origines de réplication. L'Orc recrute deux facteurs : Cdc6 (une ATPase) et le facteur de transcription Cdt1. Ces deux facteurs interviennent ultérieurement pour permettre l'accrochage des six protéines du complexe Mcm (mini-chromosome maintenance). Plusieurs protéines et complexes protéiques doivent s'associer aux complexes pré-répliatifs afin de permettre la synthèse d'ADN.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Cdk2/Cycline E phosphoryle ensuite p27^{Kip1}, ce qui stimule son ubiquitination par Skp1/Skp2 et conduit à sa destruction par le protéasome, contribuant à la transition G₁/S (Bloom & Pagano, 2003). Le point de restriction en G₁ en réponse à une lésion de l'ADN est le mieux connu (Figure 10). Trois gènes le contrôlent : ATM (*ataxia telangiectasia mutated*, le gène muté dans la maladie ataxie télangiectasie) (Painter & Young, 1980; Savitsky *et al.*, 1995), p53 (Livingstone *et al.*, 1992) et p21 (Brugarolas *et al.*, 1995). p53 est le gène suppresseur de tumeur le plus fréquemment muté dans les cancers humains (Sherr, 1996). Il code pour un facteur de transcription qui est activé en réponse à une lésion de l'ADN ou une perturbation du pool de nucléotides. p53 activée est capable d'inhiber le cycle cellulaire et de promouvoir l'apoptose (Miyashita & Reed, 1995). Une partie de la capacité de p53 à arrêter la cellule en phase G₁ vient de l'activation de la transcription de p21 inhibiteur des CDK qui contrôle l'entrée en phase S (Elledge, 1996). Le produit du gène ATM est impliqué dans la régulation de p53. Les cellules qui n'ont pas ce gène ont une activation réduite et retardée de p53 en réponse à une lésion de l'ADN (Loda *et al.*, 1997). Lors d'une lésion de l'ADN, ATM phosphoryle la partie N-terminale de p53 ce qui stabilise p53 (Kubbutat *et al.*, 1997) et empêche sa dégradation (Siliciano *et al.*, 1997). D'autres kinases (telles que la ADN-PK, DNA-dependent protein kinase) capables de phosphoryler p53 ont été mises en

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

évidence et joueraient le même rôle qu'ATM en réponse à des lésions de l'ADN (Woo *et al.*, 1998).

Le fait que les gènes codant pour p53 et ATM soient fréquemment mutés dans les cancers humains (Hollstein *et al.*, 1991) suggère que la fonction des points de restriction est importante dans la prévention des cancers.

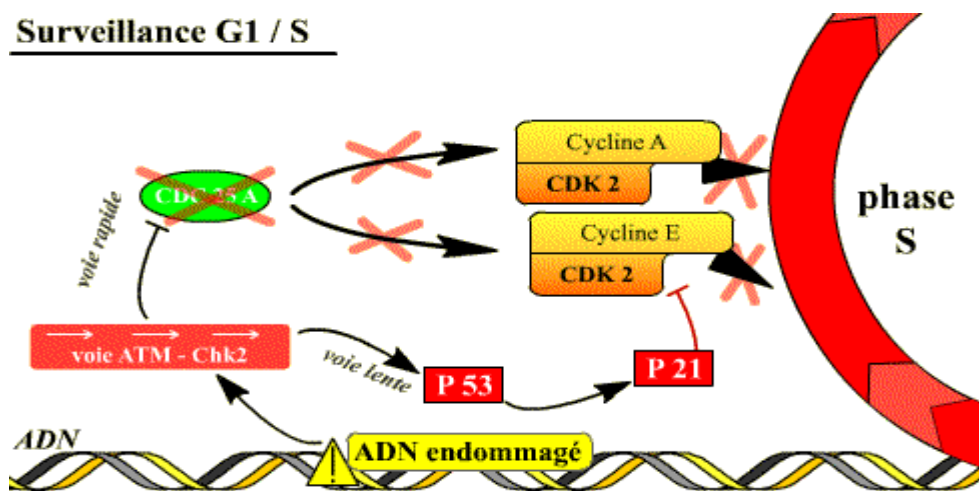


Figure 10 : Représentation schématique des conséquences de la détection de lésions à l'ADN au point de contrôle G1/S. Si l'ADN est endommagé, la transition G1-S est bloquée par les mécanismes de surveillance de l'état de l'ADN (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>).

I.3.1.7. Le passage G₂/M

La phase G₂ est une préparation à la mitose. Elle est marquée par le début de la condensation des chromosomes. La transition prophase/métaphase est contrôlée par le couple CDK1/cycline B. Ce point de contrôle empêche une ségrégation impropre des

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

chromosomes, phénomène fréquent en cancérologie humaine (Paulovich *et al.*, 1997).

Divers signaux (cassures des brins d'ADN, arrêt de la progression des fourches de réplication lors de la synthèse de l'ADN...) peuvent engendrer l'arrêt du cycle en G2. Pour cela, les molécules qui interviennent vont bloquer le processus d'activation de la CDK1. Une des cibles essentielles du point de surveillance G2/M est la phosphatase Cdc25C qui sera inactivée (Figure 11). La fonction de Cdc25C dans la progression normale du cycle est de déphosphoryler la CDK1, rendant ainsi le complexe actif. Les lésions de l'ADN activent Chk1 et Chk2 qui phosphorylent Cdc25C sur des sérines, ce qui entraîne sa séquestration dans le cytoplasme, loin de son substrat nucléaire CDK1. Le complexe CDK1/cycline B reste alors phosphorylé donc inactif. Si la réplication est inachevée, c'est ATR qui intervient, phosphoryle Chk1 qui inhibe CDK1. Chk1 et Chk2 peuvent également inactiver Cdc25C en inhibant l'action de la kinase polo, ou rendre inactive la Cdk1 en séquestrant les complexes CDK1/cycline B dans le cytoplasme, loin de ses substrats nucléaires : tant que la réplication n'est pas achevée, aucune mitose ne débute.

Un deuxième effet important est la stimulation de la synthèse d'un inhibiteur du cycle, la p21, qui bloque le complexe CDK1/cycline B, provoquant ainsi le maintien de l'arrêt en G2. La protéine p21 peut, soit inhiber Cdk1, soit bloquer la CAK. Dans cette réponse, plus lente que la première, c'est p53 qui stimule le gène de la p21. En effet, p53

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

est alors en grande quantité dans la cellule, parce qu'elle est phosphorylée par Chk2 activée par ATM et en conséquence non dégradée. p53 peut aussi réprimer les gènes de Cdk1 et de Cycline B dont les promoteurs contiennent un site p53.

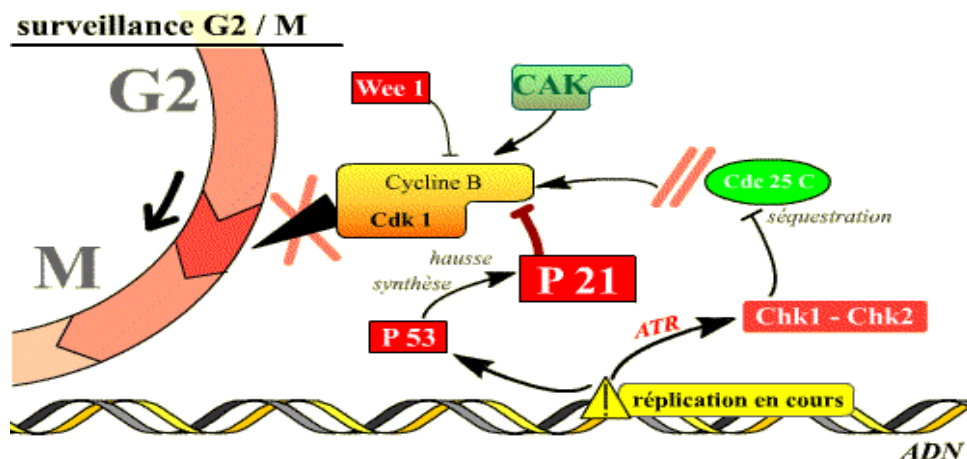


Figure 11 : Représentation schématique des conséquences de la détection de lésions à l'ADN au point de contrôle G2/M. Si l'ADN est lésé, ou si la réplication n'est pas achevée, l'activation de plusieurs voies inhibitrices du complexe CDK1/cycline B permet d'empêcher l'entrée en mitose (Marie-Claude Lebart, Jean Marian, <http://www.snv.jussieu.fr>).

I.3.1.8. La mitose

Du grec *mi-*, en deux, et de la racine *tom-*, qui indique une coupure (par exemple, lobotomie, un *tome* de livre, *tomographie*), la mitose désigne d'une manière générale le phénomène de division cellulaire. Elle est constituée de deux phénomènes distincts, la caryocinèse ou division du noyau et la cytokinèse ou division du cytoplasme.

La caryocinèse est constituée de 5 étapes successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 12).

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

La prophase

C'est une phase d'organisation. La membrane cytoplasmique de la cellule modifie sa perméabilité ; les échanges diminuent. Le noyau et le cytoplasme subissent tous deux des changements pendant la prophase. Dans le noyau, les nucléoles se déplacent à la périphérie du noyau et disparaissent. Les fibres de chromatine se condensent en spirale - il existe 3 niveaux de condensation - pour former des chromosomes visibles au microscope photonique. Chaque chromosome dupliqué prend la forme de deux chromatides soeurs identiques réunies par le centromère.

La métaphase

L'enveloppe nucléaire est entièrement détruite, l'ergastoplasme est désorganisé et les centrosomes se trouvent aux pôles de la cellule. Les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale - imaginaire - qui, comme son nom l'indique, est à égale distance des deux pôles du fuseau.

L'anaphase

L'anaphase commence quand le centromère dédoublé de chaque chromosome se sépare en deux, libérant ainsi les chromatides soeurs. Chaque chromatide devient dès cet instant un chromosome à part entière, conduit par le fuseau vers les pôles de la cellule.

La télophase

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Pendant la télophase, les microtubules polaires allongent encore la cellule, et les noyaux fils commencent à se former aux pôles. Les enveloppes nucléaires se constituent à partir des fragments de l'enveloppe nucléaire de la cellule mère et de portions de membrane fournies par le réticulum endoplasmique. La mitose, c'est-à-dire la division d'un noyau en deux noyaux génétiquement identiques, vient de se terminer. La cytokinèse, ou division du cytoplasme, est déjà bien amorcée en général, de sorte que les deux cellules filles distinctes apparaissent peu de temps après la mitose.

La cytokinèse

Il s'agit de la phase finale de la mitose. Durant cette période, le sillon de division se forme dans un plan perpendiculaire à l'axe du fuseau mitotique et sépare la cellule en deux. L'enveloppe nucléaire et les nucléoles finissent de se reconstituer et l'arrangement radial interphasique des microtubules nucléés par le centrosome se reforme.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

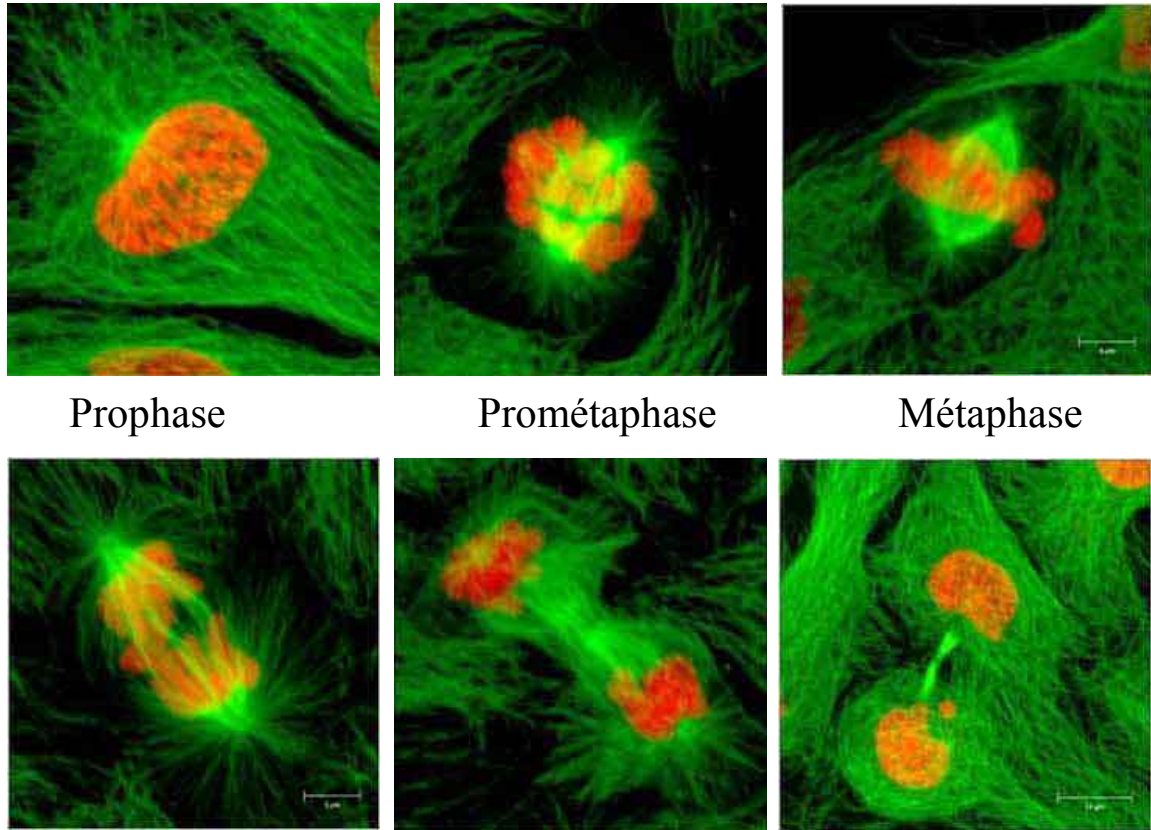


Figure 12: Observation en microscopie à épifluorescence des différentes phases de la mitose. Le réseau de microtubules est coloré par un anticorps anti-tubulines marqué à la FITC. La chromatine et les chromosomes sont traités par un colorant spécifique qui fluoresce en rouge. Les cellules sont fixées par l'alcool, les limites cellulaires (membrane) ne sont plus visibles.

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

I.3.2 La mort cellulaire programmée

Il existe deux formes de mort cellulaire. Une agression très violente provoque une lyse appelée nécrose. Dans les autres situations, la mort cellulaire est génétiquement contrôlée. L'apoptose, qui dépend de l'activation des caspases. Toutes les nuances ont été observées entre apoptose et nécrose, incluant une apoptose indépendante des caspases et une apoptose abortive se terminant en nécrose. Un autre processus génétiquement contrôlé, l'autophagie, contribue à la mort cellulaire au cours du développement ou en réponse à certaines agressions. Enfin, la sénescence est un arrêt irréversible de la prolifération cellulaire qui participe, avec l'apoptose, à l'élimination des cellules en voie de transformation ou exposées à des agents cytotoxiques.

La mort cellulaire programmée fait partie intégrante de la physiologie normale d'un organisme. Ainsi au cours des nombreuses mitoses et différenciations cellulaires qui permettront de créer un organisme à partir d'un œuf, il est en permanence nécessaire d'éliminer les cellules superflues ou potentiellement dangereuses. C'est un processus essentiel du développement intervenant à différents niveaux comme : pour la maturation des cellules lymphoïdes (Peter, 1999), pour le développement du système nerveux (Pettmann & Henderson, 1998), pour l'attachement des cellules épithéliales (Frisch & Francis, 1994).

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr (Kerr *et al.*, 1972), pour désigner une forme de mort cellulaire totalement

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. L'apoptose est une réponse hautement conservée des eucaryotes unicellulaires jusqu'aux mammifères (Ameisen *et al.*, 1995; Maarouf *et al.*, 1997). Une dérégulation de la mort cellulaire programmée peut être à l'origine de nombreuses pathologies (Jeremias *et al.*, 2001). Certaines sont liées à une inhibition de l'apoptose (cancer, syndromes lymphoprolifératifs,...) alors que d'autres sont associées à une stimulation de ce phénomène (SIDA, maladies neurodégénératives, maladies auto-immunes ...) (Thompson, 1995). L'apoptose est caractérisée par des modifications du métabolisme cellulaire. Elle peut donc être détectée par des bouleversements de la morphologie ou de l'activité biochimique de la cellule (Tableau 3).

Tableau 3 : Modifications morphologiques et biochimiques observables au cours de la mort cellulaire par apoptose (Kerr *et al.*, 1972; Lazebnik *et al.*, 1993; Los *et al.*, 1999; Thornberry & Lazebnik, 1998).

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Modifications morphologiques	Modifications biochimiques
Digitations cellulaires	Fragmentation caractéristique de l'ADN mise en évidence par électrophorèse
Corps apoptotiques	Augmentation de l'expression des ARNm de la glycoprotéine 2 sulfate
Accumulation de grains de zymogène	Activité de la desoxynucleotidyl transférase terminale
Condensations cytoplasmiques	Expression des gènes TRPM2 & TGFb1
Pycnose nucléaire	
Chromatine condensée	
Désorganisation du reticulum endoplasmique granuleux	

L'apoptose peut être déclenchée : par des signaux extracellulaires comme par le Tnf (tumor necrosis factor) et la famille des récepteurs Fas (Ashkenazi & Dixit, 1998), par les immunoglobulines fixatrices de surface (Tsubata *et al.*, 1993), par un problème d'adhésion cellulaire au substrat (Frisch & Francis, 1994), par des perturbations intracellulaires comme une modification de la perméabilité des membranes mitochondriales (Green & Reed, 1998) ou par l'activation des systèmes de contrôle des dommages intracellulaires (Evan *et al.*, 1995).

I.3.2.1. Les différences entre nécrose et apoptose

La nécrose est une mort cellulaire dite « accidentelle » qui survient lors d'un dommage tissulaire et elle implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, la cellule devient enflée, puis la membrane cellulaire éclate déversant le contenu cellulaire dans le tissu

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

environnant et provoquant l'inflammation. Les mitochondries et le noyau restent intacts tout au long de ce processus. L'ADN nucléaire va être dégradé de manière aléatoire (Bicknell & Cohen, 1995; Dong *et al.*, 1997) par des endonucléases activées notamment par des sérines protéases (Dong *et al.*, 1997). Les fragments ainsi générés sont dépourvus d'extrémité 3' sortante.

Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant par différentes phases (Kerr *et al.*, 1972). Tout d'abord les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules (perte des contacts entre les cellules). L'un des points morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation à la fois du noyau et du cytoplasme ce qui induit une diminution significative du volume cellulaire. La mitochondrie de la cellule apoptotique va subir plusieurs modifications majeures : relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997), diminution du potentiel membranaire et de la transition de la perméabilité mitochondriale qui permet l'ouverture de pores spécialisés (Marchetti *et al.*, 1996; Vander Heiden *et al.*, 1997; Zamzami *et al.*, 1996). Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 pb (Wyllie, 1980; Wyllie *et al.*, 1984). La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Afin de faciliter la reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes, la cellule va signaler son état apoptotique à son

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

environnement notamment grâce au changement de localisation des molécules de phosphatidylsérines qui passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. Les corps apoptotiques formés sont ensuite rapidement éliminés par les cellules adjacentes. Cette élimination est primordiale car elle permet de ne laisser aucune trace dans le tissu où survient l'apoptose, en particulier, elle prévient toute nécrose secondaire qui aurait pour conséquence la libération aléatoire du contenu cellulaire et l'établissement d'une réaction inflammatoire.

La mort cellulaire programmée est un processus rapide (quelques heures). L'un des points majeurs de l'apoptose est que l'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus. Toutefois, on peut noter que l'inflammation n'est pas nécessairement totalement absente durant l'apoptose (en raison du relargage de l'IL-1 et IL-18 dans l'environnement), mais il s'agit d'une inflammation régulée.

Plusieurs observations indiquent que l'apoptose est dépendante de la présence d'énergie. Cependant, certains événements apoptotiques, comme la fragmentation d'ADN, ne nécessitent aucune source d'énergie, contrairement au phénomène de condensation nucléaire par exemple (Kass *et al.*, 1996)

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

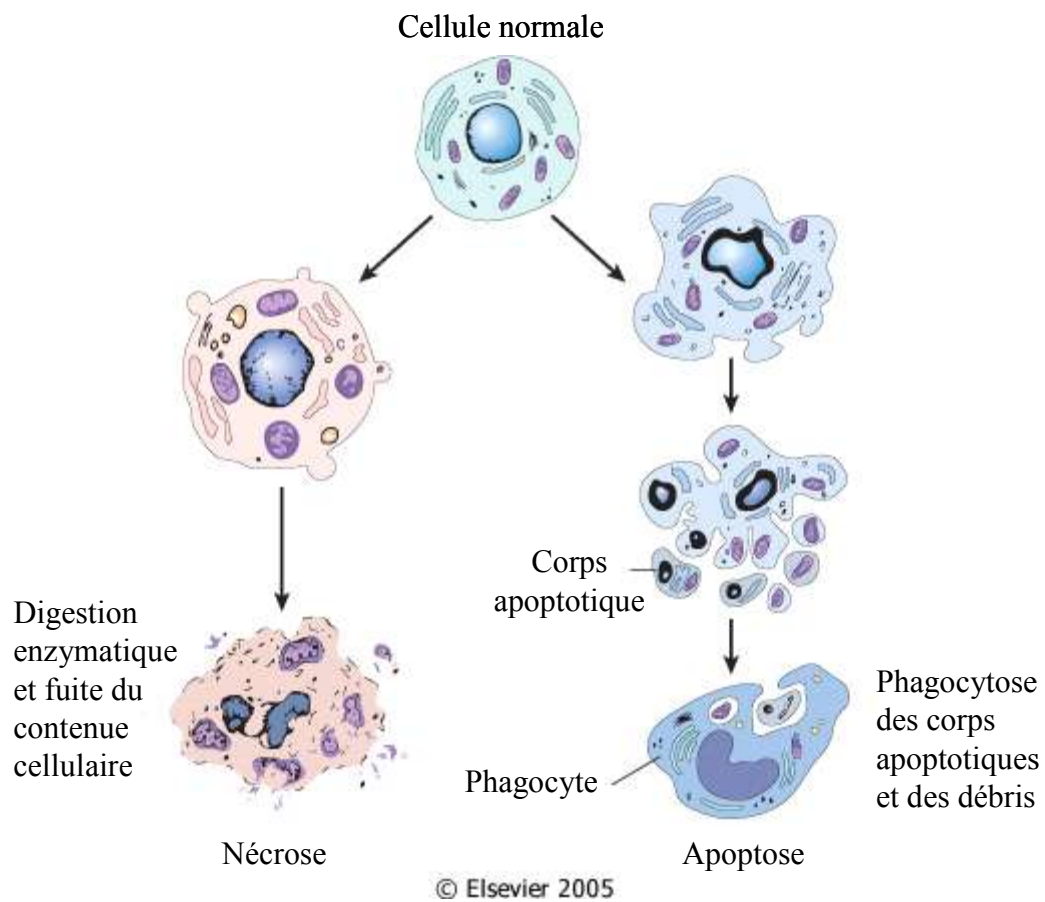


Figure 13 : Représentation schématique des différences entre apoptose et nécrose (<http://www.humpath.com>).

I.3.2.2. Voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque fait intervenir des protéases appelées caspases, les protéines de la famille Bcl-2 et la molécule adaptatrice Apaf-1. Elle s'organise autour de la mitochondrie.

I.3.2.2.1. Les caspases (cysteinyll aspartate-specific proteinases)

Structure et activation

Les caspases sont des enzymes protéolytiques impliquées dans les modifications phénotypiques caractéristiques de l'apoptose. Elles sont au nombre de 12 chez l'homme. Toutes les caspases ont une structure très conservée comprenant, un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage la grande sous-unité (17-21 kDa, qui porte le centre actif) et un domaine qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10-14 kDa). En fonction de la taille de leur prodomaine les caspases sont regroupées sous le nom de, caspases effectrices (caspases à petit prodomaine, caspases 3, 6 et 7) qui vont cliver les protéines intracellulaires, ou caspases initiatrices (caspases 8, 9 et 10) qui activent les caspases protéolytiques. Les caspases initiatrices contiennent des motifs d'interaction protéine/protéine : les DED (death effector domain) ou CAREDC (caspases recruitment domain). Les caspases fonctionnent alors en cascade protéolytique. Il existe un troisième groupe, comprenant les

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

caspases 1, 4 et 5 qui sont plus impliquées dans la maturation des cytokines (IL-1, IL-8).

Les caspases sont synthétisées sous forme zymogène, appelées pro-caspases, la conversion en une enzyme mature nécessite au moins deux clivages au niveau de liaison Asp-X (Figure 14). La spécificité des caspases pour leur substrat est déterminée par la nature des quatre résidus en position C-terminale par rapport à l'aspartate du site de clivage

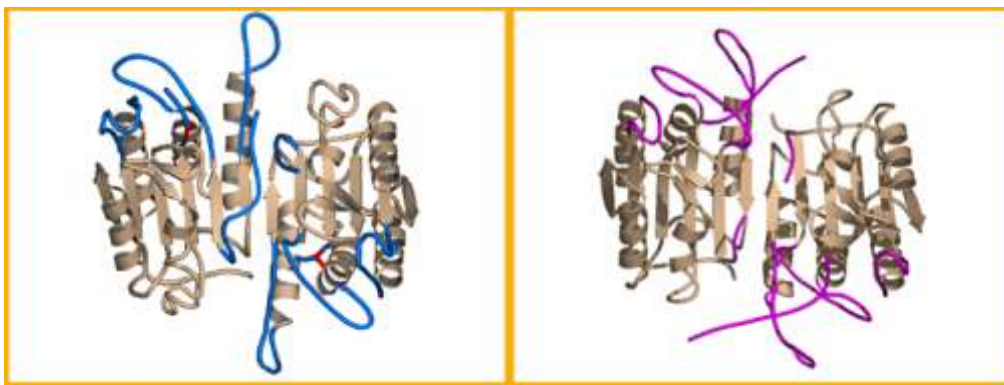


Figure 14 : Structure cristallinienne de la pro-caspase 7 (à gauche) et de sa forme active (à droite) (Wu *et al.*, 2001).

Rôles des caspases

Le rôle des caspases est principalement exécutif, c'est-à-dire qu'elles vont s'attacher à éteindre les voies protectrices et à activer des molécules qui vont participer à la destruction cellulaire. Les caspases sont des enzymes extrêmement sélectives. Les protéines cibles doivent

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

impérativement posséder un aspartate en position P1. Les protéines cibles regroupent des protéines :

Cytoplasmiques (Gelsoline, Gas-2, Fodrine, β -Caténine, Cytokératine 18).

Nucléaires (SRF, Lamine A et B1, NuMA, mdm2).

Impliquées dans le métabolisme et la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PKcs, Topo-isomérase I).

Kinases (PKC δ , PKC τ , PKC-related kinase, PKN, Pak 2, Mst 1 kinase, Mst 2 kinase, FAK, Fyn, MEKK-1, Wee1 kinase).

Impliquées dans la transduction du signal et dans l'expression de gènes (Pro-interleukine 1 β , 16 et 18, PP2A, Phospholipase A2, Stat 1, NF κ B, I κ B, Calpastatine)

Impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération (p21, p27, pRb)

Impliquées dans les maladies génétiques (Huntington, Préséniline-1 et 2)

De régulation de l'apoptose (Bcl-2, Bcl-Xl, FLIP, Bid, Bax, ICAD)

La mitochondrie au cœur de la machinerie

La mitochondrie, depuis longtemps identifiée comme l'organite indispensable à la production d'ATP, a été plus récemment également impliquée dans la régulation des mécanismes moléculaires de mort cellulaire (Green & Reed, 1998; Loeffler & Kroemer, 2000). En effet, dans une cellule engagée dans un processus de mort cellulaire, on

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

observe une perméabilisation des membranes mitochondriales, à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol, accompagnée dans la plupart des cas d'une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial. Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore très controversé.

Plusieurs modèles sont proposés et pourraient coexister :

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

Un autre modèle suppose un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC, provoquant une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable à la fois du gonflement de la matrice et d'une production de radicaux

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

oxygénés. Ce modèle ne permet cependant pas d'expliquer comment une libération des protéines apoptogènes pourrait précéder la chute du potentiel de membrane (Zamzami & Kroemer, 2001).

Un dernier modèle suggère plutôt la formation d'un pore dans la membrane mitochondriale externe permettant la libération de protéines dans le cytosol sans altération physique de la mitochondrie. La protéine proapoptotique Bax pourrait être à l'origine de la formation de ce pore, soit en interagissant directement avec des lipides, soit en s'associant au VDAC ou bien encore par auto-oligomérisation ou formation d'oligomères avec un autre membre de la même famille (Martinou *et al.*, 2000).

Les protéines ainsi libérées sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (soluble inter membrane mitochondrial proteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Une première classe de SIMP agit sur la voie classique d'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des pro-caspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec l'homologue de CED-4, la protéine Apaf-1 et la forme zymogène de la caspase 9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome à l'origine du clivage et donc de la formation de la forme active de la pro-caspase 9 (Zou *et al.*, 1999). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases 3 ou 7. La

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP, cf. I.3.2.4) et les inactive.

I.3.2.3. Voie extrinsèque, les récepteurs de mort cellulaire

De nombreux stimuli sont capables d'induire l'apoptose. Toutefois il existe une famille de récepteurs spécialisés dans l'induction de la mort cellulaire programmée : les récepteurs de mort. Une fois stimulés, ces récepteurs induisent l'activation des caspases (Enari *et al.*, 1995; Longthorne & Williams, 1997). Cette voie d'activation est impliquée dans l'élimination des cellules potentiellement dangereuses pour l'organisme et notamment les lymphocytes autoréactifs. Les récepteurs de mort appartiennent à la famille des récepteurs du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TnfR) (Nagata, 1997). Les TnfR peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire, soit la survie, soit la mort soit les deux. On peut donc citer différents types de récepteurs appartenant à cette famille :

4-1BB (Kwon & Weissman, 1989), Ox40 (Mallett *et al.*, 1990), TnfRII (Smith *et al.*, 1990), p75 NGFR (Johnson *et al.*, 1986), CD27 (Camerini *et al.*, 1991), CD30 (Durkop *et al.*, 1992) et CD40 (Stamenkovic *et al.*, 1989) sont impliqués dans la survie cellulaire.

Fas (CD95/APO-1) (Itoh *et al.*, 1991), TnfRI (Loetscher *et al.*, 1990; Schall *et al.*, 1990), DR3 (Chinnaiyan *et al.*, 1996) /Wsl-1 (Kitson *et*

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

al., 1996), DR4 et DR5 (Chaudhary *et al.*, 1997) et DR6 (Pan *et al.*, 1998) sont impliqués dans la mort cellulaire.

Les membres de la famille du TnfR sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant dans leur domaine extracellulaire de une à six régions riches en cystéines, impliquées dans la liaison du ligand. Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie intracellulaire une région conservée d'environ 80 acides aminés appelée domaine de mort cellulaire (DD) (Chaudhary *et al.*, 1997; Nagata, 1997; Tartaglia *et al.*, 1993). Le DD a été conservé au cours de l'évolution.

I.3.2.3.1. Les ligands

La famille des ligands du Tnf comprend une quinzaine de membres (Tnf, FasL, CD30L, Trail, Lymphotoxine,...) (Nagata & Golstein, 1995). Ces ligands sont, en grande majorité, des protéines transmembranaires de type II, qui présentent donc leur extrémité C-terminale du côté extracellulaire. Le domaine extracellulaire est composé d'environ 150 acides aminés et possèdent 20 à 25 % d'homologie avec les autres membres de la famille du Tnf. De nombreuses études ont rapporté que des stress cellulaires pouvaient induire l'expression des ligands de mort, tel que FasL et donc induire l'apoptose (Kasibhatla *et al.*, 1998).

I.3.2.3.2. Le récepteur Fas

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

Le récepteur Fas (CD95/APO-1) est le récepteur de Fas ligand (FasL). Il représente le prototype des récepteurs de mort. Il est exprimé à la surface de nombreux types cellulaires. La stimulation de Fas par son ligand physiologique, ou par un anticorps anti-Fas, va induire son oligomérisation et le recrutement, par l'intermédiaire de son domaine de mort cellulaire, d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transduction du signal apoptotique comme FADD (fas associated death domain)(Chinnaiyan *et al.*, 1995). Certaines études suggèrent qu'il existe une connexion étroite entre prolifération cellulaire et apoptose. Ainsi la signalisation via FADD ne va pas exclusivement aboutir à la mort cellulaire mais aussi, selon les circonstances, à la survie et la prolifération (Newton *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1998).

1.3.2.3.3. Le récepteur TnfRI

Le TnfRI est le récepteur de Tnf α , il se lie alors au niveau de son domaine DD avec la protéine TRADD. Celle-ci est capable aussi bien d'induire l'activation de NF-kB, que l'apoptose (Hsu *et al.*, 1995). TRADD active ces différentes voies en recrutant une protéine adaptatrice supplémentaire TRAF2 ou FADD (Hsu *et al.*, 1996).

En résumé, les complexes moléculaires associés aux récepteurs de mort induisent l'activation des caspases par l'intermédiaire des

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

interactions du type FADD/Caspase 8 ou 10; TRADD/FADD/Caspase 8 ou 10 et TRADD/RIP/RAID/Caspase 2.

I.3.2.4. Contrôle de l'apoptose

Pour chacune des deux voies décrites, la voie des récepteurs extracellulaire et la voie mitochondriale, conduisant à la mort de la cellule, les mécanismes d'intégration des signaux s'établissent au niveau d'un complexe multiprotéique (respectivement le DISC et l'apoptosome). C'est en agissant au niveau de la formation et/ou de l'activité de ces derniers que la plupart des modulateurs de la mort cellulaire exercent leur action.

I.3.2.4.1. Régulation transcriptionnelle des caspases

Plusieurs observations suggèrent que la régulation de l'expression des gènes de procaspases puisse avoir une importance dans certaines conditions. Ainsi, bien que les ARNm de procaspases soient clairement détectables dans la plupart des types cellulaires (Henkart, 1996; Patel *et al.*, 1996; Takahashi & Earnshaw, 1996), les niveaux de zymogènes sont très différents d'un type cellulaire à l'autre. De plus, le niveau d'expression de ces zymogènes n'est pas statique.

Plusieurs régulateurs agissent au niveau de la formation du DISC les plus connus sont les FLIP. Ils contiennent deux domaines effecteurs de mort cellulaire (DED) qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases 8 ou 10 et ainsi empêcher leur recrutement

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

aux récepteurs de mort (notamment Fas et TnfRI) (Bump *et al.*, 1995). FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu *et al.*, 1997; Irmeler *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1997) ou induire l'apoptose (Han *et al.*, 1997; Inohara *et al.*, 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. En définitive, il apparaît que le rôle de FLIP dans la modulation de l'apoptose semble très complexe. Son effet pro ou anti-apoptotique apparaît, une fois de plus, dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire considéré ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes.

1.3.2.4.2. Les protéines de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance cruciale dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Cette famille comprend aussi bien des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, etc.) qu'anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-x_L). Elles interagissent entre elles pour former des homodimères ou des hétérodimères. Le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort (Adams & Cory, 1998). Par ailleurs, une grande majorité d'entre elles contiennent une partie carboxy-terminale hydrophobe qui assure leur ancrage au niveau de la membrane externe mitochondriale, mais également des membranes externes du réticulum endoplasmique et du noyau. Les molécules anti-apoptotiques siègeraient au niveau de la mitochondrie (Kim *et al.*, 2006) tandis que les protéines pro-apoptotiques posséderaient une

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

localisation différente (cytosol ou microtubules). À la suite d'un signal apoptotique, ces dernières s'inséreraient dans la membrane mitochondriale et induiraient sa perméabilisation (Crompton, 2000).

I.3.2.4.3. Les IAP (Inhibitor of apoptosis protein)

L'effet protecteur des IAP est dû à leur capacité à inhiber l'activation et donc l'activité de certaines caspases. Ainsi, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 inhibent les caspases 3, 7 et 9 mais pas les caspases 1, 6 et 8 (Deveraux *et al.*, 1998; Deveraux *et al.*, 1997). NAIP, pour sa part, est incapable d'inhiber les caspases 1, 3, 6, 7 ou 8 (Roy *et al.*, 1997). Au cours de l'apoptose, Smac/DIABLO est libérée et se lie aux IAP empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenues dans l'apoptosome de s'activer.

I.3.2.5. Voie indépendante des caspases

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des caspases a montré que les cellules peuvent mourir aussi bien par des mécanismes impliquant les caspases que par des mécanismes indépendants des caspases. Par exemple, la surexpression de Bax (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) conduit à l'activation des caspases et à la mort cellulaire (Xiang *et al.*, 1996). Cependant, l'inhibiteur général des caspases zVAD-fmk, bien qu'étant capable d'inhiber l'activation des caspases, s'est avéré incapable d'empêcher la mort cellulaire induite par Bax (Xiang *et al.*, 1996). Ce type de mort cellulaire est insolite. En effet il

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

y a, à la fois, une chute du potentiel mitochondrial mais aussi une absence de dégradation de l'ADN ainsi qu'une perte de l'intégrité membranaire, ce dernier point étant réminiscent de la nécrose plutôt que de l'apoptose. De nombreux stimuli, comme la déprivation en sérum (Mills *et al.*, 1998), la surexpression des oncogènes myc et E1A ou de Bak (McCarthy *et al.*, 1997), les dommages à l'ADN (McCarthy *et al.*, 1997)... sont également capables d'induire une mort cellulaire qui ne peut pas être bloquée par des inhibiteurs de caspases. Dans tous ces cas, les cellules meurent selon un processus proche de la nécrose, sans présenter les modifications nucléaires spécifiques de l'apoptose (Hirsch *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1998). Toutefois le bourgeonnement de la membrane plasmique de ces cellules est observé de la même façon qu'au cours de l'apoptose (McCarthy *et al.*, 1997; Mills *et al.*, 1998).

I.3.2.6. L'apoptose nouvelle cible pour la thérapie anticancéreuse

La prolifération cellulaire non contrôlée a été communément associée à une activité dérégulée des oncogènes puisque la transformation cellulaire est le phénotype observé dans les tumeurs. Cependant ce type de prolifération cellulaire doit être nécessaire mais pas toujours suffisant pour induire l'apparition de tumeur. En effet, dans certaines proliférations malignes la diminution de l'apoptose est un des événements importants qui détermine une prolifération cellulaire

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

incontrôlée. Les voies induisant l'apoptose ainsi que les protéines impliquées dans la survie cellulaire, sont donc fréquemment dérégulées dans de nombreux cancers (Reed, 2001).

La recherche de nouveaux traitements anti-cancéreux s'intéresse donc tout naturellement à ce phénomène (Brown & Attardi, 2005; Fesik, 2005; Ghobrial *et al.*, 2005; Mita & Tolcher, 2005). La connaissance actuelle de l'apoptose permet d'en connaître les différents acteurs, et les cibles thérapeutiques sont donc diverses :

Activation des récepteurs de mort. L'activation des récepteurs TnfRI et Fas a été une des cibles privilégiées du fait de leur importante capacité d'induction de l'apoptose par l'intermédiaire de leur Death Domain activateur de la cascade des caspases (Kischkel *et al.*, 1995). Malheureusement, l'induction de ces récepteurs *in vivo* n'a conduit qu'à un faible effet sur les cellules cancéreuses, et a engendré d'importants effets secondaires sur les tissus sains (Debs *et al.*, 1990; Ogasawara *et al.*, 1993; Tracey & Cerami, 1990).

Activation des caspases. Les caspases étant à l'état naturel sous forme inactive, la recherche a mis au point des molécules nommées « artificial death switch » capables de les activer. Ces molécules sont notamment capables d'activer les caspases 1 et 3 responsables du déclenchement de l'apoptose chez les cellules cancéreuses (MacCorkle *et al.*, 1998). Cette stratégie a récemment été testée sur une lignée de cellules de cancer de la prostate et a engendré une

Chapitre I : Aspect fondamentaux du cancer

importante augmentation du nombre d'apoptoses (Shariat *et al.*, 2001).

L'Apoptin. Cette protéine dérivée d'un virus de poulet (Pietersen & Noteborn, 2000) a démontré une importante capacité d'induction de l'apoptose impliquant les caspases (Danen-Van Oorschot *et al.*, 2000). L'Apoptin est très active contre les cellules cancéreuses sans induire de toxicité chez les cellules saines (Pietersen *et al.*, 1999). Ceci pourrait s'expliquer par la localisation nucléaire de cette molécule chez les cellules cancéreuses, ce qui est indispensable à son activité, alors qu'elle reste cytoplasmique chez les cellules saines (Murphy, 1999). De plus, l'Apoptin présente aussi une activité chez les lignées potentiellement chimiorésistantes, comme les mutantes p53, les lignées surexprimant Bcl-2 ou BCR-ABL (Danen-Van Oorschot *et al.*, 1999; Du *et al.*, 2000; Zhuang *et al.*, 1995). Des essais de thérapie génique sont en cours pour tenter de délivrer directement l'Apoptin dans les cellules cancéreuses (Danen-Van Oorschot *et al.*, 1997).

Activation de la mitochondrie. L'activation de la mitochondrie est considérée comme un point de « non retour » lors du déclenchement de l'apoptose (Green & Amarante-Mendes, 1998), ce qui en fait une cible particulièrement intéressante. L'activation de la mitochondrie peut passer par l'intermédiaire des protéines de la famille Bcl-2 qui agit sur les pores membranaires, notamment par des stratégies, antisens visant à réprimer l'expression de Bcl-2 (Nicholson, 2000; Yuen & Sikic, 2000) ou de la thérapie génique pour surexprimer Bax.

Inactivation des IAP. Des études récentes sur le NSCLC ont montré que l'oligodésoxynucléotide (ODN) 4003 permet d'inhiber 70% de l'expression de l'ARNm de la survivin (Sasaki *et al.*, 2000), inhibiteur naturel des caspases 3, 7 et 9. La régulation négative par stratégie antisens de XIAP permet aussi l'induction de l'apoptose chez les cellules de cancer ovarien (Olie *et al.*, 2000).

Restauration de l'activité des gènes suppresseurs de tumeur. Il a été démontré lors d'essais précliniques de phase I que, la réintroduction du gène p53 sauvage en complément d'une chimiothérapie induit une augmentation de la mort des cellules de NSCLC (Nemunaitis *et al.*, 2000). D'autres approches consistent à stabiliser le domaine de liaison à l'ADN de p53, qui lui permet de retrouver son phénotype sauvage (Foster *et al.*, 1999). D'autres GST ont été réintroduits, ainsi la combinaison de p16^{INK4} et p53 sauvage augmente l'effet pro-apoptotique (Xu *et al.*, 1996a). Enfin, chez plusieurs lignées cellulaires cancéreuses la réintroduction du gène FHIT par adénovirus, a permis l'induction de l'apoptose (Croce *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2000; Rothe *et al.*, 1995; Sard *et al.*, 1999; Sozzi *et al.*, 1998; Sozzi *et al.*, 1997).

Inhibition de l'activité de NFκB. L'inactivation de NFκB a montré son effet inducteur de l'apoptose chez les cellules cancéreuses (Cross *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1998). Cette cible paraît particulièrement intéressante du fait que la plupart des cellules saines séquestrent NFκB, dans le cytoplasme, qui est du fait l'inactive.

Inhibition des oncogènes c-myb et c-raf. La régulation négative par stratégie antisens a démontré une augmentation de l'apoptose, LR-3001 cible c-myb chez des cellules leucémiques *in vitro* et induit l'apoptose (Monia *et al.*, 2000). L'ODN ISIS 5132 lui induit l'apoptose chez des cellules épithéliales en ciblant l'oncogène c-raf (O'Dwyer *et al.*, 1999).

On peut donc voir que la mort cellulaire programmée est au centre de nombreuses stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Il reste malgré tout dans de nombreux cas des problèmes de toxicité envers les cellules saines. C'est pourquoi la poursuite des études visant à comprendre les mécanismes particuliers mis en place par les cellules cancéreuses pour échapper à l'apoptose, est une des priorités de la recherche pharmacologique.

II. LES CANCERS BRONCHIQUES

II.1 DEFINITION

Maladie encore rare au début du 20^{ème} siècle, le cancer du poumon est à l'origine de plus de 6 % des décès en France actuellement. Il y occupe le premier rang des décès par cancer alors que la France est considérée comme un pays à risque moyen parmi les pays occidentaux. Le cancer du poumon représente également la première cause de mortalité par cancer au niveau mondial, avec plus d'un million de décès dans le monde. Pour la mortalité comme pour l'incidence, la part masculine reste prédominante dans la plupart des pays du monde (80 % à 85 % des cas ou des décès). Mais l'un des faits marquants est la croissance plus rapide des nouveaux cas comme des décès chez la femme au niveau mondial, alors qu'une décroissance semble s'amorcer chez l'homme dans les pays industrialisés. Des inégalités existent entre catégories sociales, avec un taux de mortalité par cancer du poumon plus élevé dans le groupe des ouvriers et employés que dans celui des cadres supérieurs et professions libérales en France.

Parmi les facteurs de risque, le rôle du tabac n'est plus à démontrer : il est responsable d'environ 80 % des cancers du poumon, le pourcentage des cas attribuables au tabac chez la femme semblant un

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

peu moins élevé (46 % à 75 % selon les études) que chez l'homme (85 %). Le risque lié au tabac augmente avec le volume quotidien de la consommation, sa précocité, sa durée, l'intensité de l'inhalation de la fumée, et varie selon le mode de consommation (présence ou non d'un filtre sur les cigarettes, type de tabac, teneur en goudron). Depuis les années 1980, la notion de tabagisme passif a été admise : l'exposition d'un non-fumeur à la fumée de tabac augmente son risque de cancer bronchique de 30 % en moyenne. Cependant, comme les fumeurs ne développent pas tous un cancer du poumon, des études ont cherché à évaluer la « susceptibilité génétique » au cancer bronchique, sur la base des différences de métabolisme des substances toxiques inhalées par les fumeurs. A l'origine des cancers du poumon, on trouve également d'autres causes acquises, notamment au niveau professionnel. La législation française a ainsi reconnu certaines expositions professionnelles comme étant à l'origine de cancers bronchiques, parmi lesquelles on peut citer les rayonnements ionisants, l'arsenic, l'amiante, les brais et goudrons de houille. Des facteurs environnementaux (pollution atmosphérique) sont également incriminés et viennent majorer les risques chez les fumeurs.

Les facteurs de risque, comme la description épidémiologique, peuvent être déclinés selon l'aspect histologique des cancers du poumon. Cette différenciation s'avère particulièrement opérationnelle en matière de pronostic et de traitement : 80 % des cancers peuvent

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

être rassemblés sous le terme de « cancers bronchiques non à petites cellules » (CBNPC ou NSCLC : Non Small Cell Lung Carcinoma, cf. II.1.1) par opposition aux « cancers bronchiques à petites cellules » (CPC, cf.II.1.2).

Le cancer du poumon apparaît donc comme un cancer fréquent et de pronostic globalement médiocre. Le rôle du tabac dans sa génèse est démontré sans équivoque. La forte progression des cancers du poumon chez la femme, fait marquant de l'évolution de l'incidence des cancers en France au cours des 20 dernières années, est à relier à l'augmentation du tabagisme féminin et doit inciter à intensifier les campagnes d'éducation à la santé en direction de la population féminine. Cela, d'autant plus que les méthodes de dépistage proposées jusqu'à présent n'ont pas fait la preuve de leur efficacité à l'échelle de la population générale.

II.1.1 Le cancer bronchopulmonaire non à petites cellules (NSCLC)

Cette distinction est rendue nécessaire car les 2 types de cancer ont des caractéristiques totalement différentes : origine, temps de doublement, fréquence des métastases, sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Ainsi, les cancers bronchiques non à petites cellules ont une origine malpighienne, un temps de doublement plus lent de l'ordre de quelques mois, sont peu sensibles aux cytotoxiques,

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

le traitement curatif reposant sur la chirurgie. On distingue trois grands groupes de NSCLC :

les carcinomes épidermoïdes : 40 %

les adénocarcinomes : 40 %

les carcinomes à grandes cellules : 20 %

Parmi les NSCLC, les sous-types histologiques les plus fréquemment rencontrés chez l'homme sont les carcinomes épidermoïdes, alors que chez la femme les adénocarcinomes prédominent. Globalement, il semble que l'incidence relative des adénocarcinomes soit en augmentation. Les taux de survie sont médiocres (58 % de décès dans l'année qui suit le diagnostic), ils sont en moyenne de 10 % à 5 ans en Europe. En fonction du stade, les NSCLC peuvent être traités par chirurgie, par radiothérapie ou par chimiothérapie, ou par une combinaison de ces modalités thérapeutiques.

II.1.2 Carcinome bronchopulmonaire à petites cellules (SCLC)

Contrairement aux NSCLC les SCLC constituent une entité quasi homogène. Les SCLC appartiennent à un ensemble de carcinomes à différenciation neuro-endocrine. Les SCLC apparaissent comme des tumeurs très agressives, le plus souvent découvertes à des stades métastatiques ; elles sont chimiosensibles, mais la rémission est le plus fréquemment de courte durée et le taux de survie à 30 mois est d'environ 5 %. La survie est fonction du stade, elle est meilleure à 5

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

ans que pour les NSCLC (de 17 % à 60 %). Pour ces formes histologiques, la thérapie génique est en cours de développement.

II.2 EPIDEMIOLOGIE DES CANCERS BRONCHIQUES (CB)

II.2.1 Incidence et mortalité en France en 2000

Avec 27 743 nouveaux cas estimés en 2000 dont 83 % survenant chez l'homme. Il représente 10 % de l'ensemble des cancers incidents, et se situe, par sa fréquence, au 2^{ème} rang chez l'homme et au 4^{ème} rang chez la femme. Les taux d'incidence standardisés sont de 52,2 chez l'homme et de 8,6 chez la femme : le sex-ratio est de 6,1. Avec 27 164 décès, dont 83 % chez l'homme, ce cancer se situe au 1^{er} rang des décès par cancer : il représente 18,1 % de l'ensemble des décès par cancer. Les taux de mortalité standardisés sont de 48,9 chez l'homme et de 7,5 chez la femme.

II.2.2 Incidence et mortalité dans le monde

Quelques chiffres, tirés du Centre Internationale de Recherche sur le Cancer (CIRC), suffisent à donner le vertige. En effet, dans le monde, en l'an 2000, il y a eu : concernant les cancers bronchiques (CB), on a relevé : 12 % des cancers sont des CB, mais les CB sont responsables de 17 % des décès par cancer, 73 % sont des hommes, 27 % des femmes. Le nombre de nouveaux cas cancer s'élève à 10 055 551 et les CB atteignaient 1 103 119 avec une mortalité de 89%. La répartition mondiale est la suivante :

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

38 % en Asie de l'Est

6 % en Europe de l'Ouest

12 % en Europe de l'Est

6 % en Amérique du Nord

II.2.3 Variation des taux selon l'âge et le sexe

En 2000, l'âge médian lors du diagnostic est de 69 ans chez les hommes et de 74 ans chez les femmes, ce cancer étant rare avant 50 ans (moins de 5 % des cas). L'incidence augmente ensuite avec l'âge jusqu'à 75 ans, plus rapidement chez l'homme que chez la femme (Figure 15). Le taux d'incidence se stabilise ensuite chez l'homme, sans doute du fait d'un bilan diagnostique moins exhaustif chez les sujets âgés. La courbe des taux spécifiques par groupe d'âge pour la cohorte 1928 souligne l'effet de l'âge sur l'incidence dans les deux sexes. L'incidence est plus élevée chez l'homme que chez la femme dans tous les groupes d'âge, mais le sex-ratio diminue avec l'âge. La mortalité augmente régulièrement avec l'âge dans les deux sexes, de façon plus marquée après 70 ans chez les femmes que chez les hommes.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

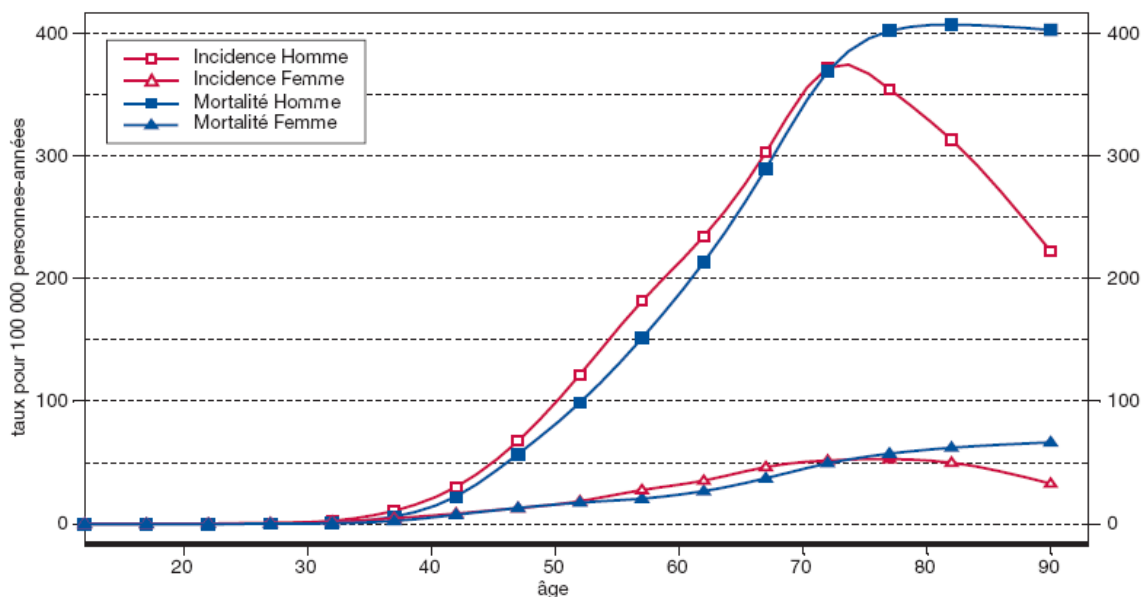


Figure 15 : Incidence et mortalité du cancer du poumon estimées par âge et par sexe pour l'année 2000 en France (Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000, Institut de veille sanitaire).

II.3 ETIOLOGIE

II.3.1 Tabagisme

Depuis les premières études épidémiologiques réalisées dans les années 50, des centaines de travaux ont confirmés le rôle pathogène et tout spécialement cancérigène du tabac. On sait que la fumée de tabac est un mélange très complexe d'environ 4000 éléments, dont une soixantaine ont été reconnus cancérigènes chez l'homme (Hecht, 2002a; Hecht, 2002b). Les plus puissants étant les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Depuis les travaux de Doll et Peto (1978), on sait que l'élément déterminant pour le risque cancérigène est plus la durée d'exposition au risque, que la quantité cumulée. A cet

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

impact prédominant de la durée du tabagisme s'ajoute l'effet propre de l'âge auquel survient l'initiation du tabagisme.

Le tabac est responsable de 99 % des cancers épidermoïdes, 95 % des NSCLC, 90 % des carcinomes à grandes cellules et 70 % des adénocarcinomes. L'adénocarcinome est aujourd'hui le plus fréquemment isolé et le plus fréquemment en cause chez les malades les plus jeunes, les femmes, les non fumeurs et les ex-fumeurs. L'effet bénéfique du sevrage, largement démontré à tous les âges (Doll *et al.*, 1994), est particulièrement marqué pour les cancers épidermoïdes et les cancers à petites cellules (Khuder & Mutgi, 2001). Malgré tout, le sevrage ne permet jamais, pour les risques de cancer, de revenir au niveau des non fumeurs (Peto *et al.*, 2000).

Au début des années 80 de nouvelles études ont permis de mettre en évidence l'apparition éventuelle de cancers bronchiques chez les fumeurs passifs (Hiriyama, 1981). La fumée environnementale est un mélange complexe d'une quarantaine de molécules cancérigènes (Brownson *et al.*, 2002). Selon les travaux les plus récents le tabagisme passif augmenterait le risque de cancer bronchique de 26% (Hackshaw *et al.*, 1997) et serait responsable de 2 à 3000 morts par cancer bronchique par an aux Etats-Unis, 1200 en Europe et plus d'une centaine en France. L'existence d'une relation effet-dose est démontrée, se traduisant par une augmentation de risque de 23%,

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

chaque fois que la consommation de cigarettes du conjoint augmente de 10 cigarettes (Hackshaw *et al.*, 1997).

II.3.2 Les facteurs professionnels

Un grand nombre de produits industriels ont été reconnus comme potentiellement cancérigènes (Steenland *et al.*, 1996). En Europe la part de risque de cancer du poumon chez l'homme attribuable à des facteurs professionnels a été estimée par le CIRC (Centre internationale de recherche sur le cancer) à 13%. En France l'incidence serait de 2800 à 6000 nouveaux cas par an de cancer du poumon induit par des facteurs professionnels.

II.3.2.1. L'amiante

L'amiante est une fibre naturelle diversement utilisée dans l'industrie, du fait de ses propriétés exceptionnelles d'isolation thermique et de résistance, elle représente le risque professionnel le plus fréquent. De nombreux secteurs professionnels peuvent se trouver en contact avec de l'amiante sous une de ses trois formes (serpentine, crocidolite ou amosite). Le rôle cancérigène de l'amiante a été reconnu dès les années 1950 par Richard Doll. Récemment l'Institut de veille sanitaire a estimé que 12% des cancers du poumon des hommes de plus de 55 ans et environ 7% de ceux de 35 à 55 peuvent être attribué à une exposition à l'amiante.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Les effets de l'amiante se multiplient à ceux du tabac (Hammond *et al.*, 1979). Toutes les fibres d'amiante sont en cause. Le mécanisme par lequel les fibres d'amiante favorisent la survenue de cancer bronchique n'est pas encore bien défini, l'amiante pourrait intervenir directement ou indirectement par l'intermédiaire de l'inflammation bronchique qu'il est susceptible de provoquer.

II.3.2.2. Autres causes

D'autres composés chimiques ou physiques ont été reconnus comme étant des agents cancérogènes pulmonaires. C'est le cas de l'arsenic, du nickel, de la silice, du chrome, du gaz moutarde, du bischlorométhyléther, ect...

II.3.3 Les autres facteurs

II.3.3.1. Les pathologies pulmonaires préexistantes

De nombreuses maladies respiratoires, qu'elles soient de types obstructifs ou restrictifs, ont été associées à un risque accru de cancer du poumon. La plus fréquente est la broncho-pneumopathie chronique obstructive, les fumeurs atteints par ce type de pathologie sont donc d'autant plus sensibles au développement d'un cancer. Les maladies fibrosantes et les cicatrices pulmonaires exposent également le malade à un risque accru de cancer bronchique, et notamment d'adénocarcinome.

II.3.3.2. Les radiations ionisantes naturelles

Une incidence élevée de cancer bronchique chez les mineurs d'uranium a été reconnue de longue date (McCann, 2005). C'est en fait le radon, formé à partir du radium au cours de la dégradation de l'uranium, qui par inhalation provoque des pathologies pulmonaires. Le radon est un émetteur de rayon α , hautement énergétique capable de provoquer de graves lésions de l'ADN de cellules de l'épithélium respiratoire. L'exposition au radon n'est plus aujourd'hui le seul problème des mineurs mais peut aussi toucher les particuliers au sein même de leur habitation (Pershagen *et al.*, 1994). Une étude aux Etats-Unis a montré que l'exposition au radon serait la deuxième cause de cancer bronchique après le tabagisme (Field, 2001).

II.3.3.3. La pollution atmosphérique

Il a été démontré que le taux de cancer bronchique est plus élevé en milieu urbain, les risques étant augmentés de 50% (Katsouyanni & Pershagen, 1997). Les HAP résultant des combustions de fuels fossiles pour le chauffage ou les transports pourraient être en cause. La responsabilité de l'apparition de cancer bronchique pourrait aussi être dû à la présence d'usine dégageant des fumées toxiques (Bessö *et al.*, 2003).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

II.3.3.4. Les prédispositions génétiques

Bien que les principaux facteurs influençant l'apparition de cancer bronchopulmonaire soient environnementaux, il existe une susceptibilité individuelle aux produits cancérigènes. En effet, une histoire familiale de cancer bronchique augmente le risque de survenue d'un cancer bronchique (Brownson *et al.*, 1997; Li & Hemminki, 2003). Les causes de ces différences individuelles ne sont pas encore bien déterminées, mais plusieurs hypothèses sont avancées concernant : les différences dans la capacité de métaboliser les cancérigènes, les capacités de réparation de l'ADN, mais aussi l'apoptose ou l'expression des différents gènes impliqués dans la transduction du signal à partir des récepteurs membranaires.

II.4 ANATOMIE PATHOLOGIQUE DES CANCERS BRONCHIQUES

Il existe quatre principaux types histologiques de cancer du poumon (Travis, 2002).

II.4.1 Les carcinomes épidermoïdes

Ce sont des tumeurs épithéliales malignes, avec différenciation malpighienne qui se présentent sous la forme d'une élaboration de kératine et/ou de ponts d'union intercellulaire. Elles se localisent préférentiellement dans une bronche lobaire ou segmentaire et se présentent volontiers sous la forme d'une tumeur végétante en « chou-

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

fleur » obstruant plus ou moins la lumière bronchique. En même temps que la tumeur progresse dans la lumière bronchique elle envahit la sous-muqueuse et le tissu péribronchique. Lorsque la tumeur est périphérique une nécrose centrale est habituelle ; lorsque la tumeur est proximale il s'y associe une pneumonie obstructive.

L'ultrastructure des formes bien différenciées comporte des cellules à cytoplasme abondant avec un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi et des mitochondries peu importantes mais des ribosomes et des filaments intermédiaires abondants. Ces derniers s'agrègent volontiers pour former des desmosomes. En immunohistochimie le marquage pour les cytokératines de haut poids moléculaire, et pour l'Epidermal growth factor (EGF) est fréquemment positif.

II.4.2 Le cancer bronchique à petites cellules

Il se localise généralement près des voies aériennes proximales. La tumeur est mal limitée et s'étend dans la sous-muqueuse et les tissus de connection. L'extension endobronchique est ici beaucoup plus rare et lorsqu'il existe une obstruction bronchique elle est généralement due à une compression extrinsèque. L'invasion des vaisseaux et des lymphatiques est très précoce et les relais ganglionnaires hilaires et médiastinaux sont inévitablement envahis. Le sous-type oat-cell est fait de cellules uniformes mesurant 1 à 1,5 fois la taille d'un lymphocyte. Le cytoplasme est quasi absent. Les noyaux sont hyperchromatiques, contenant une chromatine fine et dispersée et de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

petits nucléoles. Le sous-type intermédiaire est fait de cellules plus grandes, rondes ou polygonales, contenant un cytoplasme un peu plus abondant. Les noyaux sont moins hyperchromatiques. Les cellules de ces deux sous-types sont arrangées en rubans ou en rosettes. Ces tumeurs sont volontiers très nécrotiques. Parfois il existe deux composantes, l'une correspondant à un cancer bronchique à petites cellules typique, l'autre à un cancer épidermoïde ou à un adénocarcinome. Il s'agit alors de la variante composite.

En microscopie électronique, la présence de granules neurosécrétoires est très évocatrice du diagnostic de carcinome bronchique à petites cellules. En immuno-histochimie un marquage positif pour de nombreux peptides et hormones (ACTH, somatostatine, β HCG, prolactine, bombésine, Neuron Specific Enolase (NSE) ...) est observé.

II.4.3 L'adénocarcinome bronchique

L'adénocarcinome est divisé en 4 sous-groupes histologiques : acinaire, papillaire, bronchiolo-alvéolaire et carcinome solide avec formation de mucus. La signification clinique de cette subdivision est très discutée à l'exception de la forme diffuse de l'épithélioma bronchiolo-alvéolaire. L'adénocarcinome se localise volontiers en périphérie dans les régions souspleurales. Il est habituellement bien limité bien qu'il puisse exister des aspects spiculés, irréguliers. Lorsqu'il s'agit d'un bronchiolo-alvéolaire, il n'y a pas de destruction

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

de l'architecture alvéolaire et les alvéoles sont littéralement tapissés par les cellules cancéreuses ; radiologiquement l'image est alors celle d'une pneumonie. L'adénocarcinome montre une différenciation glandulaire de degré variable pouvant ou non former des papilles. En microscopie électronique l'aspect varie selon le degré et le type de différenciation. Les cellules sont columnaires ou cuboïdales avec des microvillosités de surface, un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi relativement abondant, et des granules sécrétoires. En immuno-histochimie le marquage pour l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) est très fréquent de même que pour les cytokératines de bas poids moléculaire.

II.4.4 L'épithélioma bronchique à grandes cellules

Il concerne essentiellement un diagnostic d'exclusion et s'applique aux tumeurs qui n'ont pas l'aspect d'un cancer bronchique à petites cellules et qui n'ont ni différenciation épidermoïde ni différenciation glandulaire. La proportion d'épithélioma à grandes cellules varie donc largement selon le degré de sophistication des colorations et des techniques anatomo-pathologiques et selon la quantité de tissu disponible pour le diagnostic. Il s'agit en général de tumeurs périphériques volumineuses. Histologiquement les tumeurs consistent en des nappes de cellules contenant un cytoplasme éosinophile abondant.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

II.5 LA CLASSIFICATION TNM

Le système de classification TNM de l'Union internationale contre le cancer (UICC) est le mode de classification le plus communément utilisé (Tableau 4). C'est, une méthode systématique utilisée pour décrire la taille, l'emplacement et l'étendue d'une tumeur. La lettre T (de l'anglais « tumor », tumeur) s'applique à la taille et à l'emplacement de la tumeur primitive. La lettre N (« node », ganglion) indique si des cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques qui drainent des liquides dans la partie du corps où est située la tumeur. La lettre M (« metastasis », métastase) indique si le cancer s'est propagé à d'autres régions de l'organisme, par exemple si des cellules d'une tumeur primitive au poumon ont migré jusqu'au cerveau.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Tableau 4 : Classification TNM des cancers bronchopulmonaires.

Tumeur primitive	
TX	Tumeur primitive ne pouvant être évaluée ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les crachats ou les sécrétions bronchopulmonaires mais non visibles aux examens radiologiques et endoscopiques.
TO	Pas de tumeur primitive retrouvée.
Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans signe d'envahissement plus proximal que la bronche lobaire (c.-à-d. pas dans la bronche souche).
T2	Tumeur ayant l'une des caractéristiques de taille ou d'extension suivantes : plus de 3 cm dans son plus grand diamètre, atteinte de la bronche souche, à 2 cm ou plus de distance de la carène, envahissement de la plèvre viscérale, associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive qui s'étend à la région hilare mais pas à l'ensemble du poumon.
T3	Tumeur quelle que soit sa taille avec extension directe soit à la paroi thoracique (y compris les tumeurs de l'apex), au diaphragme, à la plèvre médiastinale ou au feuillet pariétal du péricarde; ou tumeur de la bronche souche située à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir; ou associée à une atélectasie ou à une pneumopathie obstructive intéressant l'ensemble du poumon.
T4	Tumeur quelle que soit sa taille envahissant soit le médiastin, le coeur, les gros vaisseaux, la trachée, l'oesophage, le corps vertébral, la carène; nodule(s) satellite(s) séparé(s) dans le même lobe; tumeur associée à un épanchement pleural malin.
NX	Atteinte ganglionnaire régionale ne pouvant être établie.
N1	Métastases aux ganglions péribronchiques ou hilaires homolatéraux, y compris par extension directe.
N2	Métastases aux ganglions médiastinaux homolatéraux ou sous-carénaires.
N3	Métastases dans les ganglions médiastinaux controlatéraux, les ganglions hilaires contro-latéraux, les ganglions scalènes homolatéraux ou controlatéraux, ou les ganglions sus-claviculaires.
Métastase à distance	
MX	Atteinte métastatique ne pouvant être établie.
M0	Aucune métastase à distance.
M1	Métastases à distance, y compris nodule(s) dans un autre lobe (homolatéral ou controlatéral).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Tableau 5 : Classification des sous catégories TNM par stade.

Stades	Classification TNM		
Cancer occulte	TX	NO	MO
Stade 0	Tis	NO	MO
Stade 1A	T1	NO	MO
Stade 1B	T2	NO	MO
Stade 11A	T1	N1	MO
Stade 11B	T2	N1	MO
	T3	NO	MO
Stade 111A	T1	N2	MO
	T2	N2	MO
	T3	N1, N2	MO
Stade 111B	T1-4	N3	MO
	T4	NO-3	MO
Stade 1V	T1-4	NO-3	M1

II.6 BIOLOGIE DU CANCER BRONCHOPULMONAIRE NON A PETITES CELLULES

Depuis plusieurs années le Laboratoire de Pharmacologie Marine travail principalement sur un modèle cellulaire de cancer bronchopulmonaire non à petite cellule, mise au point en 1991 (Roussakis *et al.*, 1991). L'apparition d'une tumeur cancéreuse du poumon est la résultante d'un long processus de transformation de la cellule normale vers la cellule cancéreuse qui peu prendre plusieurs années (Coll *et al.*, 1992). Cette transformation est subdivisée en quatre étapes principales qui témoignent du niveau de modification génétique de la cellule. Une correspondance entre l'existence du continuum lésionnel, et la carcinogenèse par étapes a été établie par l'étude moléculaire systématique des lésions précancéreuses

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

bronchiques. Ainsi, l'accumulation progressive d'altérations géniques accompagne l'augmentation du potentiel prolifératif et invasif des lésions précancéreuses, et détermine la transition vers des lésions au potentiel évolutif plus important (Chung *et al.*, 1995; Mao *et al.*, 1997).

II.6.1 Les étapes de la carcinogenèse

La carcinogenèse pulmonaire peut donc être divisée en trois phases successives : l'initiation, la promotion et la conversion, suivi d'une dernière étape qui voit apparaître la tumeur elle-même, la progression (Figure 16).

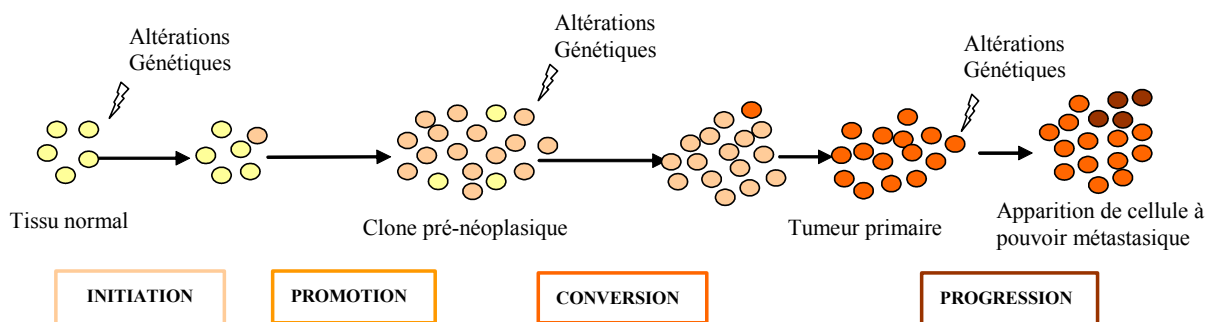


Figure 16 : Représentation schématique des différentes étapes de la carcinogenèse pulmonaire (Yokota, 2000).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

L'initiation résulte de mutations génétiques irréversibles de la cellule qui vont se transmettre aux cellules filles et persister dans l'organisme.

La promotion est l'expansion clonale des cellules initialisées qui manifestent en général un taux de croissance accru. Ainsi, la survenue de mutation étant directement proportionnelle au taux de division, cette étape contribue à l'augmentation du nombre de mutations génétiques de la cellule.

La conversion correspond à la transformation proprement dite des cellules pré-néoplasiques en cellules malignes, dû à l'accumulation de nouvelles mutations.

Enfin, la progression désigne la phase où une cellule maligne sous l'influence de nouvelles mutations génétiques, va être capable d'envahir de nouveaux tissus pour former des métastases.

II.6.2 Les altérations génétiques

La présence de certaines anomalies cytogénétiques, récurrentes dans les NSCLC (Shijubo *et al.*, 2003), a été montrée dans les lésions pré-néoplasiques les plus précoces, voire dans l'épithélium morphologiquement normal de sujets fumeurs. Aucune de ces anomalies cytogénétiques ne peut être considérée comme spécifique d'un sous-type histologique donné. Ces mutations génétiques ont guidé la recherche des gènes impliqués dans la carcinogenèse bronchique.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Les délétions chromosomiques sont responsables de l'inactivation de gènes récessifs, inactivés par la délétion d'un allèle (perte d'hétérozygotie, LOH), et la perte de l'allèle restant (par mutation, délétion, voire méthylation du promoteur entraînant un arrêt de la transcription du gène). Ils sont nommés gènes suppresseurs de tumeurs (cf. I.2.2.2.3), leur activité normale vise à freiner la prolifération cellulaire, ou induire l'apoptose, l'inactivation entraîne donc une dérégulation de la prolifération.

Plus rarement, dans le cancer bronchique, sont observés des gains de matériel génétique, avec des amplifications de segments chromosomiques (amplicons), au niveau desquels siègent des gènes dominants proto-oncogéniques, le plus souvent codant pour des récepteurs à des facteurs de croissance (epidermal growth factor receptor, EGF-R, erbB2/neu) ou des régulateurs nucléaires du cycle cellulaire (cyclineD1, HNF3 α /FOXA1) ou de l'apoptose, (p63AIS). L'altération de ces gènes permet à la cellule d'acquérir de nouvelles compétences :

L'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance qui permet aux cellules de rester dans un état de prolifération active. Ces facteurs de croissance stimulent les cellules tumorales par l'intermédiaire de récepteurs membranaires générant eux-mêmes des cascades multiples et parallèles de messagers intracellulaires, via des molécules de transduction du signal.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

L'acquisition d'un potentiel réplcatif illimité par division illimitée des chromosomes.

La capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée (apoptose).

L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs provenant du milieu extracellulaire (cytokines) via des récepteurs membranaires.

La capacité à induire un réseau de néovaisseaux permettant un apport d'oxygène et de nutriments aux cellules tumorales : c'est l'angiogénèse.

L'acquisition d'un phénotype « mobile » et invasif, donnant à la cellule tumorale la capacité d'échapper de son tissu d'origine : c'est le pouvoir métastasant.

II.6.3 Les gènes impliqués

Plusieurs gènes ont aujourd'hui été identifiés pour leur implication dans le développement des cancers bronchopulmonaires (Tableau 6)

Tableau 6 : Principales anomalies moléculaires observées dans les carcinomes non à petites cellules (Dy & Adjei, 2002; Rosell *et al.*, 2004b; Sozzi, 2001).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Gènes	Anomalies	Occurrences
K-Ras	Mutation	30% (adénocarcinome)
Myc	Amplification	5-10%
ERB-B1	Expression	40-80%
ERB-B2	Expression	30% (adénocarcinome)
Kit/SCF	Coexpression	15%
3p LOH	Délétion	50-90%
4p LOH	Délétion	20%
4q LOH	Délétion	30%
8p21-23	Délétion	80-100%
p53	Délétion/mutation	50%
RB	Délétion/inactivation	15-20%
INK4a	Délétion/mutation/inactivation	60-70%
Microsatellites	Instabilité	22%
Bcl-2	Expression	10-35%
VEGF	Hyperexpression	
Téломérase	Activité	80-85%
Métalloprotéase	Expression	65%
COX 2	Expression	70% (adénocarcinome)

II.6.3.1. La voie de signalisation RB/p16/p15/cycline D1

Le gène du rétinoblastome a été un des premiers gènes suppresseurs de tumeur identifié dans le cancer du poumon (Harbour *et al.*, 1988; Xu *et al.*, 1991; Yokota *et al.*, 1989). La perte d'expression du gène RB résulte principalement de délétion chromosomique (Reissmann *et al.*, 1993).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Dans les cas où le gène RB reste sauvage, il a été démontré une altération de CDKN2A/p16, qui contrôle la phosphorylation de RB (Otterson *et al.*, 1994), conduisant à une prolifération cellulaire anarchique. Contrairement à RB, p16 est généralement altéré par hyperphosphorylation de l'ADN, empêchant l'expression de l'ARNm et donc de la protéine (Otterson *et al.*, 1995), dans une moindre mesure il peut être aussi altéré par délétion du locus INK4a (Kim *et al.*, 1997).

p15^{INK4b} est un autre gène inhibiteur de CDK, localisé près de p16 sur le chromosome 9, et est altéré dans 20% des NSCLC (Okamoto *et al.*, 1995).

Les cyclines ont aussi été identifiées comme cible de mutation cancérogène. En effet, la cycline D1 est un proto-oncogène, amplifié en 11q13 dans 17 % des carcinomes bronchiques non à petites cellules (Schauer *et al.*, 1994). De plus une hyperexpression de la protéine, sans amplification génique, est détectée en immuno-histochimie dans des lésions pré-néoplasiques et dans 40 à 60 % des NSCLC, favorisant la prolifération de ces cellules (Ratschiller *et al.*, 2003).

II.6.3.2. La voie de signalisation p53/p14^{ARF}/MDM2

p53 représente le gène le plus fréquemment inactivé par mutation d'un allèle et délétion de l'autre, dans les NSCLC (Mitsudomi *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 1989). Cette inactivation associée à

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

celle de RB est précoce au cours de la carcinogenèse par étape (Sozzi *et al.*, 1992; Sundaresan *et al.*, 1992), puisqu'elle est détectée dès le stade de métaplasie malpighienne (lésion à l'origine des épidermoïdes) ou d'hyperplasie alvéolaire atypique (lésion précurseur des adénocarcinomes). L'absence de protéine p53 fonctionnelle permet à des cellules comportant pourtant des dommages à l'ADN de se diviser, transmettant aux cellules filles des mutations. Au fil des divisions, ces mutations vont s'accumuler, conférant aux cellules mutées un avantage sélectif de prolifération, et participant à l'acquisition du phénotype cancéreux complet. Les mutations de p53 constituent un facteur pronostique défavorable dans les NSCLC de stade I et II, et de façon plus significative dans les adénocarcinomes que dans les épidermoïdes.

L'épidémiologie moléculaire a montré la fréquence de mutations de type, transversions $G \rightarrow T$, ce qui est typique de l'activité des carcinogènes de type benzoapyrène, capables d'interagir directement avec la molécule d'ADN (Denissenko *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 2002). Il est de plus à noter que, l'amplification du gène MDM2, qui induit l'export nucléaire et la dégradation de p53 par le protéasome (Kamijo *et al.*, 1998), et/ou la perte du gène p14^{ARF}, qui interagit et séquestre MDM2 dans le nucléole (Gullo *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 1999), peuvent contribuer à l'accélération de l'inactivation de p53 (Sherr & Weber, 2000).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Le gène p53 contrôle la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, ce qui explique l'importance de son inactivation dans le processus de cancérisation (Yamaguchi *et al.*, 2001). Des essais de thérapie génétique, réintroduisant le gène p53 sauvage, ont permis d'inhiber la croissance de cancer du poumon (Swisher *et al.*, 1999).

II.6.3.3. Les gènes de la famille Bcl-2

Une surexpression protéique de Bcl2 a été décrite dans 10 à 30 % des cancers bronchiques non à petites cellules (Apolinario *et al.*, 1997; Pezzella *et al.*, 1993), induisant la stabilisation du PTPC et l'échappement des cellules à l'apoptose. L'expression du gène pro-apoptotique Bax est contrôlé par p53 et donc régulièrement altérée dans les cancers bronchopulmonaires. Les gènes de la famille Bcl-2 sont donc des cibles thérapeutiques privilégiées (Lin *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2005).

II.6.3.4. Le gène PTEN

PTEN est une protéine/lipide phosphatase, qui inactive la kinase AKT, qui est elle-même impliquée dans la promotion du système antiapoptotique Bad/Bcl2 (Crowell & Steele, 2003; Luo *et al.*, 2003). Le promoteur de PTEN est hyperméthylé dans moins de 6 % des NSCLC avec perte d'expression de la protéine, engendrant la perte du contrôle négatif sur AKT (Brognard *et al.*, 2001), et donc le signal de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

survie cellulaire est continuellement activé (Soria *et al.*, 2002). De plus, une délétion hétérozygote est observé dans 50% des NSCLC, et pourrait contribuer à une altération des fonctions du gène (Okami *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1999).

II.6.3.5. Le gène Ras

Ras est un transducteur de signaux extracellulaire, il est muté dans 10 à 30% des NSCLC, sous sa forme active lié au GTP (Mitsudomi *et al.*, 1991; Rodenhuis & Slebos, 1990). La conséquence en est une activation constitutive, non régulée des cascades de signalisation en aval des récepteurs membranaires aux facteurs de croissance, sans que ces récepteurs aient besoin d'être stimulés, ce qui rend les cellules indépendantes de la présence dans le milieu extracellulaire de facteurs de croissance. Il semble que les mutations du gène Ras interviennent assez tard dans le développement du cancer bronchopulmonaire (Sugio *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1996).

II.6.3.6. Le gène RASSF1 (Ras association domain family protein 1)

Le RASSF1 est décrit comme un gène suppresseur de tumeur, situé sur le chromosome 3p21.3, dont la protéine présente un domaine de liaison à la protéine Ras (Burbee *et al.*, 2001; Kuzmin *et al.*, 2002). Une délétion homozygote d'une région de 120 kb, ainsi qu'une hyperméthylation du promoteur est fréquemment observée dans le

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

cancer bronchique (Dammann *et al.*, 2000). Il a été proposé que RASSF1 soit impliqué dans le processus induction apoptotique via Ras (Vos *et al.*, 2000), ainsi que dans la régulation du cycle cellulaire (Shivakumar *et al.*, 2002). RASSF1 existe sous différentes isoformes, RASSF1A qui peut former des homodimères ou des hétérodimères avec RASSF5 (ou NORE1)(Ortiz-Vega *et al.*, 2002). Le promoteur de Nore1A est lui aussi méthylé dans 24 % des NSCLC avec perte d'expression de la protéine (Vos *et al.*, 2003).

II.6.3.7. Le gène erbB1/EGF-R (Epidermal growth factor receptor)

Chez 60 à 80 % des carcinomes bronchiques non à petites cellules (et près de 100 % des épidermoïdes) le récepteur membranaire à l'EGF est surexprimé (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993; Rusch *et al.*, 1993; Rusch *et al.*, 1995). De plus, beaucoup de ces tumeurs sécrètent aussi le facteur de croissance EGF, ce qui réalise une boucle autocrine, stimulant continuellement le récepteur. La stimulation de ce récepteur entraîne un signal constitutif de prolifération cellulaire. L'EGF est aussi un puissant agent proangiogénique stimulant la prolifération des cellules endothéliales et la formation de néovaisseaux. L'anomalie génétique la plus fréquemment en cause pour l'EGF-R, est une amplification du gène créant un grand nombre de copies. Des mutations activant le domaine kinase intracellulaire des récepteurs à

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

l'EGF ont aussi été décrites dans 16 % des carcinomes épidermoïdes bronchiques et 40 % des cas avec hyperexpression du récepteur (Garcia de Palazzo *et al.*, 1993). Plus récemment, un nouveau type de mutations (mutations ponctuelles faux sens ou délétions) a été décrit, intéressant tout le domaine de fixation de l'ATP du site catalytique intracellulaire (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004).

II.6.3.8. Le gène erbB2/Her-2

erbB2 est un récepteur tyrosine kinase de la famille du récepteur à l'EGF. Il n'a pas été décrit de ligand spécifique pour c-erbB2. Son action s'exercerait par sa faculté de dimérisation avec les autres membres de la famille, agissant ainsi comme caisse de résonance du signal. erbB2 est surexprimé dans 20 % des NSCLC, quasi exclusivement des adénocarcinomes (Rachwal *et al.*, 1995). Cette surexpression est liée à une amplification génique. Les signalisations en aval de erbB2 sont responsables d'un potentiel prolifératif accru, d'un pouvoir invasif et d'un phénotype angiogénique accru. Le niveau d'expression de ce récepteur sur la membrane plasmique apparaît cependant très inférieur à celui du récepteur à l'EGF d'où, vraisemblablement, un effet plus limité de l'inhibition de ce récepteur comparé à l'inhibition du récepteur à l'EGF.

II.6.3.9. Le gène FHIT (Fragile histidine triad)

FHIT est un gène suppresseur de tumeur positionné sur le bras court du chromosome 3. Une délétion homozygote au niveau d'un point de translocation engendre la perte d'expression de ce gène (Sozzi, 2001). FHIT semble être impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un stress (Brenner *et al.*, 1997; Sard *et al.*, 1999). Des altérations du gène FHIT, concernant principalement la région située entre les exons 4 et 8, ont été retrouvées dans environ 47% des NSCLC. L'absence de la protéine dans des lésions précancéreuses indique que les altérations du gène FHIT interviennent dans les premières phases du développement cancéreux (Sozzi *et al.*, 1997). Il a été démontré que le remplacement de FHIT dans des lignées cellulaires supprime la tumorigénicité *in vitro* et *in vivo* (Ji *et al.*, 1999; Siprashvili *et al.*, 1997).

II.6.3.10. Activation de la télomérase

L'activation de la télomérase permet d'éviter, le raccourcissement des télomères (extrémités des chromosomes) intervenant à chaque réplication du pool génétique lors de la division cellulaire. Ce raccourcissement des télomères est l'horloge biologique qui permet aux cellules de « compter » leurs divisions et ainsi de ne pas croître indéfiniment. En effet, lorsque le télomère atteint une taille critique, la cellule rentre en mort programmée.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Il a été démontré l'activation de la télomérase chez de nombreux cancers, celle-ci permettant ainsi aux cellules de proliférer indéfiniment. L'activation de la télomérase a été mise en évidence dans 85% des NSCLC (Hiyama *et al.*, 1995). De plus, cette activation semble intervenir dans les premiers stades du développement cancéreux (Yashima *et al.*, 1997), indiquant son important rôle dans le développement tumoral. La télomérase peut être une cible thérapeutique, puisque son inhibition peut induire une mort par apoptose indépendante de p53.

II.7 TRAITEMENTS

Il y a globalement trois armes thérapeutiques spécifiques pour le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

II.7.1 La chirurgie

Chaque fois que possible une intervention sera réalisée. Celle-ci n'est malheureusement possible que dans moins de 25 % des cas. L'intervention n'est envisageable que dans les stades I, II et certains stades IIIA (Tableau 5). Dans ces cas, un bilan d'opérabilité générale est réalisé comportant des E.F.R. (Exploration fonctionnelle respiratoire) et une scintigraphie pulmonaire de perfusion (dont les résultats couplés permettront de prédire la capacité vitale et le Volume expiré maximal en une seconde « VEMS » postopératoire), un examen

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

cardio-vasculaire approfondi notamment au-delà de 60 ans avec entre autre la réalisation d'un échoflow carotidien. Enfin, les fonctions rénale et hépatique seront vérifiées. L'âge limite pour une intervention est généralement fixée à 75 ans mais cette limite n'a rien d'absolu, l'âge physiologique étant plus important. Une chimiothérapie préopératoire est de plus en plus fréquemment réalisée. Selon les cas une lobectomie, une bilobectomie, une pneumonectomie sera réalisée. En cas de nécessité, l'exérèse peut être élargie dans une certaine mesure à la paroi ou au péricarde.

Dans tous les cas la chirurgie doit comprendre un curage ganglionnaire. La chirurgie ne doit être envisagée que dans un but curateur, d'où une extrême rigueur dans les indications. Les complications sont importantes (VEMS -20 % dans les lobectomies, dans les pneumonectomies -50 %), voire fatales (1 à 3 % dans les lobectomies ; 5 à 8 % dans les pneumonectomies, chez les patients de plus de 70 ans). En fait, seul un patient sur quatre sera opéré.

II.7.2 La radiothérapie

Lorsque ces stades précoces ne peuvent faire l'objet d'une chirurgie pour des raisons de contre-indication médicale ou de refus, on propose au patient une irradiation médiastino-tumorale lorsque le volume à irradier le permet. Les stades IIIA inopérables et les stades IIIB font généralement l'objet d'une radiothérapie médiastino-tumorale.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

La dose administrée doit être au moins égale à 60 Gray (Gy) en cas de lésions macroscopiques (sur la tumeur et les adénopathies) et de 45 Gy sur le médiastin supérieur et moyen. Elle se fait classiquement en une séance de 2 Gy par jour, cinq jours par semaine pendant 6 semaines (soit 30 séances sur 6 semaines). Appliquée aux malades inopérables, non métastasés d'emblée, elle ne donne qu'une survie d'environ 5% à 5 ans. En post opératoire en cas de N+ médiastinal on utilise habituellement une dose de 45-50 Gy. Les nouvelles techniques permettent une irradiation respectant davantage les tissus sains avoisinants et peuvent ainsi faire appel après dosimétrie très précise « conformationnelle » à plusieurs portes d'entrée du rayonnement et ce d'autant plus que le volume sera plus complexe. De ce fait, les doses délivrées à la tumeur peuvent être portées à plus de 70 Gy.

Cependant, la radiothérapie est à l'origine de toxicités spécifiques avec essentiellement une dysphagie survenant généralement à partir de la 3^{ème} semaine d'irradiation. On peut également voir se développer une pneumonie radique de façon aiguë mais plus fréquemment de façon retardée à partir du 2^{ème} mois après l'irradiation.

II.7.3 La chimiothérapie

On associe une chimiothérapie à la radiothérapie. Celle-ci comporte du cis-platinum associé à un alcaloïde de la pervenche (navelbine) ou du carboplatine associé à du Taxol. La chimiothérapie est administrée soit avant la radiothérapie (2 ou 3 cycles espacés de 28 jours) ou

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

concomitamment à la radiothérapie. Dans ce dernier cas, la toxicité notamment digestive est majorée. Certains stades IIIA jugés inopérables dans un premier temps sont traités par chimiothérapie première suivie d'une réévaluation. Un certain nombre de patients sont ainsi « rendus opérables » mais des études randomisées doivent être réalisées pour confirmer le bien fondé de cette attitude dont la faisabilité est maintenant prouvée. Les stades IV font l'objet d'une chimiothérapie lorsque l'index d'activité le permet. Cette chimiothérapie est généralement à base de sels de platine associée à de la navelbine ou de la gemcitabine ou encore à du taxol. Les taux de réponse s'établissent autour de 30 à 35 % seulement mais il existe un bénéfice indéniable bien que modeste sur la survie.

II.7.4 Les résultats du traitement

Dans le cancer bronchique non à petites cellules les résultats sont très conditionnés par la résécabilité donc par l'extension de la maladie. Dans le cancer bronchique à petites cellules la médiane de survie des formes limitées à l'hémithorax est de 16 à 20 mois avec plus de 30 % de survivants à deux ans et 6 à 10 % de survivants à 5 ans. La médiane de survie des patients ayant une forme disséminée au-delà de l'hémithorax (stade IV) est de 8 à 12 mois avec virtuellement aucun survivant au-delà de 30 mois.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

II.8 LES NOUVELLES STRATEGIES

II.8.1 Les molécules naturelles

Les plantes sont utilisées comme médicaments depuis des milliers d'années dans les médecines traditionnelle comme en Chine ou en Afrique (Samuelsson, 2004). Les herbes médicinales ont été utilisées de différentes façon au cours de l'histoire (Balick & Cox, 1997). Aujourd'hui, les plantes sont utilisées pour l'extraction de principes actifs, ce travail a particulièrement commencé avec l'isolation au début du 19^{ème} siècle de la morphine. En effet, l'utilisation du potentiel bioactif d'extraits de certaines plantes a commencé avec la production de drogues, ou l'isolation de toxines (Heinrich & Gibbons, 2001).

Aujourd'hui, malgré la découverte de nouvelles technologies en chimie de synthèse, permettant la création de nouveaux composés, les sources naturelles restent le principal fournisseur de nouveaux médicaments et de nouvelles structures chimiques (Butler, 2004; Harvey, 2000; Newman *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2003). De nouvelles sources potentielles touchant tous les règnes du monde vivant sont aujourd'hui à l'étude (Tulp & Bohlin, 2004), avec un intérêt tout particulier pour le milieu marin (Jensen *et al.*, 2003; Mayer & Hamann, 2004; Mayer & Gustafson, 2004; Proksch *et al.*, 2002).

L'OMS aujourd'hui estime que 80 % de la population de la planète a régulièrement recours à des médecines traditionnelles à base de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

plantes. Ainsi, la médecine traditionnelle chinoise utilise actuellement plus de 5 000 plantes, dont un millier de manière courante.

Aux États-Unis et en Europe de l'ouest, on estime à 25 % la proportion des prescriptions médicales contenant des ingrédients extraits de plantes supérieures. Francesca Grifo a montré que 118 des 150 médicaments les plus prescrits aux États-Unis étaient originellement dérivés d'organismes vivants, 74% de plantes, 18 % de champignons, 5 % de bactéries et 3 % du seul *Bothrops* (serpent venimeux). Neuf des dix premiers sont basés sur des produits naturels issus de plantes.

Dans le domaine de la thérapie anticancéreuse, la recherche de substances actives d'origine végétale a permis la découverte d'une nouvelle classe de molécules, les taxoïdes, taxol et taxotère. Le taxol, molécule extraite de l'écorce de l'If de Californie utilisée dans le traitement du cancer du sein, a été découvert aux États-Unis et le mécanisme de son action antitumoral, inhibition du désassemblage des microtubules constituant le faisceau mitotique en tubuline, a été identifié en 1979. Mais son exploitation nécessitait l'abattage des arbres, dont la croissance est très lente (un arbre centenaire ne fournit qu'un gramme de taxol, soit la moitié de la quantité nécessaire pour le traitement d'une seule personne pendant un an). Il fallu donc recourir à l'utilisation du taxol hémisynthétique, fabriqué en laboratoire.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Plus récemment, des chercheurs à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS à Gif-sur-Yvette, ont réussi à synthétiser le taxol à partir d'un précurseur présent dans les feuilles de l'If européen. Celles-ci présentent l'avantage de constituer une source renouvelable puisque le prélèvement s'effectue sans abattre l'arbre. En outre, le « test tubuline » a permis de découvrir, parmi les intermédiaires de synthèse, le taxotère, qui possède une activité supérieure à celle du taxol.

II.8.1.1. Le milieu marin nouvelle source de molécules originales

Le monde marin est resté longtemps inexploré du point de vue ressource pharmacologique. L'étude des molécules biologiques d'origine marine n'a véritablement commencé que dans les années 50 (Bergmann & Burke, 1955) et s'est intensifiée ces 20 dernières années (Blunt *et al.*, 2003; Carte, 1993; Faulkner, 1991; Fenical, 1997). Dans le domaine marin, les substances nouvelles ayant une activité biologique potentiellement intéressante seraient au moins 100 fois plus nombreuses que celle des organismes terrestres. Ainsi, la description de quelques 3000 à 4000 substances nouvelles synthétisées par des organismes marins (Mayer & Hamann, 2004; Mayer & Gustafson, 2004), algues, invertébrés ou microorganismes, a permis de caractériser près de 500 nouvelles substances actives :

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

antitumorales, antivirales, immunomodulatrices, antibiotiques, antifongiques, etc... Actuellement, trois médicaments d'origine marine sont commercialisés : un antibiotique (la céphalosporine®), un antiviral (la vidarabine®) et un antitumoral (la cytarabine®).

Tableau 7 : Exemples de molécules d'origine marine à potentiel anticancéreux en phases d'essais cliniques (Les médicaments de la mer, par J.M. Kornprobst).

Molécule	Essai	Origine	Classe chimique
Bryostatin 1	Phase II	<i>Bugula neritina</i> (bryozoaire)	Macrolide
Dehydrodidemimin B	Phase II	<i>Aplidium albicans</i> (ascidie)	Depsipeptide
Didemnin B	Phase II	<i>Trididemmun solidum</i> (ascidie)	Depsipeptide
Dolastatin 10	Phase II	<i>Dolabella auricularia</i> (mollusque)	Tétrapeptide
Ecteinascidin 743	Phase II	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (ascidie)	Alcaloïde
Squalamine	Phase II	<i>Squalus acanthias</i> (poisson)	Aminostérol sulfaté
Discodermolide	Phase I	<i>Discodermia dissoluta</i> (spongiaire)	Macrolide
GST-21	Phase I	<i>Amphiporus lactifloreus</i> (némerte)	Alcaloïde
KRN 7000	Phase I	<i>Agelas mauritiana</i> (spongiaire)	Glycosphingolipide

La grande diversité des productions biochimiques marines s'est développée au cours de millions d'années d'évolution des océans sur la base de deux poussées vitalistes fondamentales, comme la défense et l'adaptation. Ceci est le résultat de la présence d'un grand nombre d'espèces vivantes dont la coexistence dans les différents écosystèmes est possible grâce à plusieurs systèmes d'interactions. Dans ces processus, la chimie joue un rôle crucial; en effet, tous les organismes vivants possèdent une importante diversité biochimique nécessaire à leur survie. Ils peuvent élaborer des composés, appelés « métabolites

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

secondaires » qui sont impliqués dans les interactions inter et intraspécifiques, ils ont un rôle de médiateur chimique. Ces métabolites ont des structures originales très diversifiées auxquelles est régulièrement liée une activité biologique.

Le champ d'investigation est immense, il faut donc aujourd'hui faire des choix quant aux organismes à étudier afin de cibler ceux qui sont susceptibles de produire des composés bioactifs. Les organismes sans moyens mécaniques de défense (coquilles, camouflages divers, capacité de déplacement rapide, ...), ne peuvent se protéger des prédateurs que par l'utilisation de véritables armes chimiques, en général des sécrétions destinées à repousser ou à empoisonner un agresseur éventuel. Les organismes les plus simples qui ont su coloniser une immense diversité de milieux, allant des plus tempérés aux plus extrêmes, ont dû développer une grande diversité de voies métaboliques impliquant une importante production biochimique. C'est pourquoi les microorganismes marins attirent tous particulièrement le monde de la chimie marine (Fenical & Jensen, 1993; Schwartzmann *et al.*, 2001). Dans ce cadre les microalgues (le phytoplancton), qui sont reconnues depuis longtemps comme potentiels producteurs de toxines et qui sont présentes dans toutes les régions du globe, semblent des organismes parfaitement adaptés à la recherche de composés bioactifs (Skulberg, 2000).

Les microalgues

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Dans le milieu marin, ces organismes constituent le phytoplancton qui est à la base de toute la chaîne alimentaire et supporte une production de ressources renouvelables exploitées de l'ordre de 100 millions de tonnes par an. Par leur taille de l'ordre de quelques μm , leur durée de génération de l'ordre de la journée, leur diversité taxonomique (40 000 espèces, dont 100 étudiées et 10 exploitées) et donc biochimique, ils peuvent donner lieu à de nouvelles applications scientifiques et économiques. Leurs particularités biochimiques les plus marquées concernent les lipides, les polysaccharides, les pigments protéiques et caroténoïques, les enzymes et les substances bioactives. Ces molécules intéressent de nombreuses applications dans les domaines de l'alimentation, la pharmacologie, la cosmétique, etc ...

C'est pourquoi les microalgues sont aujourd'hui au centre de l'attention de nombreux scientifiques (Shimizu, 1996; Shimizu, 2000; Shimizu, 2003). En effet il semble clair, que ces organismes à fort potentiel biochimique et facile à produire, peuvent répondre aux exigences du monde industriel et notamment de l'industrie pharmaceutique. De plus les microalgues étant isolées et produites de manière contrôlées présentent d'autres intérêts quant à leur utilisation en recherche :

Les microalgues étant produites de manières contrôlées seront disponibles dans un état physiologique constant. En effet il est indispensable pour permettre une reproductibilité des résultats des

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

tests pharmacologiques, d'avoir accès une grande quantité de matière première homogène. En effet, il est su depuis longtemps que les variations temporelles et géographiques ont une influence sur la physiologie d'un organisme vivant et donc sur sa production biochimique. On sait de plus que les molécules bioactives sont régulièrement des métabolites secondaires (Kelecom, 2002), produits dans des conditions particulières en très faible quantité. C'est pour cela que la production d'une biomasse constante et contrôlée est indispensable pour permettre la découverte et l'isolation de molécules d'intérêts.

L'autre point important de l'intérêt de cette ressource de biomasse disponible en laboratoire, concerne la problématique écologique. En effet, trop souvent la recherche pharmacologique s'est intéressée à des organismes rares, en faible quantité dans la nature. Or, on sait aujourd'hui que la production d'un nouveau médicament issue d'une molécule naturelle va consommer une grande quantité de l'organisme producteur. Ainsi, il est parfois difficile de faire correspondre les exigences de l'industrie pharmaceutique avec la protection écologique d'une espèce vivante. La chimie de synthèse n'étant pas toujours capable de palier au problème de la quantité de molécule disponible, l'utilisation d'un organisme produit à volonté semble une bonne alternative.

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

II.8.2 Les cibles moléculaires du cancer bronchopulmonaire

Malgré les avancées dans les domaines de la chimiothérapie, de la radiothérapie et de la chirurgie le taux de survie des patients traités pour un cancer bronchopulmonaire non à petite cellule n'excède pas 15% (Arriagada *et al.*, 2004; Mountain, 1997; Winton *et al.*, 2005), ceci étant principalement due au problème d'invasion métastatique. L'avancée de la compréhension des mécanismes génétiques impliqués dans le développement du cancer bronchopulmonaire a permis le développement de nouvelles molécules médicament ciblant des protéines spécifiques du cancer (cf. ci-après).

La recherche de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire est donc particulièrement à l'étude aujourd'hui, dans le but principalement d'éviter les problèmes de chimiorésistance ainsi que les problèmes de tolérance du traitement (Gridelli *et al.*, 2004).

L'évolution de la biologie cellulaire et moléculaire a permis la découverte de l'implication dans les NSCLC, de nombreux oncogènes responsables de la production de facteurs de croissance, de récepteur de facteur de croissance et de protéine de régulation nucléaire et cytosolique. Ces gènes sont donc devenus des cibles thérapeutiques privilégiées pour la lutte anticancéreuse. En effet, il est aujourd'hui possible d'interférer au niveau de la liaison ligand-récepteur ou d'inhiber la transduction du signal.

II.8.2.1. L'oncogène ras

L'oncogène ras est activé dans plus de 50% des NSCLC, spécialement dans les formes les plus avancées. Il est alors impliqué dans de nombreuses voies de signalisation de régulation de la prolifération cellulaire et d'inhibition de l'apoptose (Mitsudomi *et al.*, 1991).

Le signal de prolifération par ras requière la fixation de la protéine au niveau de la membrane plasmique, ce qui peut être bloqué par un inhibiteur de farnesyl transférase (FTI) (Liu *et al.*, 1998). Plusieurs petites molécules FTI sont en cours d'étude clinique de phase III, mais présentent des limites dues à des problèmes de toxicité pouvant engendrer une myelosuppression, de la fatigue, et des symptômes gastro-intestinaux. La combinaison avec un traitement de chimiothérapie donne de meilleurs résultats (Maslyar *et al.*, 2004).

II.8.2.2. Les oncogènes de la famille EGFR

Les gènes c-erb-B1 et c-erb-B2 sont régulièrement surexprimés dans les NSCLC, les protéines sont composées d'une partie extracellulaire fixant un ligand, une partie trans-membranaire, et une partie intracellulaire à activité tyrosine kinase. La fixation des ligands du type EGF ou TGF active la tyrosine kinase qui phosphoryle de multiple résidus tyrosine impliqués dans la prolifération cellulaire, l'invasion du stroma, l'adhésion, l'angiogenèse et l'inhibition de l'apoptose (Nguyen & Schrupp, 2004). Des petites molécules, se

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

fixant sur le site de liaison à l'ATP de la tyrosine kinase et inhibant la voie de signalisation erb-B1/erb-B2 (TKI), ont été développées (Baselga *et al.*, 2002). C'est le cas du Gefitinib (Iressa, ZD1839, AstraZeneca, London, UK) et de l'Erlotinib (Tarceva, OSI-774, OSI Pharmaceuticals, Melville, NY) qui induisent un blocage de l'autophosphorylation de l'EGFR, de la prolifération cellulaire, de la progression des métastases et favorisent l'apoptose chez des cellules cancéreuses *in vitro* et chez des xénogreffes de cancer du poumon *in vivo* (Giaccone *et al.*, 2004; Krozely, 2004; Ranson, 2004). Malgré de bons résultats en phase II, les essais en phase III d'un traitement associant Gefitinib et Cisplatine n'ont pas pu démontrer d'effet significatif en matière de taux de réponse ou d'amélioration de la survie comparativement à une chimiothérapie classique associant Carboplatine et Paclitaxel (Giaccone *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002). Il a aussi été récemment démontré une corrélation entre des réponses négatives au traitement et une mutation au niveau de la kinase de l'EGFR (Lynch *et al.*, 2004; Paez *et al.*, 2004).

Les essais de phase II et III montrent l'intérêt de l'Erlotinib pour les traitements de patients n'ayant pas de réponse après deux chimiothérapies différentes, mais ne montre pas de corrélation entre la réponse tumorale et la variation du taux d'expression de l'EGFR (Herbst, 2003; Shepherd *et al.*, 2005). Le Cetuximab est un anticorps monoclonal anti-EGFR. Les essais de phase II l'associant avec le

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

docetaxel montre des résultats prometteurs (Kim *et al.*, 2003). Les études actuelles se focalisent alors sur la sélection de patient, par des prédictions de réponse ou de résistance à un traitement interférant avec les tyrosines kinase, et sur l'association avec d'autres traitements incluant d'autres cibles moléculaires ou encore une inhibition de l'angiogenèse (Leslie & Bonomi, 2004; Ross *et al.*, 2004).

Actuellement des études sont en cours, utilisant la structure cristallinienne de la protéine EGFR pour présélectionner *in silico* des molécules capables de se fixer sur des sites spécifiques afin d'inhiber la transduction du signal (Cavasotto *et al.*, 2006).

Tableau 8 : Récapitulatif des traitements anti-EGFR en cours d'essais clinique (Gridelli *et al.*, 2004).

Médicament	Type	Stade de développement
Gefitinib	TKI réversible	Phase III : approuvé pour le traitement de NSCLC chimioréfractaire dans plusieurs pays
Erlotinib	TKI réversible	Phase III : résultats positifs pour les stades avancés de NSCLC chimioréfractaire
Cetuximab	Anticorps monoclonal chimérique	Phase III
PKI-166	TKI réversible contre EGFR/HER-2	Phase I
ABX-EGF	Anticorps monoclonal humain	Phase I
EMD 72000	Anticorps monoclonal humanisé	Phase I
h-R3	Anticorps monoclonal humanisé	Phase I
CI-1033	TKI irréversible contre HER	Phase I
EKI-569	TKI irréversible contre EGFR/HER-2	Phase I
GW-2016	TKI réversible contre EGFR/HER-2	Phase I

II.8.2.3. Le gène VEGF promoteur de l'angiogenèse

La glycoprotéine VEGF est un des principaux facteur pro-angiogénique surexprimé dans les NSCLC (D'Amico, 2004; Dy & Adjei, 2002). Les essais de traitement en phase II par un anticorps anti-VEGF, le Bevacizumab (Avastin, Genentech, South San Francisco, CA), bloquant la fixation de la protéine sur son récepteur membranaire, montre un meilleur taux de réponse pour le Bevacizumab seul ou associé à une chimiothérapie, par rapport à une chimiothérapie classique (Sandler *et al.*, 2004). En effet l'addition de l'anticorps au traitement permet une augmentation de 10% de la réponse au traitement, et le ralentissement de la progression tumorale. L'étude d'un TKI, le ZD6474 : un dérivé d'anilinoquinazoline, à montré une faible toxicité en phase I, et un réel potentiel d'inhibition de VEGF.

II.8.2.4. Le facteur de transcription NF- κ B

NF- κ B est un facteur de transcription anti-apoptotique surexprimé dans de nombreux cas de cancer bronchopulmonaire (Denlinger *et al.*, 2004; Sanlioglu *et al.*, 2004). L'inhibiteur d' NF- κ B montrant les meilleurs résultats cliniques est le Velcade (PS-341 ou Bortezomib, ester boronique de mannitol, Millennium Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA). Le Velcade inhibe la fixation d'NF- κ B à l'ADN et la dégradation de l'inhibiteur d'NF- κ B : I κ B, de plus il atténue la

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

surexpression des gènes dépendant d'NF- κ B induite par certaine chimiothérapie (Denlinger *et al.*, 2004). L'inhibition de NF- κ B par Velcade, conduit à la promotion de l'apoptose par induction d'inhibiteurs de desacétylase d'histone.

II.8.2.5. Le gène suppresseur de tumeur p53

La mutation de p53 est une des plus fréquentes anomalies observées dans les cancers du poumon. De plus, beaucoup de tumeurs déficientes en p53, s'avèrent être chimio et radiorésistantes (Brooks *et al.*, 2003; Roth *et al.*, 2000). Des essais de restauration de l'activité de p53 ont donc été réalisés, en réinsérant le gène p53 sauvage vectorisé par un rétrovirus. Ces travaux ont alors permis d'inhiber la croissance cellulaire et de rétablir l'apoptose chez des cellules cancéreuses du poumon possédant un p53 muté ou délété (Cai *et al.*, 1993). D'autres travaux utilisant un adénovirus pour introduire un plasmide porteur du type sauvage de p53 (Adv-wtp53), ont permis d'inhiber la tumorigénicité *in vivo*, avec une inhibition de la croissance tumorale de manière dose-dépendante (Nguyen *et al.*, 1997). Les essais cliniques avec ce vecteur ont montré une stabilisation de la maladie allant de 2 à 28 mois pour plus de 50% des patients (Swisher *et al.*, 2003; Swisher *et al.*, 1999). La présence de l'ARNm p53 sauvage a été démontrée par RT-PCR chez 50% des patients, et une augmentation de l'apoptose a été mise en évidence pour 11 patients

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

sur 24. Il a de plus, été démontré que l'injection d'Adv-wtp53, pouvait permettre d'augmenter la sensibilité de la tumeur au Cisplatine (Fujiwara *et al.*, 1994).

II.8.3 Le Gène HEF1 (NEDD9) nouvelle cible moléculaire

Le laboratoire a axé, depuis plusieurs années, son travail de recherche sur les nouveaux traitements anticancéreux plus efficaces et plus spécifiques. Pour cela de nouvelles cibles moléculaires et de nouvelles voies de régulation ont été identifiées par la technique de «Differential Display » (Liang & Pardee, 1992).

Ainsi, les différentes équipes successives ont mis en évidence deux gènes pharmacomodulés par la molécule VT1, inductrice d'un arrêt de la prolifération en phase G1 des cellules NSCLC-N6. Ces gènes sont : Le gène NY-CO-1 a été cloné dans notre laboratoire (Carbonnelle *et al.*, 2001) en même temps qu'il a été identifié par une équipe américaine. Celle-ci avait montré qu'il s'agissait d'un antigène humain de fonction inconnue, cloné lors d'un immunocriblage d'une banque d'expression cDNA de cancers coliques. Sa séquence peptidique révèle la présence d'un signal de localisation nucléaire (Scanlan *et al.*, 1998).

Le gène B2, qui code ne pas pour une protéine et dont nous avons identifié 13 480 paires de bases de cet ARN sans découvrir de cadre de lecture significatif (Jacquot C *et al.*, 2004). Cet ARN (GenBank

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

AY166681) se situe dans la région 6p24-p25 au niveau de l'intron n°2 du gène HEF1.

C'est ainsi que nous nous intéressons tout particulièrement au gène HEF1, qui pourrait être impliqué dans l'arrêt de la prolifération en phase G1 du fait de son importance dans le cycle cellulaire (II.8.3.6)

II.8.3.1. Le gène et l'ARN messenger

Le gène HEF1 (**H**omo sapiens **E**nhancer of **F**ilamentation **1**)/NEDD9 (**N**eural precursor cell **E**xpressed **D**evelopmentally **D**own-regulated **9**), aussi dénommé Cas-L (Cas Like) du fait de son homologie avec le gène p130Cas, est composé de 199016 paires de bases. Le gène est localisé sur le brin court du chromosome 6 en position p24.2 (Figure 17).

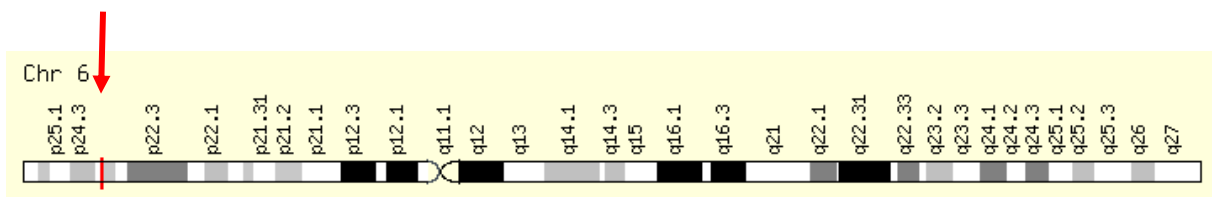


Figure 17 : Localisation du gène HEF1 sur le chromosome 6.

La transcription du gène donne naissance à un ARNm mature de 3817 bases composé de 7 exons (Figure 18).

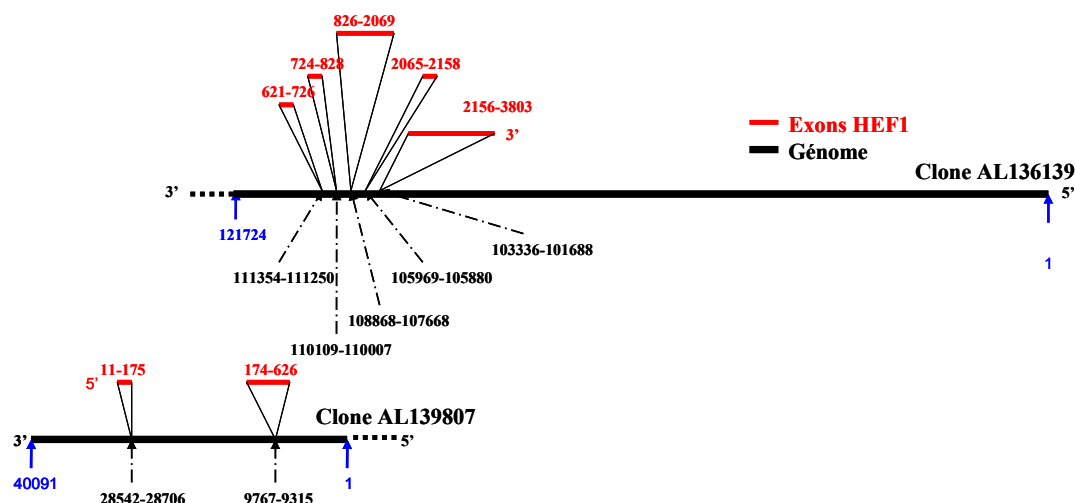


Figure 18 : Schéma du positionnement des différents exons sur le gène HEF1.

II.8.3.2. La protéine HEF1

HEF1/NEDD9 (Law *et al.*, 1996; Minegishi *et al.*, 1996) est une protéine de 834 acides aminés, elle fait partie de la famille de protéine adaptateur Cas (Crk associated substrate) (O'Neill *et al.*, 2000) avec p130Cas (Sakai *et al.*, 1994) et Efs (Alexandropoulos & Baltimore, 1996; Ishino *et al.*, 1995). Après avoir été identifiées comme des composants impliqués dans la transformation virale (Ishino *et al.*, 1995; Kanner *et al.*, 1990; Ogawa *et al.*, 1994), les rôles de ces protéines sont aujourd'hui de mieux en mieux connus. Il a été clairement démontré leur implication, dans les processus de migration dépendant des intégrines, dans le cycle cellulaire, dans la mort cellulaire programmée et dans la différenciation (Law *et al.*, 1996). De

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

plus, il semble, suite aux études récentes, que ces protéines soient impliquées dans la prolifération cancéreuse.

II.8.3.3. Les protéines de la famille Cas : structure et interactions

Tous les membres de cette famille protéique contiennent plusieurs domaines d'interactions protéiques, pour former des complexes multi-protéiques impliqués dans les cascades de signalisation de l'adhésion cellulaire (Alexandropoulos & Baltimore, 1996; Ishino *et al.*, 1995; Law *et al.*, 1996; Manié *et al.*, 1997; Minegishi *et al.*, 1996; Nojima *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1994; Vuori & Ruoslahti, 1995).

Les protéines Cas sont d'importants médiateurs intracellulaires des signaux d'activation des intégrines (O'Neill *et al.*, 2000). Ces protéines sont associées principalement à la protéine FAK (focal adhesion kinase). Ces protéines sont liées à des intégrines transmembranaires, et permettent la liaison entre les points de fixation au niveau de la matrice extracellulaire (ECM) et au niveau du cytosquelette (Burridge *et al.*, 1988). Elles sont impliquées dans la transmission des signaux extracellulaires pour le contrôle de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de l'apoptose (Giancotti & Ruoslahti, 1999; O'Neill & Golemis, 2001; Schoenwaelder & Burridge, 1999).

II.8.3.3.1. Structure

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Les protéines Cas ont une structure composée (O'Neill *et al.*, 2000) : d'un domaine SH3 (Src Homology 3) N-terminal hautement conservé, d'un domaine central composé de multiples sites de fixation de motifs SH2, de site de fixation de Src après phosphorylation des résidus tyrosine par FAK, d'une région riche en sérine et d'un motif C-terminale homo ou hétérodimerisé (O'Neill *et al.*, 2000), qui peut réguler des interaction avec d'autres molécules (Sakakibara & Hattori, 2000)(Figure 19).

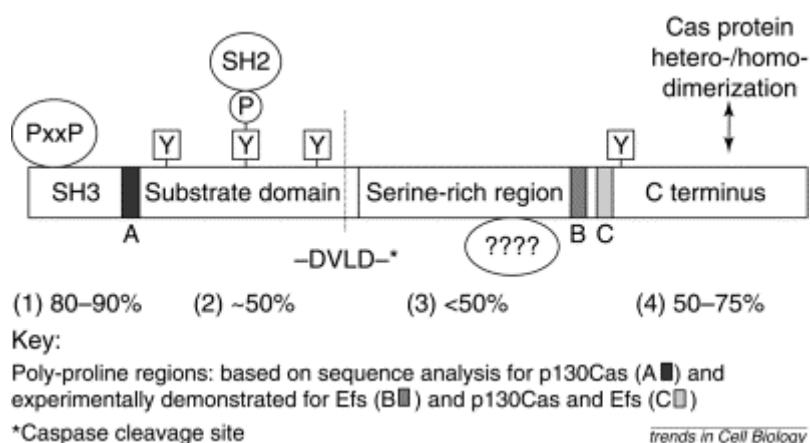


Figure 19 : Schéma des domaines conservés des protéines Cas (O'Neill *et al.*, 2000). (1) domaine Src homology 3 (SH3) qui interagit avec des protéines contenant des motifs poly-proline (PxxP) ; (2) une région contenant un grand nombre de tyrosines qui une fois phosphorylées recruteront une protéine contenant un domaine SH2 ; (3) région riche en sérine ; (4) partie C-terminale qui peut être homo ou hétérodimerisé (Law *et al.*, 1999).

Les protéines de la famille Cas diffèrent par leur expression dans les différents tissus. Alors que p130Cas est uniformément exprimé, Efs n'est principalement présente que dans le placenta, dans l'embryon,

dans les muscles et dans le cerveau (Alexandropoulos & Baltimore, 1996) et HEF1 dans les tissus épithéliaux (Law *et al.*, 1996; Law *et al.*, 1998) et lymphoïdes T (Minegishi *et al.*, 1996) et B (Manié *et al.*, 1997; Minegishi *et al.*, 1996). Cette distribution spécifique suggère que la protéine HEF1 a des fonctions très spécifiques.

II.8.3.3.2. Régulation et fonctions

Cette structure indique que les Cas sont des protéines d'accrochages. Aujourd'hui de nombreuses protéines cibles ont été identifiées (O'Neill *et al.*, 2000). Lors de l'interphase les protéines Cas sont situées au niveau des sites d'adhésion focaux et leur domaine SH3 interagit avec la région polyproline C-terminale des protéines FAK (Law *et al.*, 1996; Nakamoto *et al.*, 1997; Ohba *et al.*, 1998; Polte & Hanks, 1995; Tachibana *et al.*, 1997). Elles sont phosphorylées par les FAK et les Src kinases en réponse à la liaison des récepteurs intégrines à l'ECM (Law *et al.*, 2000) (Figure 20). Cette phosphorylation active le site de fixation à SH2 pour recruter les protéines adaptateur Crk qui stimule alors la cascade Ras/Raf/Jun N-terminale kinase (JNK) (Astier *et al.*, 1997b; Blaukat *et al.*, 1999; Dolfi *et al.*, 1998; Law *et al.*, 1996; Manié *et al.*, 1997; Minegishi *et al.*, 1996; Nojima *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 1994; Vuori & Ruoslahti, 1995) qui contribue à la migration cellulaire (Cary *et al.*, 1998; Cheresch *et al.*, 1999; Klemke *et al.*, 1998; Ohashi *et al.*, 1999).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

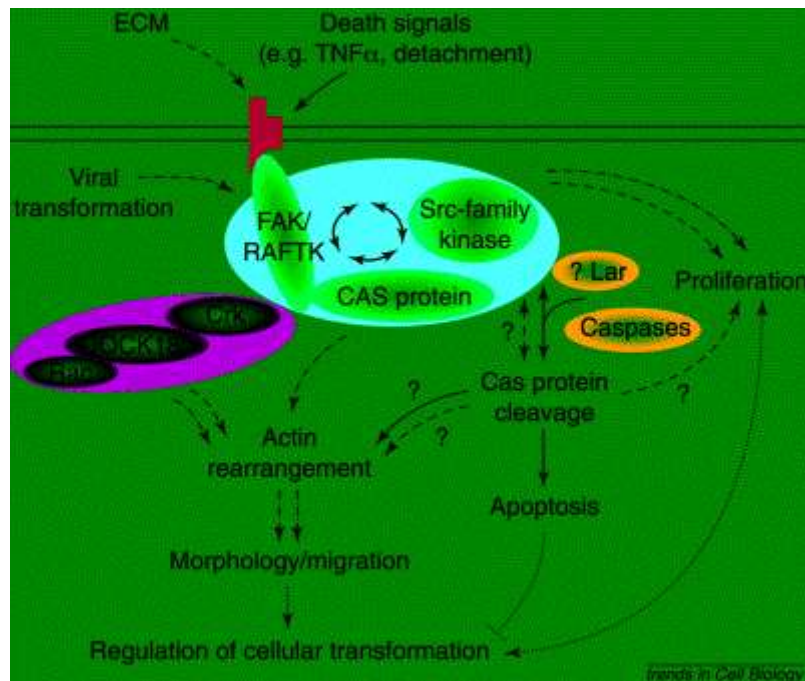


Figure 20 : Représentation schématique des interactions protéiques impliquant les protéines Cas au niveau des sites focaux d'adhésion (O'Neill *et al.*, 2000).

Les protéines Cas sont largement modifiées par des tyrosines sérine/thréonine kinases en réponse à une mutation oncogénique (Kanner *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1994), à la ligation d'une intégrine et l'adhésion cellulaire (Harte *et al.*, 1996; Hunter & Shimizu, 1997; Manié *et al.*, 1997; Minegishi *et al.*, 1996; Nojima *et al.*, 1995; Petch *et al.*, 1995; Sattler *et al.*, 1997; Vuori & Ruoslahti, 1995), ou à l'entrée dans le cycle cellulaire (Law *et al.*, 1998; Oktay *et al.*, 1999; Yamakita *et al.*, 1999). L'état de phosphorylation des protéines Cas influe sur leur localisation. C'est particulièrement le cas pour HEF1 dont le niveau de phosphorylation et la structure même de la protéine varie en fonction des phases du cycle cellulaire (cf. II.8.3.6).

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

Les protéines Cas sont aussi largement impliquées dans les processus de mort cellulaire par apoptose directement (Bannerman *et al.*, 1998; Law *et al.*, 2000) ou indirectement (Weng *et al.*, 1999).

Certaines études ont aussi démontré l'implication des protéines Cas dans les processus de cancérisation. C'est le cas pour p130Cas qui est une cible d'hyperphosphorylation par les protéines oncogéniques Src et Crk (Sakai *et al.*, 1994).

II.8.3.4. Interaction : La protéine FAK

Les sites adhésions focaux possèdent une double fonction : ce sont des points de liaisons entre la matrice extracellulaire, les intégrines et la matrice intracellulaire, et ce sont des transmetteurs de signaux extracellulaires contrôlant la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les intégrines sont des protéines membranaires hétérodimériques, constituées de sous-unités α et β , exprimées sur les cellules épithéliales et endothéliales. Leur partie externe se fixe sur des composants de la matrice extracellulaire et transmet des signaux via les composants des complexes d'adhésion focale (*e.g.* FAK) qui s'agrègent sur la partie interne de la sous-unité α . Les intégrines participent au couplage de la régulation de l'adhésion cellulaire et de la prolifération.

FAK (Focal Adhésion Kinase) est une protéine cytoplasmique ubiquitaire retrouvée au sein du complexe d'adhérence. La kinase

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

d'adhérence focale (FAK) joue un rôle primordial dans les phénomènes d'adhérence et de migration cellulaire. Préférentiellement localisée près des intégrines au niveau des complexes d'adhérence (Figure 21), FAK fonctionne comme transmetteur des signaux extracellulaires qui agissent sur la cellule par l'intermédiaire des intégrines et des facteurs de croissance. Les intégrines sont des médiateurs impliqués dans différents processus physiologiques du développement cellulaire et notamment dans la croissance des cellules tumorales et des métastases (Petersen *et al.*, 1998). La phosphorylation des FAK est contrôlée par les complexes de signalisation induits par les récepteurs à intégrines (Schlaepfer & Hunter, 1998).

FAK possède de nombreux résidus tyrosine qui, une fois phosphorylés, agissent comme des points d'amarrage pour le recrutement et l'activation de plusieurs protéines de signalisation SH2 et SH3. La FAK joue un rôle central au sein du complexe d'adhésion, interagissant avec des protéines du cytosquelette telles que l'actine, la paxilline, la latiline, et des protéines qui participent au remaniement de ce même cytosquelette telle que la PI3-kinase, ou la p130Cas. Son activation se traduit par l'autophosphorylation d'un résidu tyrosine libérant un site de liaison pour la protéine Src ainsi que d'autres kinases des familles Src, Fyn, etc- Src dont les cascades de transduction aboutiront à l'activation de programmes géniques de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

régulation du cycle cellulaire ou de migration. La modulation des FAK affecte la mobilité cellulaire et induit l'apoptose (Crouch *et al.*, 1996; Frisch *et al.*, 1996; Hungerford *et al.*, 1996; Ilic *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1996a). En effet FAK est impliqué dans la perte d'adhésion cellulaire lors de l'apoptose nommé Anoikis (Weng *et al.*, 1999).

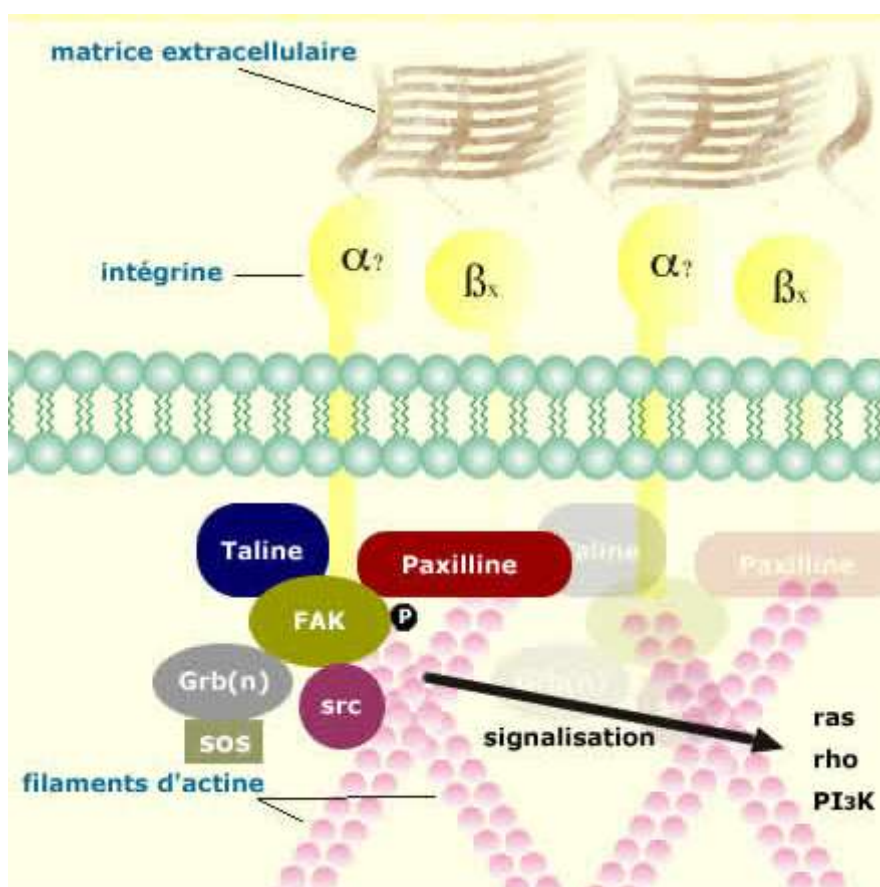


Figure 21 : Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leur domaine SH2 ou SH3 (*Src homology regions 2 et 3*). Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines ou des facteurs de croissance et les autres protéines (Cornillon *et al.*, 2003).

II.8.3.5. Régulation/Maturation postranscriptionnelle de HEF1

Le gène HEF1 est responsable de la production de 4 protéines différentes : p115^{HEF1}, p105^{HEF1}, p65^{HEF1} et p55^{HEF1} (Law *et al.*, 1998). p115^{HEF1} et p105^{HEF1} correspondent à deux niveaux de phosphorylation de la protéine totale localisés au niveau des sites d'adhésions focaux pendant l'interphase (O'Neill & Golemis, 2001). La p115^{HEF1} est la forme hyperphosphorylée de p105^{HEF1} induite par la stimulation des intégrines ou d'autres stimuli.

HEF1 est régulé au cours du cycle cellulaire : à la limite G2/M (Law *et al.*, 1998), et de l'apoptose (Law *et al.*, 1999), la protéine est spécifiquement tronquée, au niveau des sites DLVD (aa 360 à 363) caspase-like 3 ou 7 (Law *et al.*, 2000) et DDYD (aa 627 à 630) (Figure 22), en différents isoformes impliquées dans la croissance et la mort cellulaire. Ceci suggère une convergence entre les mécanismes de contrôle de l'adhésion cellulaire lors de ces deux processus. En effet, lors de la mitose, la protéine p105^{HEF1} est clivée et produit : p55^{HEF1}, non tyrosine-phosphorylée, qui contient en partie N-terminale le domaine SH3 et une majorité du motif d'adhésion au site SH2 (Law *et al.*, 1998), et p65^{HEF1}, partie C-terminale. p55^{HEF1} va ensuite migrer vers le fuseau mitotique, malgré la présence résiduelle de la séquence interagissant avec FAK, et semble donc être un facteur déclenchant de la division cellulaire. L'isoforme p28^{HEF1} (aa 631 à 834) est produite

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

par clivage de p65^{HEF1} sur le site DDYD au cour de l'apoptose (O'Neill & Golemis, 2001).

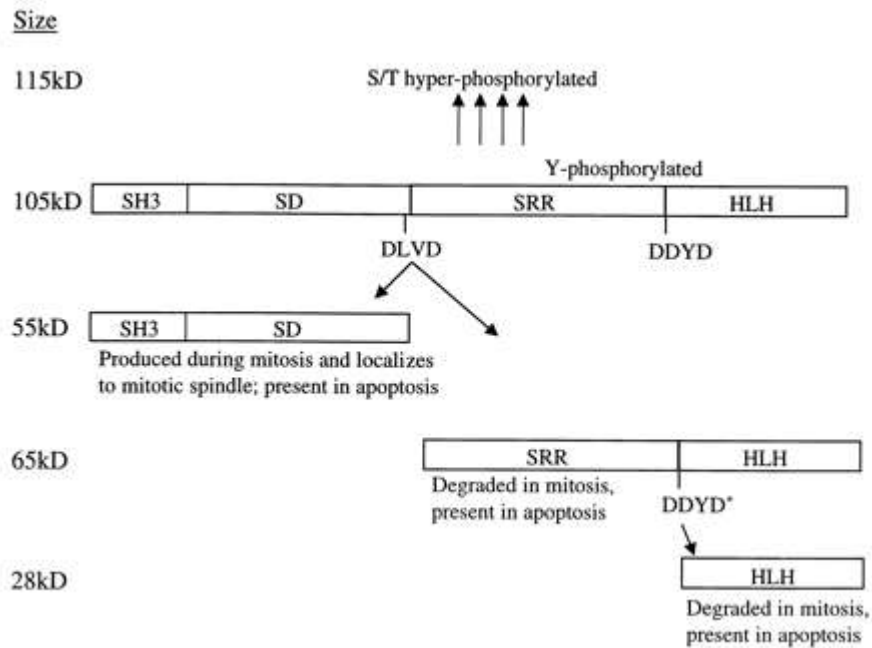


Figure 22 : Modifications postranscriptionnelles de la protéines p105^{HEF1}, intervenant au cours de la mitose et de l'apoptose, et produisant différentes isoformes. Le schéma indique la présence des domaines, SH3 (Src Homology 3), SD (substrate domain) qui inclut des résidus tyrosine dont la phosphorylation régule les interactions avec les protéines SH2, SRR qui est une région riche en sérine et HLH contenue dans la région très conservée C-terminale (O'Neill & Golemis, 2001).

Les différentes isoformes de HEF1 sont sujettes à des dégradations par le protéasome. Le degré de dégradation est variable entre la mitose et l'apoptose, il contribue aux différences d'abondances de chaque formes observées (Law *et al.*, 2000).

II.8.3.6. Fonctions de HEF1

HEF1 a tout d'abord été isolé lors d'un screening de protéine humaine et a démontré sa capacité chez *Saccharomyces cerevisiae* à modifier la morphologie cellulaire passant de ronde à filamenteuse (Law *et al.*, 1996).

La protéine HEF1 est impliquée dans le contrôle de la croissance, de la mort et dans la motilité cellulaire, par l'intermédiaire d'interaction au niveau des sites d'adhésion cellulaire et du fuseau mitotique. En effet il a été démontré depuis longtemps que les modifications morphologiques des cellules intervenantes au cours de ces processus sont régies par les mêmes voies protéiques (King & Cidlowski, 1995). Ces différents événements débutent par un arrondissement et un détachement des cellules de la matrice extra-cellulaire.

II.8.3.6.1. Implications dans le cycle et la différenciation cellulaire

Plusieurs travaux semblent suggérer que p105^{HEF1} et p115^{HEF1} sont des relais intracellulaires des intégrines intervenant lors de la différenciation des cellules B et T (Astier *et al.*, 1997a; Astier *et al.*, 1997c; Manié *et al.*, 1997; Minegishi *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997; Tachibana *et al.*, 1997). Law *et al.* (2000) démontrent que les quantités de ces deux formes de HEF1 sont régulées au cours du cycle cellulaire et sont particulièrement abondantes après l'initiation de la

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

division de la cellule. p105^{HEF1} est formée avant p115^{HEF1} dans le cycle cellulaire ce qui suggèrent que la phosphorylation de cette dernière interviendrait à un stade précis du cycle. p105^{HEF1} et p115^{HEF1} coordonnent les complexes de signalisation au niveau des sites d'adhésions focaux en réponse à l'adhésion ou à l'initiation de la division cellulaire.

L'équipe de E. Golemis a mis en évidence, chez des cellules MCF-7 surproduisant le gène HEF1, son importante implication dans la morphologie, dans la mobilité cellulaire (Fashena *et al.*, 2002) et dans l'initiation du cycle cellulaire. En effet Law *et al.* démontrent la surexpression de p105^{HEF1} puis de p115^{HEF1} très rapidement après l'induction de la croissance chez des cellules quiescentes MCF-7 (Law *et al.*, 1998). Ces modifications phénotypiques sont corrélées à une régulation positive de gènes impliqués dans la migration et l'invasion comme ceux codant pour les kinases de chaîne légère de myosine.

II.8.3.6.2. Implications dans la mitose

Le clivage de p105^{HEF1} et p115^{HEF1} en phase G2/M (cf. II.8.3.5) engendre l'apparition de la protéine p55^{HEF1} N-terminale, qui va se localiser au niveau du fuseau mitotique, alors que la partie C-terminale est dégradée (Law *et al.*, 1998). Ceci, indique que HEF1 joue un rôle important dans la transition entre la cellule en interphase

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

adhérente au support et la cellule mitotique ronde libre (Law *et al.*, 2000).p55HEF1 contribue à la signalisation de la progression du cycle cellulaire, très certainement par une association avec la protéine régulatrice de la mitose : hsDim1p décrite chez *Schizo-saccharomyces* comme indispensable pour la transition G2/M (Berry & Gould, 1997).

II.8.3.6.3. Implications dans l'apoptose

Les données *in vitro* montrent que la régulation de l'activité des FAK contrôle l'apoptose (Frisch *et al.*, 1996; Hungerford *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996b). En effet, il a été démontré l'importance chez de nombreux types cellulaires que la perte de l'attachement était un stimulus suffisant pour déclencher l'apoptose (Frisch & Francis, 1994). En effet les FAK actives lors du détachement de la cellule (anoikis) empêchent le déclenchement de l'apoptose (Frisch *et al.*, 1996), et donc le blocage des FAK peu engendrer la mort programmée (Hungerford *et al.*, 1996). Les FAK sont donc clivées par des caspases, lors du détachement de la cellule pour permettre l'apoptose (Levkau *et al.*, 1998; Wen *et al.*, 1997).

Law *et al.* (2000) montrent chez les cellules MCF-7 que la surexpression de HEF1, engendre un arrondissement des cellules et un décollement de leur support. Cette étude démontre aussi une influence de cette surexpression sur l'augmentation de l'activité protéolytique des caspases 3 et/ou 7. L'induction des caspases conduit au clivage de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

p105^{HEF1} et p115^{HEF1}, en : p55^{HEF1} (conservé lors de la mitose et dégradé lors de l'apoptose par le protéasome) et p65^{HEF1} (conservé lors de l'apoptose alors qu'il est dégradé lors de la mitose), elle-même clivée au niveau du site DDYD pour donner p28^{HEF1} (Figure 22).

L'induction de la surexpression de HEF1 conduit à la phosphorylation et l'activation des JNK (Jun N-terminal kinase) qui forment un complexe avec HEF1 et se localisent au niveau des sites d'adhésions focaux (Law *et al.*, 2000). L'activité pro-apoptotique de HEF1 semble pouvoir être attribuée à l'expression de la région N-terminale de p28^{HEF1}. Il semble que p28^{HEF1} influe sur le clivage de FAK menant à l'apoptose (O'Neill & Golemis, 2001). En effet O'Neill *et al.* démontrent que la séquence située entre les acides aminés 626 et 654 et le domaine HLH (Figure 22) contribue à l'induction de l'apoptose. L'activité pro-apoptotique serait influencée par la dimérisation du motif HLH avec p130Cas ou HEF1, et/ou par une interaction avec une molécule signal.

II.8.3.6.4. Implication dans la morphologie et la motilité cellulaire

Fashena *et al.* ont mis en évidence l'influence de la surproduction de HEF1 sur la morphologie et la motilité cellulaire (Fashena *et al.*, 2002). Ils montrent d'importantes modifications morphologiques dès 4 à 6 heures après induction de l'expression de HEF1 chez les cellules

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

de cancer du sein MCF7. La microscopie optique met en évidence des cellules en forme de croissant de lune possédant des lamellipodes sur le bord antérieur, un hérissément de la membrane et un bord inférieur plus prononcé, similaire à la morphologie des cellules hautement motiles (Cooper & Schliwa, 1986). La détection par immunofluorescence met en évidence la présence de la protéine HEF1 principalement dans les lamellipodes au niveau des points de fixation de l'actine sur les sites d'adhésions focaux (Fashena *et al.*, 2002).

Les cellules tumorales sont capables de mouvements amiboïdes grâce à des fibres d'actine. La cellule se fraye un chemin à travers l'ECM plutôt que de dégager son chemin par l'action protéolytique. Cette migration cellulaire implique une régulation très fine de l'organisation/désorganisation du cytosquelette, en coordination avec l'attachement à des éléments extracellulaires. La plus importante voie de régulation qui lie la signalisation par attachement à l'ECM via les intégrines, les modifications des fibres d'actine et la stimulation de la transcription, met en jeu la tyrosine-kinase FAK. Elle est activée par les intégrines, des facteurs de croissance et des hormones. Les cellules dont le gène FAK a été invalidé voient diminuer très fortement leur capacité de migration *in vitro*. Ohashi *et al.* ont montré que l'expression de HEF1 contribue à la migration des cellules T suite à la ligation de CR3 et de $\beta 1$ intégrine (Ohashi *et al.*, 1999). L'induction de HEF1 chez les cellules MCF7 permet d'augmenter la vitesse de

Chapitre II : Le cancer bronchopulmonaire

déplacement ainsi que la quantité de déplacement (Fashena *et al.*, 2002). La production de la protéine HEF1 engendre aussi l'apparition des formes phosphorylées des kinases ERK et p38 (Fashena *et al.*, 2002), elles même connues pour leur implication dans les processus de motilité cellulaire (Fincham *et al.*, 2000; Glading *et al.*, 2000; Klemke *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1999; Zeigler *et al.*, 1999). Les études menées sur les banques d'EST (extend sequence tag) montrent une très faible différence entre des cellules témoins et des cellules surproduisant HEF1, ce qui suggère l'induction de HEF1 engendre une modification de l'expression génique que chez un très faible nombre de gènes (Fashena *et al.*, 2002). Une augmentation du niveau de transcription a été mis en évidence pour des gènes impliqués dans la motilité cellulaire comme : des membres de la famille des métalloprotéinases, des kinases associées à la motilité (MLCK, Nck-interacting kinase, Rho-binding kinase p160ROCK).

Ces fonctions de motilité régulées par HEF1 sont particulièrement importantes dans les processus de développement de l'organisme sain, mais aussi lors de la formation de métastases par les cellules cancéreuses (McCawley & Matrisian, 2000; Vu & Werb, 2000).

*Approche
méthodologique*

Chapitre III : Approche méthodologique

Le cancer bronchopulmonaire non à petites cellules est aujourd'hui un des plus fréquents et surtout celui qui possède la plus forte mortalité (cf. II.2). Ses particularités physiologiques et génétiques en font un cancer particulièrement difficile à traiter, les thérapies ne donnant que de très faibles taux de réussite (cf. II.7). Il apparaît donc aujourd'hui urgent de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de cibler et d'inhiber efficacement la prolifération de ce type de cellule cancéreuse.

La découverte de nouveaux traitements anticancéreux passe par une investigation du potentiel antiprolifératif d'un grand nombre de composés chimiques (le screening) pouvant avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse ou aux biotechnologies. Ainsi, le Laboratoire de Pharmacologie Marine recherche depuis de nombreuses années à mieux comprendre la biologie des pathologies cellulaires prolifératives, pour identifier de nouveaux types de traitements toujours plus spécifiques et efficaces. Les différentes études d'activités pharmacologiques ont été réalisées ici sur deux lignées cellulaires, modèles de pathologies cellulaires prolifératives.

Ainsi, l'objectif du présent travail a été, de réaliser, d'une part une recherche de nouvelles molécules d'origine naturelle à potentiel antiprolifératif, et d'autre part une étude visant à caractériser l'activité d'une molécule de synthèse (A190) sélectionnée et brevetée par le laboratoire. Ces travaux ont nécessité la mise au point de plusieurs

Chapitre III : Approche méthodologique

protocoles expérimentaux successifs. Ceux-ci ont visé d'une part à identifier de nouvelles molécules antiprolifératives issues de microalgues et d'autre part à caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les activités observées. Ces différents protocoles mis en place sont :

Dans un premier temps nous avons dû sélectionner différentes espèces de microalgues en vue de réaliser un screening. Les critères de sélection se sont appuyés sur la disponibilité des souches, leur isolation et leur possibilité de mise en culture en laboratoire, mais aussi sur leur diversité phylogénique qui serait liée à une diversité biochimique.

Les microalgues ont alors été produites en conditions contrôlées dans des milieux de culture spécifiques pour chaque souche.

Nous avons ensuite dû choisir un protocole d'extraction le plus représentatif possible du pool biochimique de chaque algue. Les différents extraits ont alors été testés sur lignée cellulaire, pour mettre en évidence leur potentiel antiprolifératif. Les isolations et les identifications des principes actifs ont alors été réalisées par l'utilisation des méthodes traditionnelles de chimie analytique, en collaboration avec les équipes des Professeurs V. Roussis, de la faculté de pharmacie d'Athènes, E. Fattorusso, de la faculté de pharmacie de Naples.

Les molécules alors isolées ainsi que la molécule A190 sélectionnée à partir d'une famille de plus de 200 triazines ont été soumises à des

Chapitre III : Approche méthodologique

tests au niveau cellulaire visant à définir précisément leur type d'activité. Plusieurs protocoles ont été mis en place, des études de cinétiques de croissance, des études du cycle cellulaire et la mise en évidence d'une induction de mort par apoptose.

Suite aux résultats obtenus lors des tests de la molécule A190 au niveau cellulaire, une poursuite de la compréhension de son activité a été menée au niveau moléculaire. La mise en évidence de l'action d'une molécule sur l'expression génique passe par l'étude du transcriptome et/ou du protéome. En effet, l'activité très spécifique engendrée par un composé doit aujourd'hui viser à cibler spécifiquement les mécanismes de prolifération des cellules cancéreuses. Il nous faut donc aujourd'hui découvrir des principes actifs capables de pharmacomoduler des gènes indispensables à la survie et à la croissance de la cellule cancéreuse. La découverte et la sélection de nouvelles cibles génomiques passe donc tout d'abord par la comparaison des pools ARN de cellules traitées et de cellules témoins. Il sera donc possible de mettre en évidence une variation de l'expression génique, quelle soit positive ou négative. La compréhension de l'intérêt de la modulation d'une cible, passera alors par l'étude de son implication dans le cycle cellulaire, et par l'analyse la plus détaillée possible de sa modulation. Différentes techniques de biologie moléculaire entreront alors en jeu successivement pour sélectionner un gène puis étudier sa régulation au niveau de la transcription puis de la traduction. C'est ainsi qu'au cours de

Chapitre III : Approche méthodologique

différents travaux au sein du laboratoire une cible particulière a pu être identifiée par RF-Differential display : le gène HEF1 et l'ARN non traduit B2 codé par une région intronique d'HEF1 (Jacquot *et al.*, 2004). Nous avons alors tenté d'étudier le possible effet de A190 sur ces deux cibles par la mise en place de protocoles utilisant les techniques les plus récentes de dosage des ARN messager et des protéines.

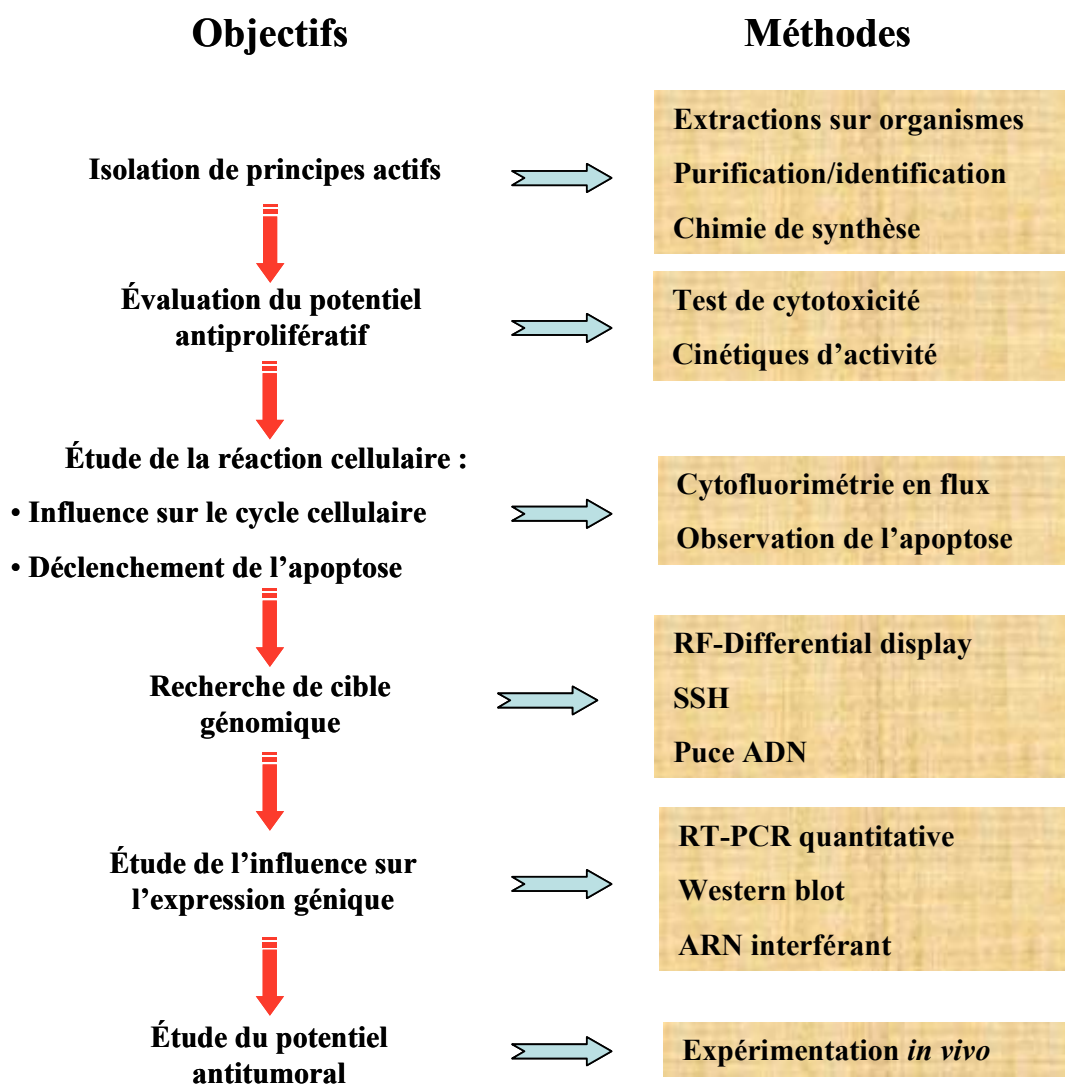


Figure 23 : Détails des différentes étapes d'études d'un principe actif permettant de définir et de valider son potentiel anticancéreux.

III. EVALUATION DU POTENTIEL ANTIPROLIFERATIF D'UN COMPOSE CHIMIQUE

III.1 LES MODELES CELLULAIRES

III.1.1 La lignée NSCLC-N6

III.1.1.1. Origine

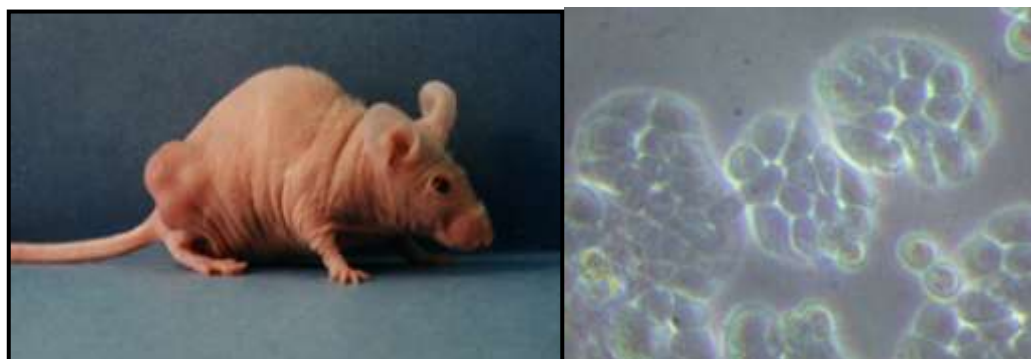
La lignée NSCLC-N6 est issue d'une biopsie prélevée avant tout traitement sur un patient de 67 ans atteint d'un cancer broncho-pulmonaire de type épidermoïde classé T2N0M0 (Roussakis *et al.*, 1991). Le fragment tumoral mis en suspension dans du liquide physiologique additionné d'antibiotique et de sérum a été injecté en sous-cutané chez des souris *nude*. Ce transfert *in vivo*, permet de stabiliser les caractéristiques phénotypiques de la lignée avant la mise en culture *in vitro* qui aboutirait à une mort cellulaire massive par apoptose si elle était effectuée directement. En effet, la modification

Chapitre III : Approche méthodologique

brutale de l'environnement cellulaire entraînerait leur mort immédiate. Pour éliminer l'éventuel mélange entre cellules humaines et murines, un clonage a été effectué et le clone NSCLC-N6-L16 a été sélectionné. La lignée est conservée depuis sa création en cryotube à -180°C.

III.1.1.2. Caractéristiques

Il s'agit d'une lignée polyploïde possédant 62 chromosomes environ. Les analyses cytogénétiques ont confirmé que ces chromosomes étaient tous d'origine humaine. Son temps de doublement est de environ 30 heures *in vitro* et 12 jours *in vivo* après xénogreffe chez la souris *nude*. C'est une lignée moyennement différenciée, rarement kératinisée et hétérogène qui a permis l'isolement de 4 clones. Ceux-ci diffèrent par leur degré de différenciation, leur temps de doublement et leur chimiosensibilité (Siavoshian *et al.*, 1998). La lignée possède une mutation du gène p53 (Jacquot *et al.*, 2003).



Chapitre III : Approche méthodologique

Figure 24 : A gauche, observation du développement d'une tumeur après xénogreffe de cellule de la lignée NSCLC-N6 chez une souris *nude*. A droite, observation microscopique (x200) de la lignée en croissance, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

III.1.2 La lignée A549

III.1.2.1. Origine

La lignée A549 est issue d'un adénocarcinome d'épithélium pulmonaire prélevé chez un patient de 58 ans (Giard *et al.*, 1973). Elle est conservée dans la banque de lignée du National Cancer Institut (réf. Collection ATCC n°CCL-185). C'est la lignée communément utilisée par les laboratoires de recherche étudiant le cancer du poumon non à petite cellule (Foster *et al.*, 1998).

III.1.2.2. Caractéristiques

Il s'agit d'une lignée hypotriploïde qui possède 24% de cellules à 12 chromosomes, 22% à 64 chromosomes, les autres cellules étant diploïdes. La lignée est tumorigène chez la souris *nude* et a conservé le type sauvage du gène p53 (Bai *et al.*, 1998). Cette lignée possède un temps de doublement *in vitro* plus faible que celui de NSCLC-N6 de 12 à 20h.

Chapitre III : Approche méthodologique

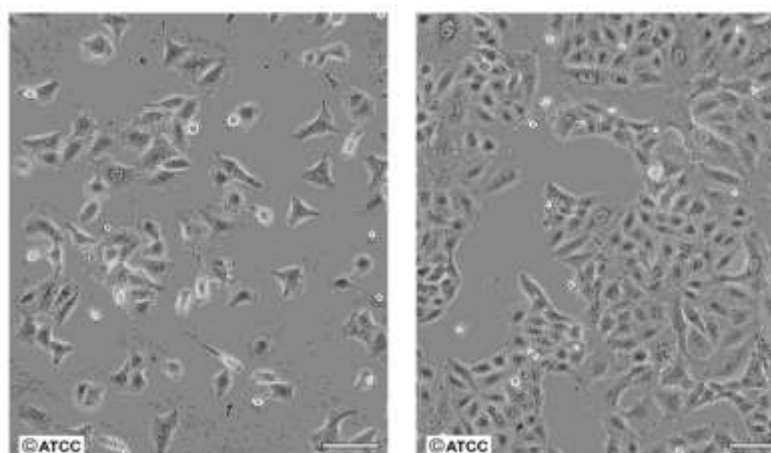


Figure 25 : Observation microscopique (x200) de la lignée A549 en croissance normale, dans son milieu de culture, fixée sur support solide.

III.1.3 Entretien des lignées

Les cellules sont cultivées en flasques à bouchon filtrant (Falcon®) dans un milieu de culture constitué de RPMI 1640 (Eurobio®), de 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio®), de 1% de glutamine (Eurobio®) ainsi que de 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine, (Eurobio®). Le SVF est le composant le plus complexe car il contient des facteurs de croissance, des hormones et tout ce que le sang peut contenir sauf les éléments figurés, les facteurs de coagulation et le complément.

Les cultures sont incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Les cellules consomment les nutriments du milieu et produisent des métabolites. Il faut donc renouveler celui-ci régulièrement (tous les deux jours en général). Ces cellules sont adhérentes au support et doivent donc être repiquées à l'aide de

Chapitre III : Approche méthodologique

trypsine. Les amas cellulaires sont alors fractionnés à l'aide d'une seringue stérile par aspiration/rejet et une partie de la suspension cellulaire est transférée dans un nouveau flasque. Une dilution est ainsi effectuée pour qu'il y ait un nombre moins important de cellules dans le flasque. Le milieu de culture est changé 2 heures après chaque repiquage.

Pour conserver la lignée et avoir à disposition un stock de cellules, celles-ci pourront être congelées. Pour la lignée NSCLC-N6, afin de travailler sur un matériel cellulaire d'un phénotype équivalent au phénotype de la lignée primitive, toutes les expériences sont réalisées avec des cultures qui n'excèdent pas 50 repiquages.

III.1.4 Synchronisation des cellules NSCLC-N6

Pour les études en biologie moléculaire nous avons fait le choix de travailler avec des cellules synchronisées, c'est-à-dire des cellules qui se trouvent pour une grande majorité dans une même phase du cycle. En effet, nous savons d'après le travail de bibliographie effectué que les cibles que nous voulons étudier interviennent à différents niveaux du cycle cellulaire (cf. II.8.3), et sont donc régulées au cours de ce cycle. Il semblait donc évident que si les cellules se trouvent dans différentes phases du cycle, il serait difficile de mettre en évidence une tendance pour l'expression génique de ces cibles. Les premiers essais d'étude des ARN messager réalisés sur des cellules non

Chapitre III : Approche méthodologique

synchronisées ont confirmé les difficultés d'interprétation des tendances.

Ainsi, nous avons réalisé une synchronisation des cellules NSCLC-N6, sans utiliser de molécules chimiques, pouvant interférer avec l'étude du traitement réalisée. Pour cela nous sommes partis de nos connaissances de la biologie cellulaire. En effet, lorsque les cellules entrent en mitose, les microtubules du cytosquelette se dépolymérisent et libèrent des dimères de tubulines qui seront réutilisées pour la construction du fuseau mitotiques. Les cellules qui entrent en mitose perdent alors leur cytosquelette et prennent une forme arrondie. Elles n'adhèrent alors plus que faiblement au fond de la boîte de culture pendant toute la durée de la mitose. Les cellules ayant achevé leur mitose reconstituent leur cytosquelette et réadhèrent au fond de la boîte dans les premières étapes de phase G1.

Il était donc simple de récupérer et d'isoler les cellules en mitose, par simple agitation de la boîte de culture. Les cellules se décrochent alors, se trouvent en suspensions dans le milieu et peuvent être récupérées par centrifugation douce, avant d'être replacées en culture. Les cellules ainsi synchronisées sont conservées et utilisées sur 4 à 5 passages (trypsination) seulement, avant qu'elles ne finissent par se désynchroniser.

Chapitre III : Approche méthodologique

III.2 LES DIFFERENTS EXTRAITS ET MOLECULES CHIMIQUES ETUDIEES.

III.2.1 Les microalgues

Ce sont des végétaux photosynthétiques qui réalisent, en présence de lumière, la fabrication ou synthèse des substances organiques nécessaires à leur vie à partir de substances inorganiques prélevées dans le milieu comme l'eau, les sels minéraux et le dioxyde de carbone. Ces synthèses consomment de l'énergie fournie par la lumière solaire qui est captée par des pigments chlorophylliens portés par des organites, les plastes ou chromatophores. Les algues sont donc capables de se nourrir, contrairement aux animaux, à partir d'éléments inorganiques, on les dit autotrophes, par photosynthèse. Certaines pourtant sont capables d'utiliser des matières organiques du milieu (on les dits mixotrophes).

III.2.1.1. Les espèces

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules, notre attention s'est portée sur des organismes particulièrement intéressants du fait de leur importante production biochimique encore peu étudiée. En effet, les microalgues sont des microorganismes unicellulaires qui ont conquis une grande diversité de milieu par le développement d'un grand nombre de voies métaboliques, source potentielle de structure chimique originale. Un autre point important pour le choix de ces organismes est, la facilité d'accès à une quantité importante de

Chapitre III : Approche méthodologique

biomasse de qualité constante, sans atteinte à l'environnement, indispensable pour toute étude pharmacochimique. En effet, il est aujourd'hui possible d'isoler et de produire en grande quantité, de manière contrôlée en laboratoire, bon nombre d'espèces issues du milieu naturel.

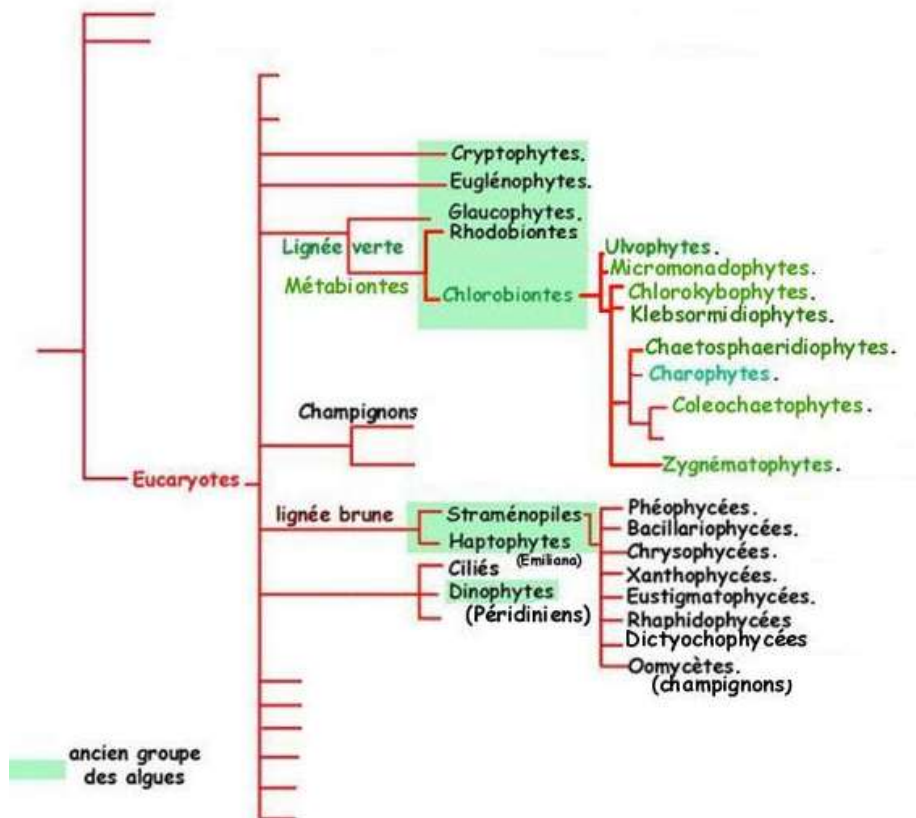
Un screening d'extraits biochimiques à partir de plusieurs espèces vivant naturellement sur les côtes Atlantique ou en eau douce, a donc été entrepris. Dix espèces ont été sélectionnées pour l'étude (Tableau 9).

Tableau 9 : Détail des différentes espèces utilisées pour le screening. Indication de la classe phylogénique, du nom de l'espèce, de la source de la souche et des conditions de cultures.

Classe	Espèce	Source	Milieu	pH	T°
Diatomophyceae	<i>Odontella aurita</i>	IFREMER	Conway	7,5	20 °C
	<i>Chaetoceros calcitrans</i> forma <i>pumilum</i>	ccap 1010/11	Conway	7,5	20°C
Rhodophyceae	<i>Porphyridium purpureum</i>	SAG 111/79	Hemerick	7	20°C
	<i>Rhodella violacea</i>	SAG 115/79	Conway	7	24°C
	<i>Galdieria sulphuraria</i> *	074W	Galdi	2	45°C
Chlorophyceae	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> *	PG 27	MMG/TAP	7	24°C
Haptophyceae	<i>Isochrysis affinis galbana</i>	IFREMER	Conway	7	20°C
Cryptophyceae	<i>Rhodomonas salina</i>	ccap 978/24	Conway	7	22°C
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis suecica</i>	ccmp 904	Conway	7	20°C
Dinophyceae	<i>Heterocapsa triquetra</i>	IFREMER	ESP	7,8	22°C

Chapitre III : Approche méthodologique

Les différentes espèces ont ainsi été choisies, dans le but d'obtenir une grande diversité spécifique, afin de commencer à sélectionner des familles répondant particulièrement aux attentes de la recherche pharmacologique. En effet, ces 10 espèces appartiennent à 7 Classes phylogéniques différentes (Tableau 9).



Chapitre III : Approche méthodologique

Positionnement dans l'arbre	Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Sous-Espèce
Straménopiles (Bacillariophycées)	Chrysophyta	Bacillariophyceae	Biddulphiales	Chaetocerotaceae	Odontella	aurita	
Straménopiles (Bacillariophycées)	Chrysophyta	Bacillariophyceae	Biddulphiales	Chaetocerotaceae	Chaetoceros	calcitrans	forma pumilum
Rhodobiontes	Rhodophyta	Rhodophyceae	Porphyridiales	Porphyridiaceae	Porphyridium	purpureum	
Rhodobiontes	Rhodophyta	Rhodophyceae	Porphyridiales	Porphyridiaceae	Rhodella	violacea	
Rhodobiontes	Rhodophyta	Rhodophyceae	Cyanidiophycales	Phragmonemataceae	Galderia	sulphuraria	
Chlorobiontes (Ulvophytes)	Chlorophyta	Chlorophyceae	Volvocales	Volvocaceae	Chlamydomonas	reinhardtii	
Haptophytes	Haptophyta	Haptophyceae	Isochrysidales	Isochrysidaceae	Isochrysis	affinis galbana	T-iso
Cryptophytes	Cryptophyta	Cryptophyceae	Chryptomonadales	Cryptomonadaceae	Rhodomonas	salina	
Chlorobiontes (Ulvophytes)	Chlorophyta	Chlorophyceae	Chlorodentrales	Prasinophyceae	Tetraselmis	suecica	
Dinophytes	Dinophyta	Dinophyceae	Peridiniales	Heterocapsaceae	Heterocapsa	triquetra	

Figure 26 : Arbre phylogénique des algues, et position des différentes espèces étudiées, d'après "Classification phylogénétique du vivant" par G. Lecointre & H. Le Guyader. Belin. 2001.

III.2.1.1.1. *Odontella aurita*

O. aurita appartient à la classe des Bacillariophycées (diatomophycées) qui constitue une des classes dominantes du phytoplancton. Ce sont des algues unicellulaires, caractérisées par la présence d'une frustule siliceuse, constituée de deux parties emboîtées l'une dans l'autre. Ces algues produisent des réserves sous forme de polysaccharides. *O. aurita* est une algue classique de la zone néritique, qui ne présente pas de populations abondantes dans le milieu naturel. Sa taille varie de 10 à 95µm, elle se trouve sous forme solitaire ou sous forme de chaîne.

O. aurita a récemment reçu l'autorisation de commercialisation en alimentation de la part de la DGCCRF. Cultivée uniquement en Pays de Loire, riche en acides gras polyinsaturés originaux, tel que les

Chapitre III : Approche méthodologique

oméga 3 qui sont impliqués dans la protection anticancéreuse, en pigments (chlorophylle, caroténoïdes, xanthophylles...) et en substances biologiquement actives. Elle était jusqu'alors réservée à l'industrie cosmétique, pour la fabrication de préparations à usage externe, et aux exploitations aquacoles, en tant que fourrage. La région Pays de la Loire soutient aujourd'hui fortement le développement de ce nouvel ingrédient, notamment en s'impliquant dans le projet de trois entreprises locales, Alphabiotech, Innovalg et Soproma. *O. aurita* est en développement agroalimentaire et se trouve pour l'instant sous forme de complément alimentaire.

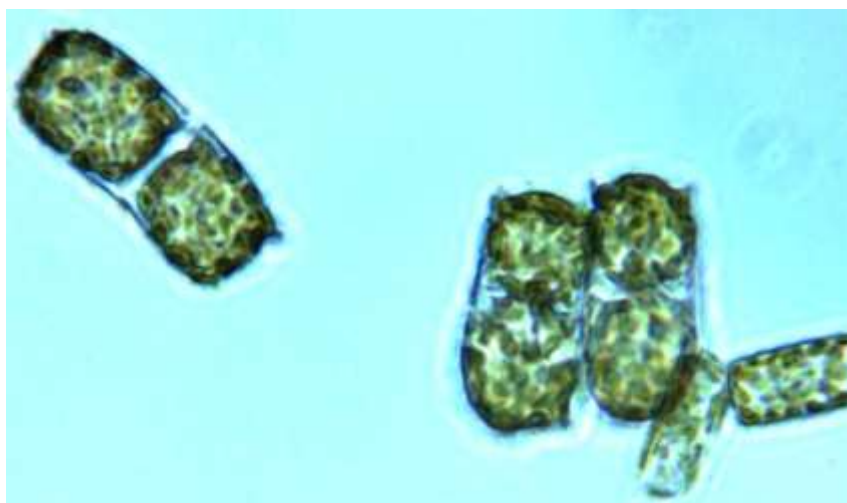


Figure 27 : Observation microscopique de la microalgue *Odontella aurita* (x400).

III.2.1.1.2. Chaetoceros calcitrans forma pumilum

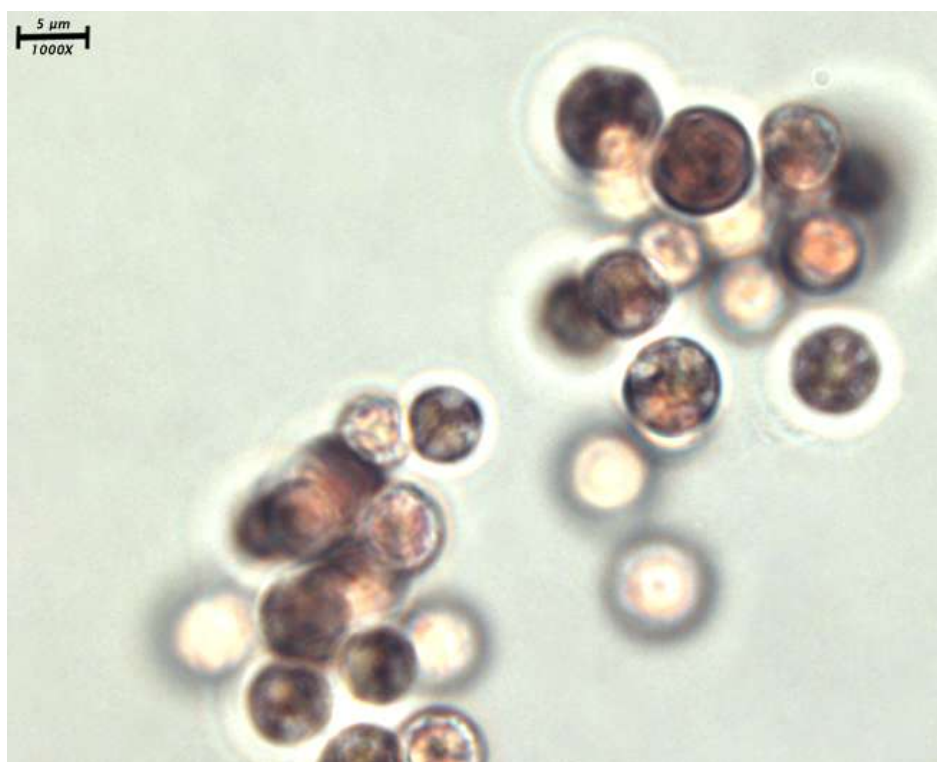
Cette algue possède les caractéristiques générales des Bacillariophycées (diatomophycées). C'est aussi une espèce

Chapitre III : Approche méthodologique

importante productrice d'acides gras poly-insaturés (Brown, 1991; Servel *et al.*, 1994; Volkman *et al.*, 1989), ce qui la rend particulièrement intéressante pour les productions aquacoles.

III.2.1.1.3. Porphyridium purpureum

P. purpureum fait partie de la classe des rhodophycées et possède à ce titre des pigments surnuméraires nommés phycobilliprotéines : l'allophycocyanine, la phycocyanine et la phycoérythrine. Ces pigments sont regroupés dans des phycobilisomes. Cette espèce a été décrite par Ross en 1965 en Atlantique Nord-Est puis en Méditerranée.



Chapitre III : Approche méthodologique

Figure 28 : Observation microscopique de la microalgue *Porphyridium purpureum*, anciennement *cruentum* (<http://www.bio.utexas.edu>).

III.2.1.1.4. *Rhodella violacea*

Cette espèce fait aussi partie de la classe des rhodophycées et possède donc les mêmes caractéristiques pigmentaires que *P.purpureum* (cf. 0). Elle a été décrite par Wehrmeyer en 1971 en Atlantique Nord-Est.

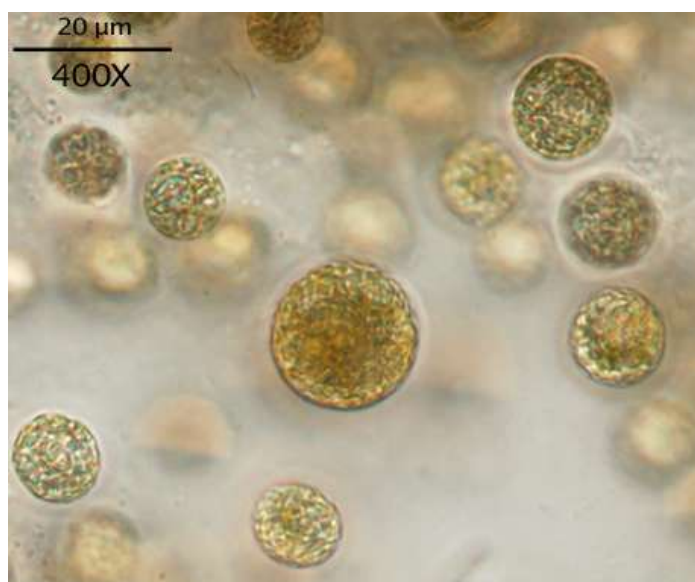


Figure 29 : Observation microscopique de la microalgue *Rhodella violacea* (<http://www.bio.utexas.edu>)

III.2.1.1.5. *Galdieria sulphuraria*

La classification de *G. sulphuraria* a récemment été revue par Albertano *et al.* (Albertano *et al.*, 2000). Elle appartient à la famille des *Phragmonematacea* incluse dans la sous-classe des

Chapitre III : Approche méthodologique

Cyanidiophyceae Merola. C'est une algue extrémophile, d'eau douce, photoautotrophe, c'est-à-dire qui produit sa propre matière organique à partir d'éléments minéraux et de lumière.

L'algue rouge *Galdieria sulphuraria* se développe dans des écosystèmes particuliers tant au niveau de leur température que de la présence de substances chimiques peu courantes. Elle vit dans des sources d'eau chaude à des températures allant jusqu'à 56°C, et acide avec des valeurs de pH comprises entre 0,05 et 3. On a trouvé des populations denses de cette algue dans des secteurs volcaniques d'Italie, d'Islande (Gross & Oesterhelt, 1999) et aux Açores (Gross *et al.*, 2001).

Pour survivre dans cet environnement extrême, elle a dû développer une série d'adaptations spécifiques. Cette algue a de plus la particularité d'être lithotrophe ou hétérotrophe en absence de lumière, en utilisant comme source de carbone de la matière organique ou inorganique (Gross & Schnarrenberger, 1995). Dans les conditions de laboratoire, il a été démontré, que les cellules hydrolysées peuvent former le substrat du développement des cellules en croissance et leur capacité de se développer en hétérotrophie avec au moins 30 sucres et polyols différents. Il a été également observé une croissance cryptoendolithique (Gross *et al.*, 1998) de *Galdieria sulphuraria* dans un secteur minier fortement acide en Espagne. L'isolement de ce milieu non-volcanique n'entraîne pas de différences morphologique et

Chapitre III : Approche méthodologique

physiologique, les souches de *Galdieria sulphuraria* présentent une grande homogénéité morphologique, physiologique et génétique.

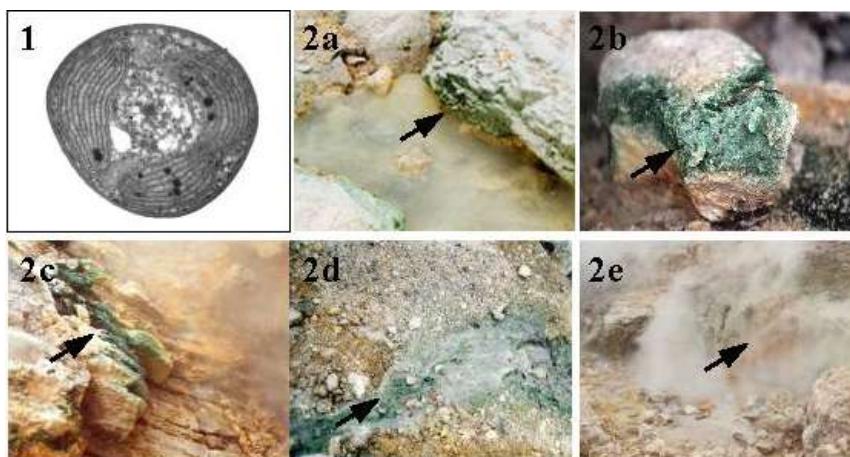


Figure 30 : Observation microscopique (1) et dans le milieu (2a-e) de la microalgue *Galdieria sulphuraria*.

III.2.1.1.6. *Chlamydomonas reinhardtii*

C. reinhardtii est une algue verte unicellulaire de 7 μm de long appartenant à l'ordre des volvocales. Cultivée en milieu liquide, elle se déplace à l'aide de deux flagelles (observation microscopique), cultivée sur milieu gélosé, elle perd ses flagelles et forme des colonies (observation de colonies sur boîte d'agar). Elle possède un noyau haploïde, un chloroplaste unique et de nombreuses mitochondries. L'algue est capable d'autotrophie et d'hétérotrophie vis-à-vis du carbone suivant les conditions de culture : elle est phototrophe mais peut se développer à l'obscurité à partir d'un substrat organique, par

Chapitre III : Approche méthodologique

exemple l'acétate. Des mutants non photosynthétiques peuvent donc être maintenus sur un milieu contenant de l'acétate.



Figure 31 : Observation microscopique de la microalgue *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://www.bio.utexas.edu>)

III.2.1.1.7. Isochrysis affinis galbana (T iso)

T.iso appartient à la classe des *Haptophyceae*. Cette microalgue possède deux flagelles, orientés perpendiculairement l'un par rapport à l'autre. Ces flagelles permettent une capacité de mouvements propres : déplacements vers des zones plus favorables à une production photosynthétique. Les chloroplastes de cette microalgue contiennent des pigments chlorophylliens, xanthophylles et

Chapitre III : Approche méthodologique

caroténoïdes, qui induisent des nuances de coloration brun-or. T-iso est utilisé en aquaculture pour le nourrissage des larves de zooplancton et en particulier des mollusques et des crustacés. Cette microalgue présente également l'avantage de contenir de fortes valeurs lipidiques aussi bien pendant la phase exponentielle de croissance que pendant la phase stationnaire.

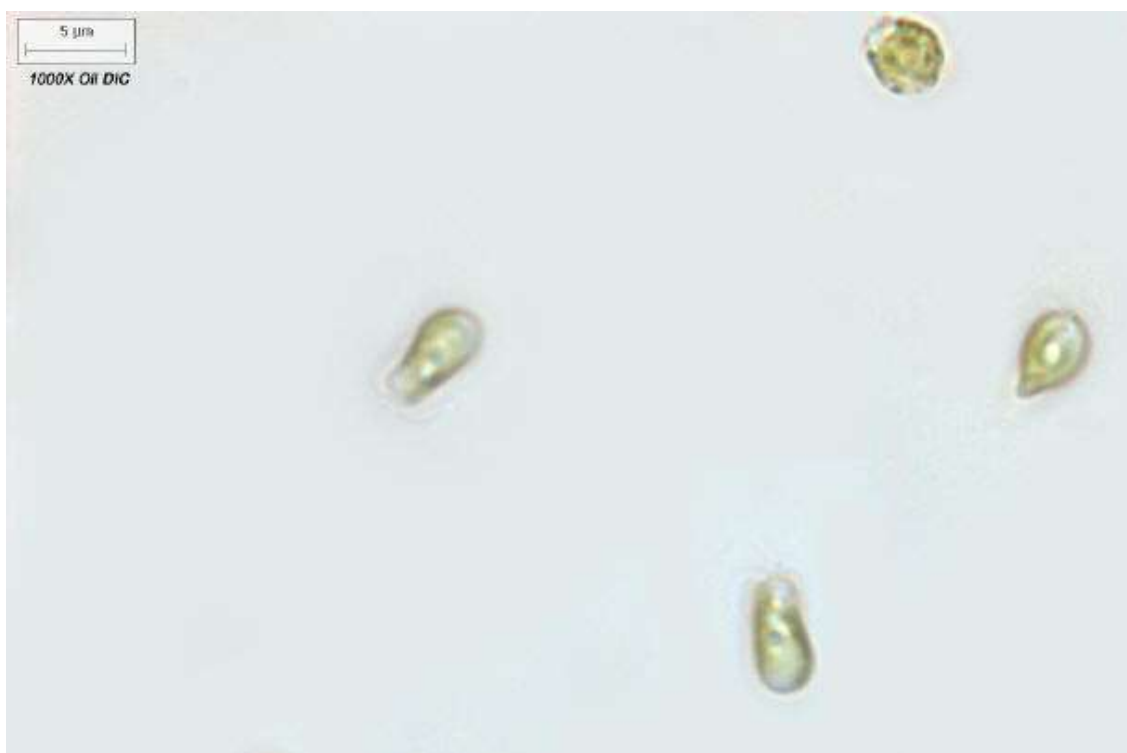


Figure 32 : Observation microscopique de la microalgue *Isochrysis affinis galbana* (<http://www.bio.utexas.edu>).

III.2.1.1.8. Rhodomonas salina

Chapitre III : Approche méthodologique

Cette espèce de relativement grande taille (8 à 16 μm) est de forme ovoïde et possède une partie antérieure légèrement rostrée. Les flagelles, insérés en position sub-apicale sont plus courts que le corps cellulaires. Ils sont souvent incurvés vers la partie dorsale. Le périplaste est composé de petites plaques caractéristiques du genre.



Figure 33 : Observation microscopique de la microalgue *Rhodomonas salina* (<http://microscope.mbl.edu>).

III.2.1.1.9. Tetraselmis suecica

Tetraselmis suecica appartient à la classe des *Chlorophyceae*. Son chloroplaste est vert (les xanthophylles sont présentes en faible quantité). Le chloroplaste renferme de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et parfois de la chlorophylle c. Le chloroplaste contient également des thylacoïdes lamelleux. Les réserves sont constituées d'amidon.

Chapitre III : Approche méthodologique

Tetraselmis suecica est l'espèce la mieux équilibrée en vitamines (liposolubles /hydrosolubles), et elle est la plus riche en vitamines A et E, très intéressantes pour lutter contre le vieillissement de la peau.

C'est une algue unicellulaire flagellée dont la cellule est recouverte d'écailles organiques.



Figure 34 : Observation microscopique de la microalgue *Tetraselmis suecica* (<http://microscope.mbl.edu>).

III.2.1.1.10. Heterocapsa triquetra

Heterocapsa triquetra appartient à la classe des *Dinophyceae* mais n'a pas eu de toxicité démontrée. C'est une cellule de petite taille, biconique au contour irrégulier, dissymétrique selon les axes

Chapitre III : Approche méthodologique

principaux, légèrement comprimée dorso-ventralement. Elle possède une thèque plutôt robuste, constituée de plaques plus ou moins apparentes en microscopie optique. L'épithèque est conique, irrégulière, l'hypothèque conique. Il y a présence de chloroplastes. Cette espèce est capable de supporter de grandes différences de température et de salinité.

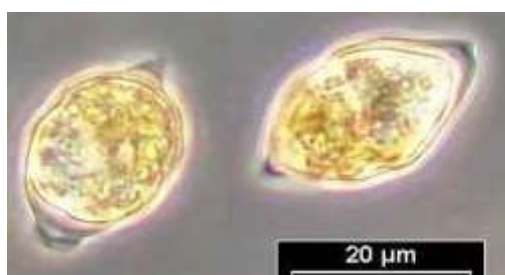


Figure 35 : Observation microscopique de la microalgue *Heterocapsa triquetra* (www.io-warnemuende.de).

III.2.1.2. Les conditions de culture : Culture discontinue

Les différentes souches ont été produites en culture « fed-batch » (culture discontinue, sans renouvellement du milieu mais avec apport régulier de nutriments) dans des ballons en verre de dix litres placés en chambre thermostatée, sous luminosité constante et bullage air/CO₂ 1% (Figure 36). Deux espèces (*C. pumilum*, *O. aurita*) ont par la suite été cultivées dans un volume de 300 l, afin d'obtenir une biomasse plus importante pour réaliser les purifications d'extraits biochimiques.

Chapitre III : Approche méthodologique



Figure 36 : Culture des microalgues en condition batch, avec éclairage artificiel et bullage constant (à gauche en ballon de 10 l, à droite en scobalite de 300 l). Chaque culture est monospécifique. Cette production a été réalisée au sein de l'IFREMER de Nantes en collaboration avec le laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues.

Les différentes cultures sont régulièrement supplémentées en éléments nutritifs (Tableau 10). Les cultures sont laissées en croissance jusqu'à atteinte de la phase plateau. En effet les microalgues présentent un profil de croissance typique des microorganismes en 5 phases principales : phase de latence, phase de croissance exponentielle, phase de ralentissement, phase plateau, phase de sénescence (Figure 37).

Chapitre III : Approche méthodologique

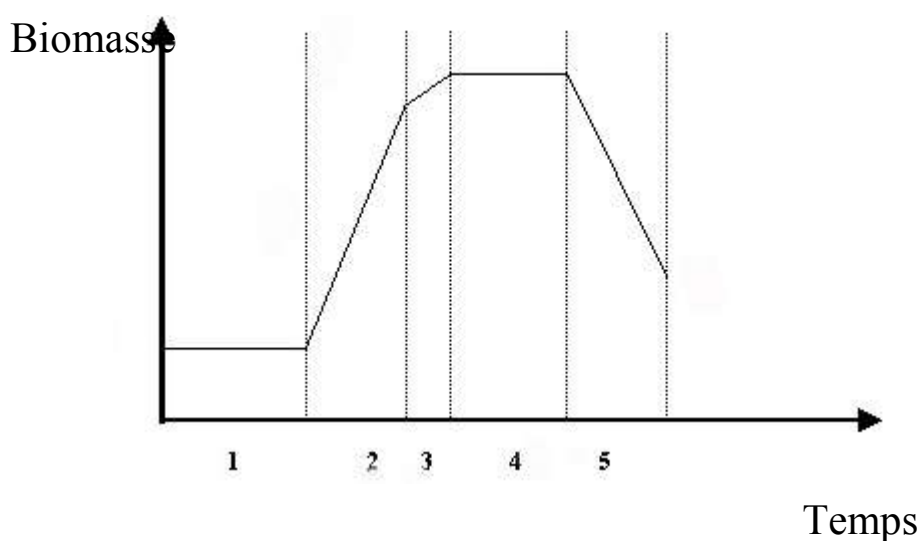


Figure 37 : Courbe de croissance théorique des microalgues en culture discontinue. 1) phase de latence ; 2) phase de croissance exponentielle ; 3) phase de ralentissement ; 4) phase stationnaire ; 5) phase de déclin.

La phase plateau est atteinte pour la plupart des espèces au bout d'un à deux mois de culture lorsque les conditions deviennent limitantes, et principalement en raison du phénomène d'ombrage limitant l'accès à la lumière du fait de la forte densité de population (Figure 36).

Chaque espèce possède un milieu de culture particulier connu (Tableau 10), préparé pour chaque nouvelle production.

Chapitre III : Approche méthodologique

Tableau 10 : Composition des milieux de culture cités dans le Tableau 9, utilisés pour la culture en laboratoire (FW : eau douce, MW : eau de mer). Chaque milieu préparé est stérilisé par autoclavage avant utilisation.

Element	Milieu	Hemerick	Conway	Galdi	MMG/TAP	ESP
NaNO ₃	g L ⁻¹	1,7	0,1			0,07
(NH ₄) ₂ SO ₄	g L ⁻¹			1,5		
NH ₄ Cl	g L ⁻¹				0,4	
K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	g L ⁻¹	0,175			0,106	
KH ₂ PO ₄	g L ⁻¹	0,175		0,3	0,053	
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	g L ⁻¹		0,02			
Na ₂ C ₃ H ₇ O ₆ P, 5H ₂ O	g L ⁻¹					0,01
Na ₂ SiO ₃ , 5H ₂ O	g L ⁻¹		0,1			
FeEDTA	g L ⁻¹	0,05		0,014		
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	g L ⁻¹	0,049	0,045			0,008
CaCl ₂ , 2H ₂ O	g L ⁻¹	1,47		0,02	0,05	
KCl	g L ⁻¹	0,75				
MgSO ₄ , 7H ₂ O	g L ⁻¹	12,3		0,3	0,1	
MgSO ₄ , H ₂ O	g L ⁻¹					0,00082
NaCl	g L ⁻¹	29,0				
TRIS	g L ⁻¹					0,1
Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	µg L ⁻¹			0,08		
CoCl ₂ , 6H ₂ O	µg L ⁻¹		20,0	80	2,927	
CoSO ₄ , 7H ₂ O	µg L ⁻¹	0,091				24
CuSO ₄ , 5H ₂ O	µg L ⁻¹	0,08	20,0	160	2,855	
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6H ₂ O	µg L ⁻¹					3510
FeCl ₃ , 6H ₂ O	µg L ⁻¹		1,3			245
FeSO ₄ , 7H ₂ O	µg L ⁻¹				9,073	
H ₃ BO ₃	µg L ⁻¹	2,0	33,6	5720	20,73	5700
MnCl ₂ , 4H ₂ O	µg L ⁻¹	1,8	0,36	3640	9,2	
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ , 4H ₂ O	µg L ⁻¹	20	9,0	260	2,0	
NaVO ₃ , 4H ₂ O	µg L ⁻¹			80		
O ₅ SV, 5H ₂ O	µg L ⁻¹	0,043				
ZnCl ₂	µg L ⁻¹		21			
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	µg L ⁻¹	0,213		0,44	40	11000
Vitamin B12	µg L ⁻¹		10			2
Thiamin	µg L ⁻¹		200			100
Biotin	µg L ⁻¹					1
QSP L		FW	MW	FW	FW	MW

III.2.1.3. Les conditions de culture : Culture continue de *Galdieria sulphuraria*.

La culture en continu permet la production d'une biomasse de qualité et de composition constante et étalée dans le temps. Le principe de la

Chapitre III : Approche méthodologique

culture en milieu renouvelé consiste à remplacer un volume de culture (algues + milieu) par un même volume de milieu nutritif. Il s'agit donc d'une dilution de la culture. Cette technique doit permettre d'obtenir une biomasse algale numériquement et qualitativement stable.

La culture est menée en continu, dans le photobioréacteur LAMP 2, après un batch préliminaire, lorsque la phase stationnaire de croissance de *Galdieria sulphuraria* est atteinte.

Le système comprend une pompe doseuse à membrane Stepdos KNF assurant le renouvellement du milieu à partir d'une réserve de milieu de culture et un récipient de récolte.

III.2.1.3.1. Le photobioréacteur LAMP 2

Le photobioréacteur LAMP (Lumière Artificielle à Moyenne Productivité) a été conçu par le Laboratoire Physiologie et Biotechnologie des Algues pour permettre la culture de microalgues marines en milieu contrôlé (Figure 38).

Constitué exclusivement de verre borosilicaté (qui tolère les pressions et les températures imposées notamment lors de la stérilisation du réacteur à la vapeur) et d'acier inoxydable, il utilise la lumière artificielle fournie par des tubes fluorescents disposés au centre d'espaces annulaires où circule la culture (Figure 38). La circulation du milieu est assurée par une hélice et un gazosiphon. Le réacteur est maintenu sous pression (1.5 bars absolus) pour éviter toute

Chapitre III : Approche méthodologique

contamination extérieure. Sa surface photosynthétique est de 1.5 m^2 , le volume de culture est de 105 litres.

Les paramètres de culture (température, pH, oxygène, CO_2 , turbidité) sont contrôlés et une régulation des conditions de cultures est effectuée (récolte automatique, électrovanne pour le débit de CO_2).

Chapitre III : Approche méthodologique

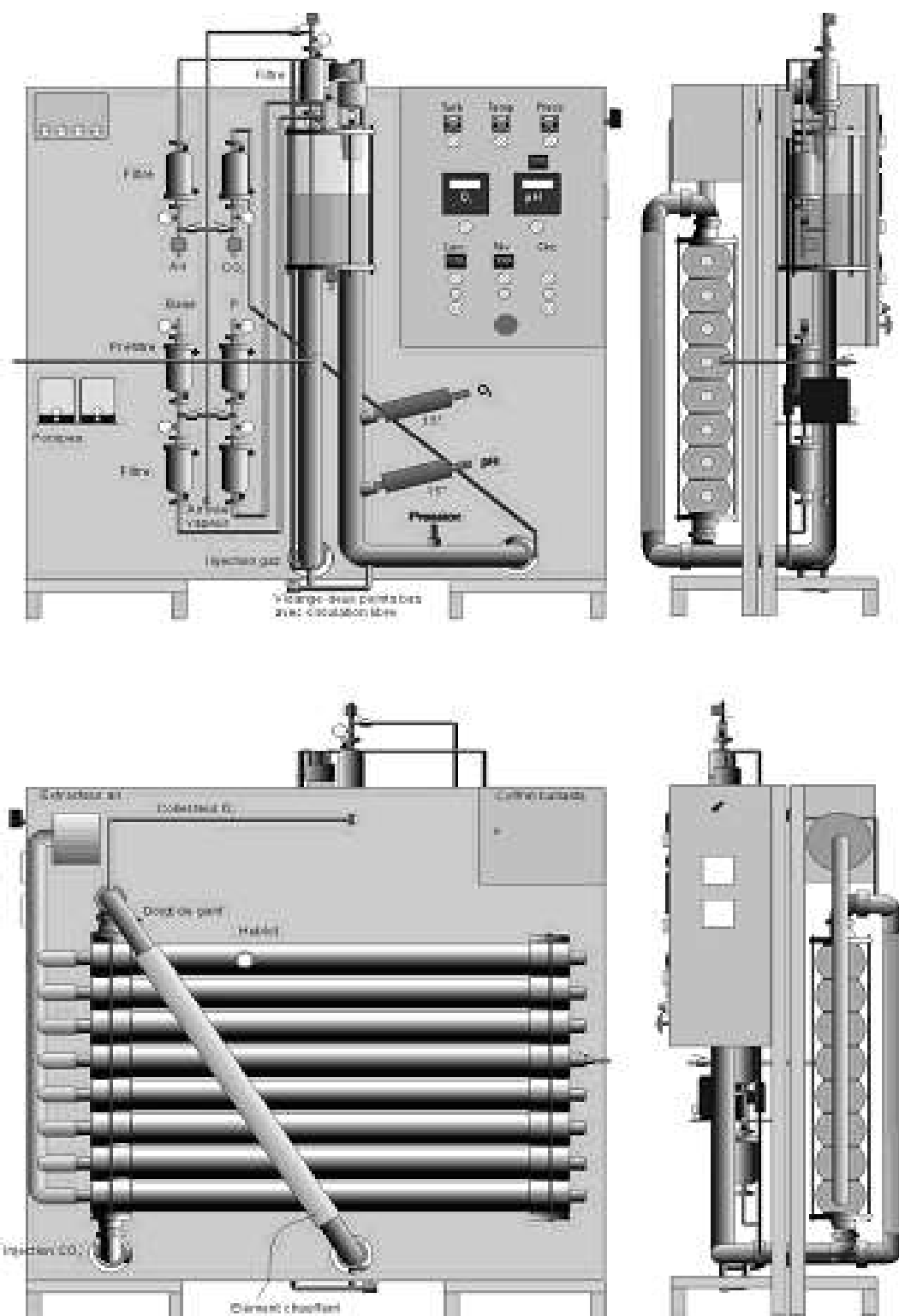


Figure 38 : Représentation du photobioréacteur LAMP 2, vue face avant et arrière, profil gauche et droit (A. Muller-Feuga).

Chapitre III : Approche méthodologique

Principe de fonctionnement

Sur la face avant du réacteur se trouve tous les organes de commande et les électrovannes d'admissions des gaz et pompes d'injection du milieu de culture. A l'arrière sont disposées huit chambres à lumière. Chacune, d'une longueur de 1.5 m, consiste en un espace annulaire formé par un tube en inox (diamètre = 100 mm) au centre duquel se trouve un cylindre en pyrex (diamètre = 40 mm) dans lequel est glissé un tube fluorescent. La culture circule librement autour du tube en verre. Après stérilisation préalable de l'enceinte à la vapeur d'eau, le réacteur est rempli par le milieu de culture jusqu'à un niveau suffisant, visible dans la virole, puis inoculé d'une quantité préalablement déterminée de microalgues. Pour se garder de tout risque de contamination, des filtres stérilisants (hydrophiles pour le milieu et hydrophobes pour les gaz) sont placés aux différentes admissions ainsi qu'à l'évent du réacteur. La culture circule ensuite en boucle dans le procédé, passant alternativement dans chacune des huit chambres lumineuses puis revenant vers la face avant du réacteur, dans le séparateur gaz/liquide (la virole). La vitesse de circulation de la culture est fixée en jouant sur le débit d'air du gazosiphon et sur la vitesse de rotation de l'hélice. L'éclairement des tubes lumineux est maximal et l'intensité lumineuse alors produite n'est pas assez forte pour induire des problèmes de photoinhibition.

Chapitre III : Approche méthodologique

Lors d'une culture, il suffit de fixer les consignes optimales de température, de pH, de concentrations des gaz dissous tels que l'oxygène et le dioxyde de carbone, et de turbidité du milieu, qui seront alors régulées. Il est ainsi possible de réaliser des cultures dans des conditions stables. Le réacteur permettant la culture axénique, les cultures continues peuvent à priori avoir une durée indéterminée dans le temps.

Contrôle des paramètres de culture

La culture est maintenue à 45°C grâce à une gaine chauffante placée sur une partie du circuit du réacteur et une sonde de température. La température optimale de croissance à 47°C n'est pas retenue.

Le pH est celui du milieu injecté à l'origine, c'est à dire de 2. Le pH n'est pas régulé, étant donné que *Galdieria sulphuraria* acidifie d'elle même le milieu, et qu'elle supporte des pH très acides.

La croissance de la culture dépend de l'apport en dioxyde de carbone, qui sera converti par la photosynthèse, mais aussi du dégagement d'oxygène issu de cette réaction. En effet, au delà d'une certaine concentration, l'oxygène devient toxique pour les microalgues. Sa régulation est obtenue par balayage à l'air à l'aide du gazosiphon. L'apport en dioxyde de carbone est régulé par une sonde reliée à une électrovanne qui injecte alors le gaz dans le réacteur. Le temps d'ouverture de cette électrovanne est également relevé. Le débit de l'air est fixé à 3L/min, mais celui-ci est augmenté ou réduit selon les

Chapitre III : Approche méthodologique

besoins en apports de CO₂, la nécessité de balayer plus ou moins l'oxygène en trop forte proportion, ou bien encore afin d'améliorer la circulation de la suspension cellulaire.

Le réacteur doit être mis sous pression afin d'éviter toute contamination extérieure. C'est l'air injecté qui fait monter en pression le réacteur. Lorsque la valeur mesurée par un capteur dépasse la consigne (1.5 bars absolus), une électrovanne s'ouvre et l'air s'échappe par un évent muni d'un filtre stérilisant.

Dans la virole, un niveau haut et un niveau bas sont détectés par une sonde. Comme le réacteur fonctionne en continu, lorsque la culture atteint le niveau haut, une électrovanne provoque la vidange de la virole jusqu'au niveau bas. Une récolte est ainsi effectuée en permanence.

La turbidité est mesurée par une sonde à fibres optiques, durant le suivi de culture. Elle permet de contrôler le maintien d'une biomasse en suspension constante.

III.2.2 Les extractions de molécules organiques

Après avoir été isolées du milieu de culture par centrifugation douce, les différentes souches de microalgues ont été lyophilisées avant d'être utilisées pour les extractions. C'est donc à partir de là que trois types d'extraction ont pu être réalisées, selon les recommandations du N.C.I. (National Cancer Institut). Ces trois extractions ont pour but d'essayer de couvrir tout le spectre de polarité des différentes

Chapitre III : Approche méthodologique

molécules de l'organisme. Ainsi, on les passe dans des solvants de polarités croissantes, avec tout d'abord le dichlorométhane, puis l'éthanol absolu et enfin l'eau. Les extractions sont réalisées à partir de 5g de lyophilisat placés dans 2 fois 500ml de solvant, sous agitation pendant deux heures. Après chaque extraction le lyophilisat est filtré et séché pour être utilisé pour l'extraction suivante.

Les différents extraits obtenus sont reconcentrés au Rotavapor® ou au lyophilisateur pour être utilisés pour les tests pharmacologiques et/ou pour réaliser la purification.

III.2.3 Purification/identification des molécules

Les purifications et identifications ont concerné les extraits présentant les meilleurs résultats des premiers tests pharmacologiques. Ainsi, ce sont différents extraits dichlorométhaniques qui ont été choisis pour poursuivre les analyses chimiques. Ces extraits apolaires ont donc été tout d'abord semi-purifiés sur colonne de chromatographie (Figure 39). Les extraits reconcentrés sont donc déposés sur une colonne de gel de silice/dichlorométhane (gel de silice 60, 0,05-0,2 mm/70-270 mesh ASTM). Les différentes fractions sont alors éluées de la colonne par passage de solvants de polarités croissantes (dichlorométhane → éthanol/méthanol 85 : 15). Après contrôle de l'activité sur chaque fraction obtenue, les fractions intéressantes sont soumises à une purification plus fine en chromatographie sous vide. Le principe est le même, les composés sont élués grâce à des solvants de polarité

Chapitre III : Approche méthodologique

croissante, mais ici la colonne est asséchée après chaque passage du nouveau solvant.

Chapitre III : Approche méthodologique



Figure 39 : Colonne de chromatographie et différentes fractions obtenues. La colonne est réalisée ici à partir d'un extrait dichlorométhane de microalgue.

Les purifications et identifications finales ont été réalisées grâce aux techniques de pointe de la chimie analytique : HPLC, spectrométrie de masse et RMN. Ce travail a été réalisé par les équipes du professeur Vassilios Roussis du Laboratoire de Pharmacognosie, de l'Université d'Athènes, et du Professeur Ernesto Fattorusso du département de chimie des produits naturels, de l'Université de Naples.

III.2.4 La molécule A190

A190 est une triazine de synthèse produite par l'équipe du Professeur E. Antoniadou-Vyza, du département de synthèse chimique de la Faculté de Pharmacie d'Athènes. La formule chimique est : (*4,6-

Chapitre III : Approche méthodologique

diamino-1,2-dihydro-1-(4"-chlorophenyl)-2-(1-tricyclo [3.3.1.1³,4] decyl-1,3,5-triazine*). Elle nous est fournie sous forme lyophilisée et peut être directement dissoute dans l'eau.

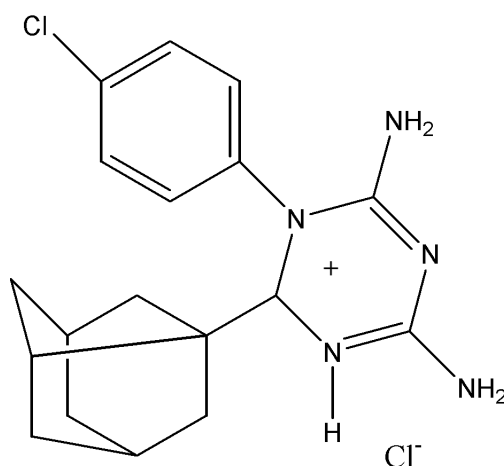


Figure 40 : Structure chimique de A190 (PM : 344,86)

III.3 EVALUATION DU POTENTIEL ANTIPROLIFERATIF

III.3.1 Détermination de l'inhibition de croissance (CI₅₀)

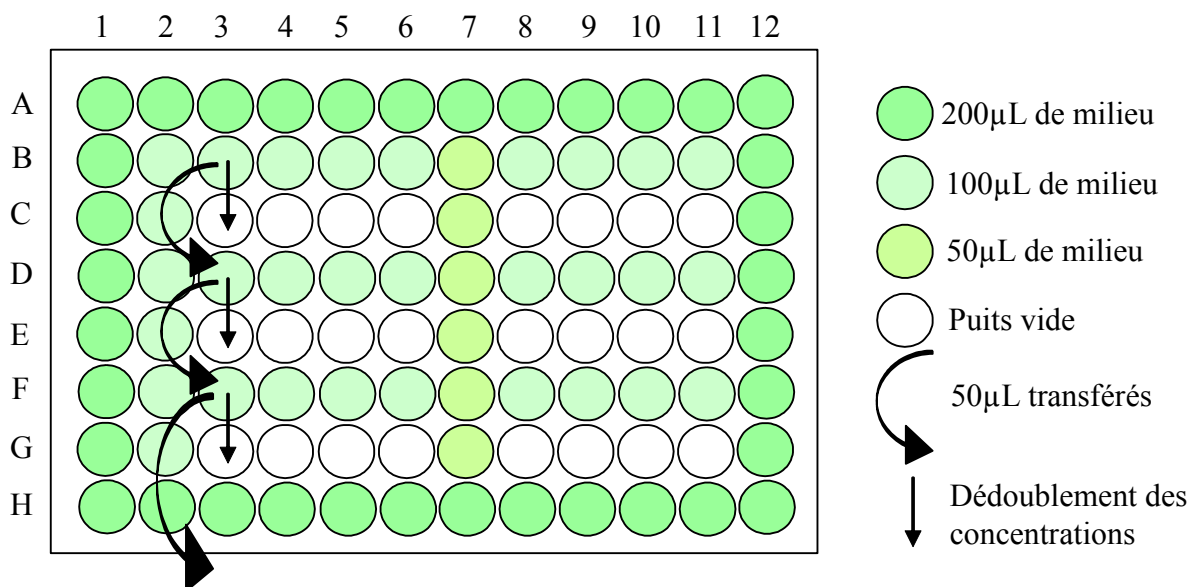
La détermination de l'activité antiproliférative est réalisée en évaluant la concentration de l'extrait inhibant 50% de la croissance cellulaire (CI₅₀) par rapport à un témoin cultivé dans les mêmes conditions en l'absence du composé étudié. Ce test simple et rapide permet de réaliser une sélection rapide des molécules ou composés présentant une activité susceptible de limiter ou stopper la croissance des cellules cancéreuses. Elle est généralement exprimée en µg/ml pour les extraits bruts et en mM pour les molécules pures. Ce test est effectué en microplaque à 96 puits (Falcon) selon le protocole suivant (Roussakis

Chapitre III : Approche méthodologique

et al., 1991). Pour chaque test une solution mère du composé à tester est préparée à une concentration de 1 mg/ml dans de l'eau pour faciliter son utilisation. Les composés apolaires sont tout d'abord dissous dans du DMSO dont la concentration finale, lors du test, n'excédera pas 1% (cette concentration n'ayant pas d'effet sur la croissance cellulaire).

J-1 : Les cellules sont mises en phase exponentielle de croissance la veille par repiquage à une concentration de 2.10^5 cell/ml pour NSCLC-N6, 4.10^4 cell/ml pour A549 et 6.10^4 cell/ml pour SRA, la concentration cellulaire étant évaluée par comptage sur cellule de Malassez.

J 0 : Les plaques sont préparées de la façon suivante (Figure 41).



Chapitre III : Approche méthodologique

Figure 41 : Principe du test de détermination de la CI 50. Le premier puits de test recevra donc le composé dissous dans du milieu de culture à une concentration 6X par rapport à celle effectivement testée.

Distribution du milieu de culture : 200µl est distribué dans les puits périphériques (non utilisable du fait d'une évaporation périphérique trop importante) ainsi que dans le blanc optique (colonne 2). 50µl est distribué dans la colonne témoin (colonne 7) et dans 6 puits d'une plaque dite « J0 » qui sera révélée le jour même de la préparation du test afin d'évaluer le nombre de cellules au temps T0. 100µl est distribué un puits sur deux dans les colonnes restantes (colonnes tests).

Distribution des produits : 50µl de la solution de produit à tester est déposée dans le puits B3 (dilution au 1/3), mélangés par aspiration-rejet et repris pour être placée dans le puits D3. De la même façon, 50µl de D3 sont repris et mis dans F3, mélangés, puis 50µl de ce puits est éliminé. Enfin, les puits sont dédoublés par prélèvement de 50µl de B3, D3, F3 et déposés respectivement dans les puits suivants : C3, E3, G3. On procède de la même façon pour les colonnes 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11. Chaque colonne contient un produit différent.

Distribution de la suspension cellulaire : Une suspension cellulaire à 2.10^5 cell/ml pour NSCLC-N6, 4.10^4 cell/ml pour A549 et 6.10^4 cell/ml pour SRA est préparée par repiquage à partir des cellules en phase exponentielle de croissance. Les puits (produits, colonne témoin, et

Chapitre III : Approche méthodologique

puits de la plaque J0) sont complétés avec 50µl de cette suspension cellulaire (nouvelle dilution 1/2 des produits). Les plaques sont placées à l'incubateur (37°C., 5% de CO₂) 72 heures pour les plaques de traitement et 1 heure pour la plaque J0.

J0, J3 : A l'issue de ce temps d'incubation, la croissance cellulaire est estimée par un test colorimétrique (Mosmann, 1983). 10µl de MTT (3-(4-5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-bromure de tétrazolium, Sigma-Aldrich®, solution à 4mg/ml dans du PBS) est distribuée dans chaque puits. Les cristaux violets formés suite à la réduction du MTT par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes sont solubilisés en ajoutant 100µL d'isopropanol acide (Sigma-Aldrich®). La densité optique (DO) est mesurée à 570nm sur le lecteur de microplaque (ELISA, Titertek multiscan), afin d'évaluer la croissance cellulaire. La DO proportionnelle au nombre de cellules vivantes va permettre pour chaque puits traité de calculer un pourcentage de croissance cellulaire selon la formule suivante :

$$\% \text{ de croissance} = 100 \times \frac{\text{DO cellules traitées (J3)} - \text{DO(J0)}}{\text{DO témoin (J3)} - \text{DO (J0)}}$$

La CI 50 est calculée à partir de l'équation : $\% \text{ de croissance} = \log [\text{concentration}]$

Chapitre III : Approche méthodologique

III.3.2 Etude de la cinétique de croissance cellulaire continue

La compréhension des mécanismes d'activité d'un composé passe par l'étude de son effet au cours du temps. Pour cela on réalise des cinétiques de croissance cellulaire, qui consiste à suivre la réaction des cellules en présence d'un composé au cours du temps. Ainsi, la concentration cellulaire est évaluée à différents paliers réguliers (toutes les 10 à 24h), ce qui permet d'obtenir un profil, dont l'allure peut être associé à un mécanisme d'activité. On distingue 4 profils principaux, correspondant à 4 types d'activités : action alkylante, action de poison pur, action cytotoxique, action cytostatique. Le composé est testé à différentes concentrations entourant la CI_{50} . Il est réalisé en microplaque à 96 puits (Falcon) selon le protocole :

J-1 : Les cellules sont mises en phase exponentielle de croissance la veille par repiquage (cf. III.3.1).

J0 : Une solution du produit est préparée. Elle est 2 fois plus concentrée que la dose à tester. On prépare autant de plaque que l'on désire de temps de détermination de la croissance cellulaire. Chaque plaque est préparée de la façon suivante (Figure 42) :

Chapitre III : Approche méthodologique

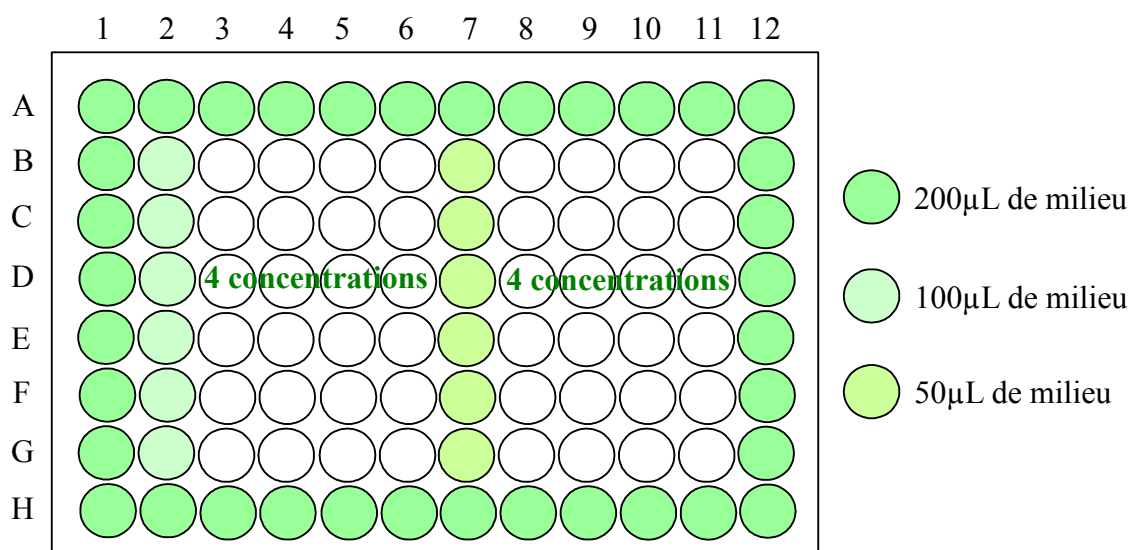


Figure 42 : Organisation d'une plaque 96 puits pour le test de cinétique de croissance.

Distribution du milieu de culture : 200µl est distribué dans les puits périphériques ainsi que dans le blanc optique (colonne 2). 50µl est distribué dans la colonne témoin (colonne 7) et dans 6 puits d'une plaque dite « J0 » qui sera révélée le jour même de la préparation du test afin d'évaluer le nombre de cellules au temps T0.

Distribution des produits : 50µl de la solution de produit à tester à une concentration 2X est distribué dans une colonne. Chaque colonne va représenter une concentration de produit.

Distribution de la suspension cellulaire : Une suspension cellulaire à 2.10^5 cell/ml pour NSCLC-N6, 4.10^4 cell/ml pour A549 et 6.10^4 cell/ml pour SRA et 50µl de cette suspension est ajoutée dans les puits

Chapitre III : Approche méthodologique

(produits, colonne témoin, puits de la plaque J0). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C sous 5% de CO₂ pendant le temps voulu.

J0, J3 : La croissance cellulaire des cellules traitées est mesurée par test colorimétrique au MTT (cf. III.3.1) toutes les 10 à 24h pour les cellules traitées et témoins.

III.3.3 Etude de la cinétique de croissance discontinue

Un effet cytostatique peut témoigner de la sortie définitive des cellules du cycle cellulaire en G1/G0, après traitement les cellules ne peuvent donc reprendre une croissance normale. La détermination de l'irréversibilité de l'activité est réalisée en étudiant la croissance de cellules traitées pendant 72h par le composé d'intérêt, avant d'être replacées dans des conditions normale de culture. Si l'effet cytostatique est irréversible, les cellules traitées par le principe actif ne pourront pas reprendre leur prolifération après élimination du produit. On réalise donc une cinétique de croissance cellulaire discontinue, les cellules sont d'abord soumises à l'action du produit pendant 72 heures et la croissance n'est évaluée qu'après retrait du produit.

L'évaluation de la croissance cellulaire par test colorimétrique est alors effectué à partir de l'arrêt du traitement à des temps régulier pendant 72h. Une courbe de croissance nulle démontre l'irréversibilité d'action du produit.

Chapitre III : Approche méthodologique

III.3.4 Détection de l'apoptose

III.3.4.1. Morphologie cellulaire : marquage à l'acridine orange

L'acridine orange est un fluorochrome qui se fixe aux acides nucléiques. Il permet de colorer les cellules en culture en marquant différenciellement l'ADN (vert) et l'ARN (rouge). Après traitement, les cellules sont incubées 15 min avec 10µg/ml d'acridine orange avant d'être observé avec un microscope à fluorescence sous lumière bleue (filtre excitant : BP 450-480). Les cellules apoptotiques présentent une morphologie facilement identifiable : condensation puis fragmentation du noyau, cassure régulière des chromosomes puis bourgeonnement du cytoplasme sous forme de petits ballonnets nommés corps apoptotiques, surproduction d'ARNm.

III.3.4.2. Fragmentation de l'ADN génomique

Le fractionnement de l'ADN génomique est considéré comme le trait le plus caractéristique de la mort cellulaire par apoptose. Les endonucléases qui ont été activées durant l'apoptose clivent tout d'abord l'ADN en larges fragments de 50 à 300 kb qui sont ensuite clivés en de multiples petits fragments d'environ 180 à 200 pb. La méthode de détection des bandes de 50 à 300 kb nécessite un équipement spécial. C'est pourquoi la méthode la plus communément

Chapitre III : Approche méthodologique

utilisée est la détection des multiples petits fragments à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose ou d'acrylamide (Au *et al.*, 1997).

L'extraction d'ADN est effectuée de la façon suivante :

J-1 : Les cellules sont mises en phase exponentielle de croissance la veille par repiquage à une concentration $7,5 \cdot 10^4$ cellules/ml après comptage sur cellule de Mallassez.

J0 : Les cellules sont mises en culture avec le produit à tester à la dose voulue dans des flasques 75 cm³. Les flasques sont ensuite incubées 72 heures à 37°C et 5% de CO₂.

J3 : l'extraction est réalisée selon le protocole classique phénol/chloroforme. Les cellules sont rincées au PBS froid deux fois, trypsinées, remise en suspension dans 0,5 mL de tampon de digestion (100mM NaCl, 10mM Tris Cl pH8, 25mM EDTA pH8, 0,5% SDS, 0,1 mg/mL protéinase K) et incubées, sous agitation, à 50°C pendant 12 heures. Après la lyse cellulaire, l'ADN est extrait après ajout d'un volume de phénol/chloroforme/alcool iso amylique (25 : 24 : 1, vvv). Les tubes sont vortexés 1 min puis centrifugés 10 min à 10000 rpm. Après récupération de la phase aqueuse, ajout d'un demi volume d'acétate d'ammonium (7,5M) et de 2 volumes d'EtOH 100%. L'ADN précipite immédiatement formant une volute blanchâtre. Une centrifugation à 5000 rpm pendant 2 min permet de culoter l'ADN. Le culot est rincé une fois avec de l'EtOH à 70%, séché et dissout dans du TE. L'échantillon est alors stocké à 4°C à la concentration de 1mg/mL. Une migration de 2µg d'ADN de chaque échantillon est

Chapitre III : Approche méthodologique

ensuite effectuée sur gel d'agarose 2 % contenant du bromure d'éthidium dans du TBE 1X. Ce gel est migré à 75V. Après observation sous UV, les profils des différents échantillons sont comparés. Les cellules ayant subi une mort cellulaire de type apoptotique, présente un smear révélant la fragmentation de l'ADN, ainsi qu'une bande plus marquée autour de 200pb typique de l'apoptose.

III.3.5 Etude du cycle cellulaire

Pour satisfaire à nos critères d'évaluation du profil de croissance cellulaire, l'arrêt irréversible du cycle cellulaire doit se faire au niveau d'une phase bien précise. Pour déterminer cette phase, nous avons choisi l'analyse par cytofluorimétrie en flux. Cette technique permet de caractériser le contenu en ADN des cellules de manière qualitatif et quantitatif après marquage à l'iodure de propidium et excitation par un faisceau L.A.S.E.R. Le marquage nucléaire est réalisé selon, la méthode de Vindelov (Vindelov, 1977) et l'analyse se fait dans les conditions suivantes :

J-1 : Les cellules sont mises en phase exponentielle de croissance la veille par repiquage.

J0 : Les cellules sont mises en culture avec le produit à tester à la dose voulue dans des plaques 6 puits à fond plat. La plaque est ensuite incubée 72 heures à 37°C et 5% de CO₂.

J3 : Les cellules sont rincées au PBS puis fixées et marquées avec la solution de Vindelov : 1mL de solution (0,01M de glycine/NaOH ;

Chapitre III : Approche méthodologique

$9,6.10^{-5}$ M iodure de propidium ; 0,1M de Nonidet P40 ; 700UI de ribonucléase A ; 0,3M NaCl ; diluée au 1/2 dans du PBS) est ajouté aux cellules. Puis, les plaques sont incubées à 4°C pendant 1 heure. Chaque suspension cellulaire est alors décollée au moyen d'une pipette pasteur par aspiration/rejet, puis filtrée à travers une membrane de nylon (50 μ m) avant d'être analysée par cytofluorimétrie en flux (FACScan, Becton Dickinson). L'analyse porte sur 40 000 événements. Le contenu en ADN est analysé grâce à l'émission de fluorescence de l'iodure de propidium fixée sur l'ADN à 585nm.

IV. ETUDE DES CIBLES MOLECULAIRES

IV.1 ETUDE DE LA REGULATION DE LA TRANSCRIPTION

IV.1.1 Extraction d'ARN

L'extraction du pool ARN des cellules cancéreuses a été réalisée grâce à la solution d'extraction d'ARN totaux RNAbles®, basée sur la méthode de Chomczynski (Chomczynski & Sacchi, 1987).

IV.1.2 La PCR quantitative

La PCR (Polymerase Chain Reaction) a révolutionné la biologie moléculaire des années 1990 et a été couronnée par l'attribution du prix Nobel de chimie en 1993 (Mullis & Faloona, 1987). Elle est fondée sur l'amplification de fragments d'ADN délimités par deux courtes séquences reconnues par deux oligonucléotides, dites amorces, par l'action d'une ADN polymérase résistante à haute température (95°C).

Récemment est apparue une évolution de cette technique fondamentale pour réaliser des études quantitatives, visant à remplacer les techniques de Southern et Northern Blot : la PCR en temps réel. Cette technique mesure la cinétique de formation du produit d'amplification au cours de la réaction de PCR, sans l'interrompre, et en déduit une quantification de la cible dans l'échantillon analysé. Elle peut s'appliquer aussi bien à l'analyse en RT-PCR qu'à l'analyse

Chapitre III : Approche méthodologique

génomique sur matrice d'ADN (Chiang *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 1996; Heid *et al.*, 1996). Cette technique permet de mettre directement en relation les quantités d'amplicon produit par la PCR avec la quantité d'ADN matrice

Cette méthode nécessite : un marqueur fluorescent, dont le signal augmente de manière spécifique avec l'amplification au cours de la réaction de PCR, et un système de mesure externe de la fluorescence en temps réel. Le module de détection fait appel à une excitation par laser ou diode de tungstène et la mesure de la fluorescence réémise à des intervalles très rapprochés au cours de la réaction de PCR.

Deux systèmes fluorescents sont disponibles :

Sybr® Green : agent intercalant qui émet une fluorescence lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin (Figure 43). Il présente l'avantage d'être utilisable sans restriction avec tous les systèmes de détection, mais n'assure qu'une spécificité relative qui peut nécessiter une vérification.

Sonde spécifique (TaqMan®) : ce système utilise soit une sonde doublement marquée à ses deux extrémités, soit deux sondes se fixant en tandem sur la séquence cible.

Chapitre III : Approche méthodologique

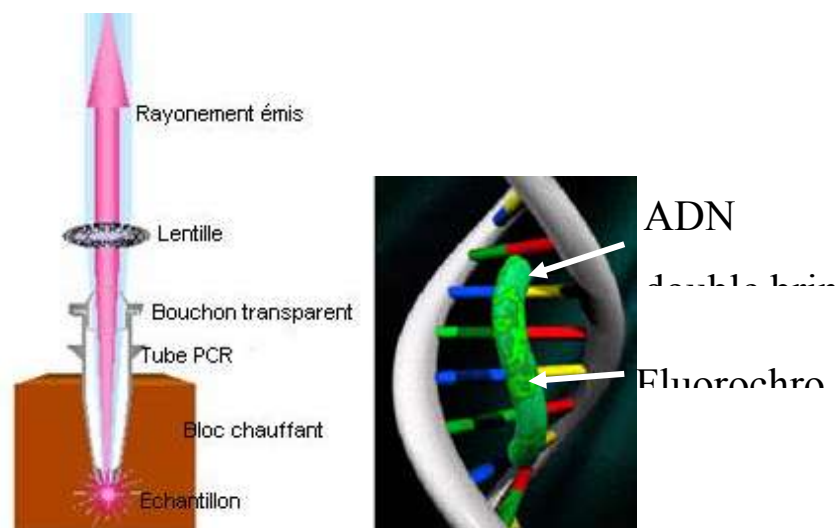


Figure 43 : Principe de la PCR temps réel avec Technologie Sybr® green, le fluorochrome vient se fixer à la double chaîne d'ADN et peut alors émettre une fluorescence suite à une excitation (www.cgmh.org.tw).

La quantification de la séquence cible se fait grâce à l'établissement d'une courbe de calibration avec des dilutions des ADN d'une lignée témoins ou d'une quantité connue de plasmides. Pour chaque point de la gamme, on définit le seuil de détection également appelé « cycle threshold » (Ct) à partir duquel la fluorescence détectée dépasse le seuil de positivité (threshold), ce qui permet d'établir une courbe d'étalonnage. Il suffit alors de reporter le Ct obtenu pour l'échantillon à analyser dans cette courbe et d'en déduire une quantification de la cible. L'efficacité et la spécificité de la PCR sont évaluables par la pente de cette courbe (slope) qui doit être proche de 3,3, ce qui correspond à une efficacité de 100 %.

Comme pour tout dosage quantitatif, le résultat est corrigé grâce à l'amplification sur le même échantillon d'un gène de référence

Chapitre III : Approche méthodologique

d'expression ubiquitaire qui permet la normalisation quantitative et qualitative de l'échantillon analysé. Le choix de ce gène est crucial, en effet il doit être d'expression constante quels que soient les tissus ou les pathologies en cause. De plus, son niveau d'expression et sa cinétique de dégradation doivent être proches de ceux du gène cible analysé.

En conclusion, cette technologie apporte, au-delà de son aspect quantitatif, une définition de la qualité du matériel étudié, grâce à l'utilisation d'un gène domestique, très nettement supérieure aux approches qualitatives. Sa facilité d'utilisation et les avantages qu'elle apporte en font certainement une approche dont les applications seront de plus en plus larges.

Pour réaliser les différents dosage d'ARN messenger par PCR quantitative, nous avons utilisé au cours de cette thèse la technologie Sybr® Green. Nous avons utilisé le kit Sybr® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) selon les recommandations du fabricant. Les réactions de PCR ont été réalisées dans des plaques 96 puits. Une organisation particulière des différentes amplifications à réaliser a dû être mise en place pour chaque plaque (Figure 44). En effet, pour chaque expérimentation il a fallu réaliser des gammes étalons pour les différents gènes, et prévoir des contrôles pour les risques de contaminations et d'amplifications aspécifiques.

Pour chaque gène étudié nous avons dessiné des amorces spécifiques, à l'aide du logiciel primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Les amorces

Chapitre III : Approche méthodologique

devaient répondre aux exigences spécifiques de la PCR quantitative. Ainsi les amplicons font une taille comprise entre 50 et 150 pb, et la température d'hybridation des amorces se situe autour de 60°C. Utilisant la technologie Sybr® Green, il nous a fallu éviter les risques d'hybridation des amorces sous forme de dimère (appariement de deux amorces complémentaires). Pour cela nous avons donc utilisé le logiciel oligo toolkit (<https://www.operon.com/oligos/toolkit.php>), pour détecter les dimères d'amorces. Nous avons donc un couple d'amorce par gène cible (HEF1 et B2) et un couple pour le gène de référence β -actine. Pour le gène HEF1 les deux amorces ont été choisies sur deux exons différents (exons 2 et 3) pour éviter tout risque d'interférence avec le gène B2.

Les séquences retenues sont donc :

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
B2	5'-ATTCCCTTGCCTTCTTGGAT-3'	5'-CGTGAGGTCTGCCACTACAG-3'
HEF1	5'-CCGCTGCCGAAATGAATAT-3'	5'-CCCTGTGTTCTGCTCTATGACG-3'
β-Actin	5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3'	5'-GTACTTGCGCTCAGGAGGAG-3'

Les différentes PCR ont été réalisées sur un ABI PRISM® Sequence detection System 5700 (Applied Biosystems™).

Chapitre III : Approche méthodologique

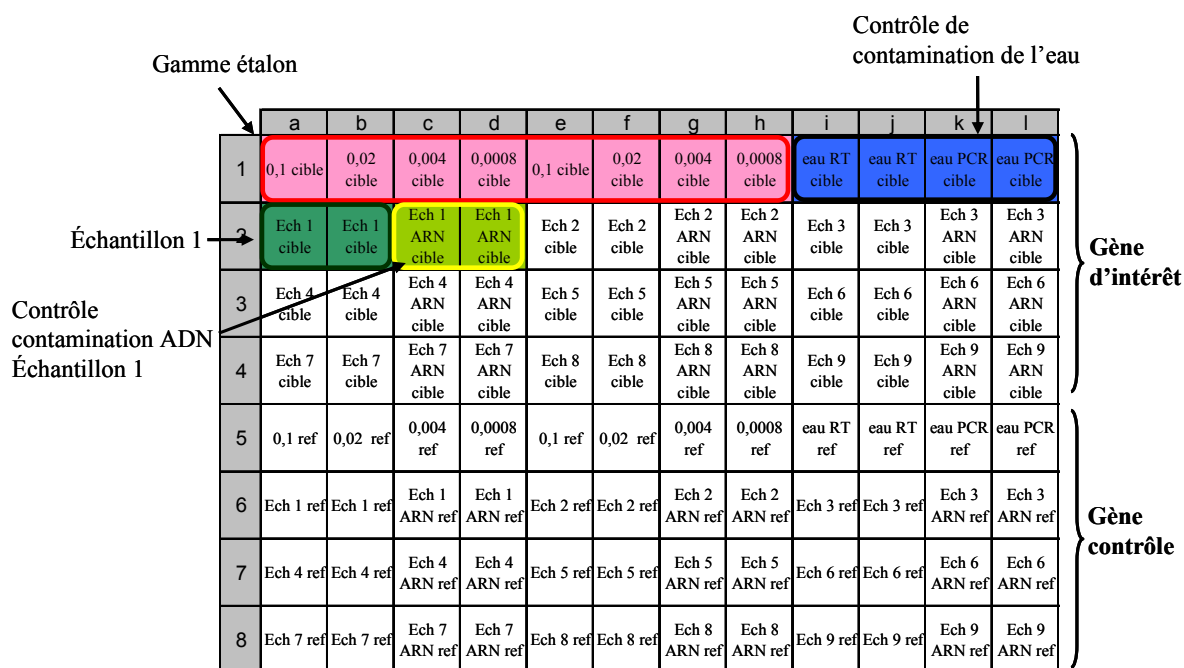


Figure 44 : Représentation schématique de l'organisation d'une plaque pour un test de PCR quantitative (Ech : échantillon, Ech ARN : témoin contrôle de contamination ADN = échantillon sans reverse transcription, cible : gène d'intérêt, ref : gène contrôle). On a mis en évidence ici les différents types de PCR réalisées : une gamme étalon en répliquant avec quatre dilutions des ADNc, des contrôles de contamination de l'eau utilisée pour la préparation des mix PCR, et les amplifications des gènes pour les différents échantillons accompagnés par des contrôles de contamination ADN des ARN utilisés pour la reverse transcription. On a donc une demi-plaque pour le gène d'intérêt étudié et une demi-plaque pour le gène contrôle permettant de pondérer les résultats lors de l'analyse. On voit alors que seul 9 échantillons peuvent être analysés sur une plaque 96 puits.

Les résultats obtenus par dosage de la fluorescence en temps réel ont alors été analysés par résolution graphique grâce au logiciel GeneAmp® 5700 SDS. Le logiciel calcul pour chaque échantillon une

Chapitre III : Approche méthodologique

valeur de Ct (cf. plus avant) à partir des courbes logarithmiques (Figure 45).

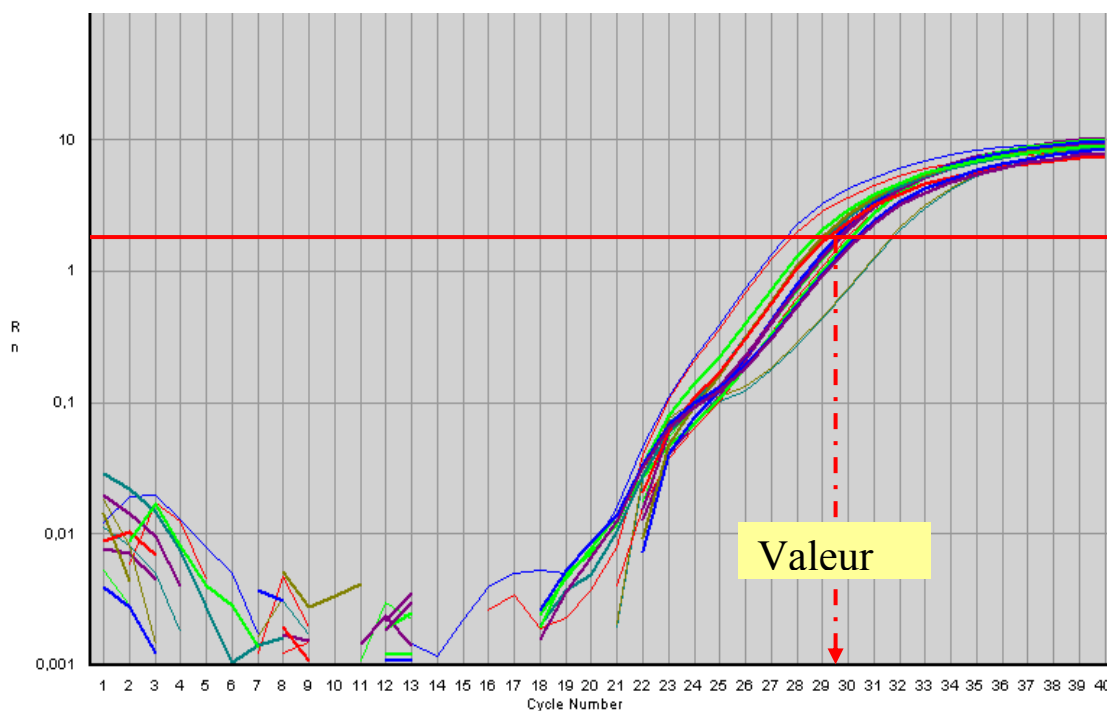


Figure 45 : Graphique de l'évolution de la fluorescence au cours des cycles de PCR en valeur logarithmique. Représentation de la ligne de base permettant de déterminer graphiquement la valeur de Ct.

La réalisation d'une gamme étalon permet d'attribuer une valeur de quantité de matrice à chaque échantillon (Figure 46). Les données sont alors regroupées dans un tableau peuvent être analysées. Pour chaque échantillon la quantité de matrice du gène d'intérêt évalué sera pondérée par la valeur du gène contrôle. On obtient ainsi une quantité relative d'ARN messager du gène cible présent dans chaque cellule.

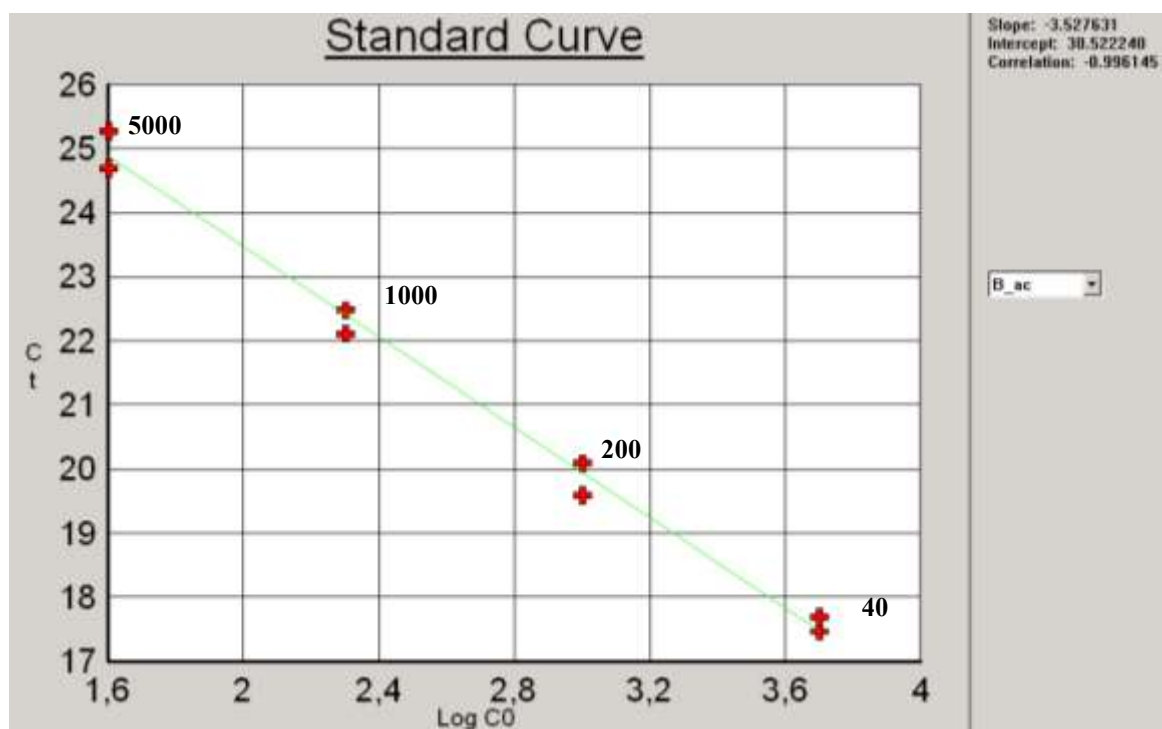


Figure 46 : Graphique de la gamme étalon. Relation entre les valeurs de C_t et des valeurs arbitraires attribuées en fonction de la dilution des ADNc matrices.

IV.2 ETUDE DE LA REGULATION DE LA TRADUCTION

IV.2.1 Extraction protéique

L'extraction protéique consiste à lyser les cellules pour en faire sortir le contenu protéique, qui se retrouve immédiatement solubilisé dans le tampon de lyse. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation, seul le surnageant contenant les protéines est conservé.

Les cellules à étudier sont donc incubées avec un tampon de lyse : NaCl 50mM, EDTA 5mM, Triton X-100 1% (détergeant permettant la déstructuration des membranes), NaF 50mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM, cocktail d'antiprotéase Roche® (Complete™ Mini, Protease Inhibitor

Chapitre III : Approche méthodologique

Cocktail), pH 7,5 pendant 30 min à 4°C. La faible température et le cocktail d'antiprotéase permettent d'éviter un maximum de dégradation des protéines par les protéases libérées lors de la lyse cellulaire. La lyse complète des cellules est vérifiée au microscope optique. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 10 000g pendant 10 min à 4°C. Les échantillons seront alors utilisés aussitôt ou pourront être conservés à -20°C.

IV.2.2 Analyse quantitative par Immunoprécipitation/Western blot

L'objectif de l'immunoprécipitation est d'isoler spécifiquement une protéine d'un lysat cellulaire. Le principe repose sur la création d'un réseau protéique en utilisant des anticorps spécifiques comme agent de liaison. Le premier anticorps se lie aux protéines à précipiter et un anticorps secondaire (*e.g.* anti-souris de chèvre) permet de relier les anticorps primaires en réseau. Il en résulte un complexe de poids moléculaire élevé qui peut être précipité par centrifugation. Une autre stratégie consiste à utiliser un composé reconnaissant l'anticorps primaire (ou secondaire) et qui est suffisamment lourd à lui seul (tel la protéine A-agarose) pour permettre la précipitation du complexe par centrifugation (Figure 47).

Chapitre III : Approche méthodologique

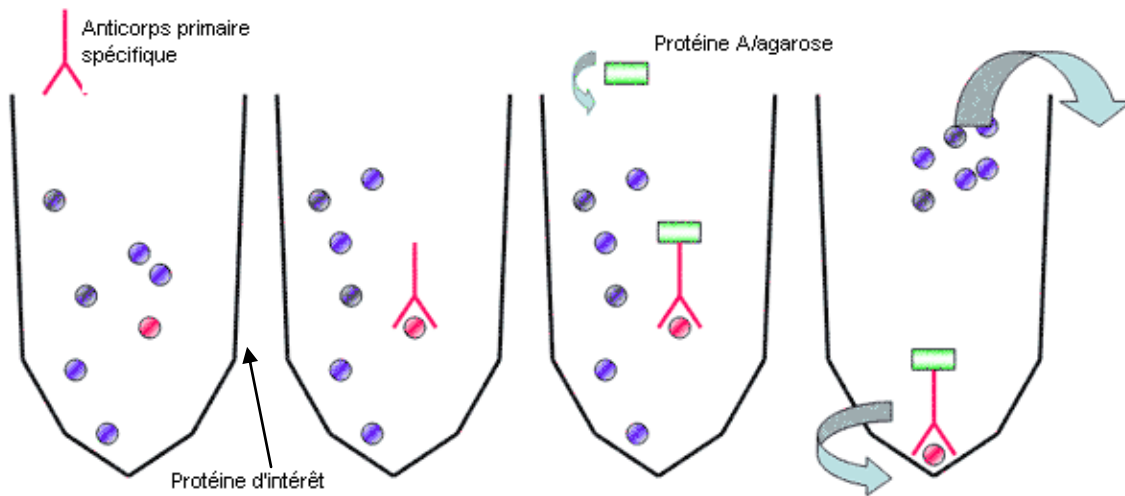


Figure 47 : Principe de l'immunoprécipitation. L'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est mise en présence de l'extrait protéique total. L'anticorps primaire reconnaît et se couple à la protéine. Une protéine A fixée à une bille d'agarose et ensuite ajoutée. Elle est immédiatement reconnue et fixée par l'anticorps. Le nouveau complexe ainsi alourdi peut être isolé du reste des protéines par centrifugation.

Le Western blot est une méthode de protéomique utilisée pour détecter une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique de cette protéine. La première étape est l'électrophorèse sur gel. Les protéines de l'échantillon sont séparées selon la taille sur un gel d'acrylamide SDS-PAGE dénaturant. Le gel possède plusieurs puits de sorte qu'il soit possible d'analyser plusieurs échantillons simultanément.

Les protéines dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose ou par application d'un courant. Ce processus est nécessaire puisqu'il permet d'exposer les protéines à l'anticorps. La membrane est "collante" et lie des protéines non-spécifiquement (c.-à-

Chapitre III : Approche méthodologique

d. qu'elle lie toutes les protéines présentes dans l'échantillon). Les protéines vont se fixer à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques.

Le blocage de la membrane permet ensuite de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Il consiste à plonger la membrane dans une solution de BSA ou de lait en poudre sans matières grasses. Sans blocage, les anticorps appliqués lors de l'étape suivante se fixeraient partout sur la nitrocellulose.

Le premier anticorps (souvent appelé anticorps primaire, identique à celui de l'immunoprécipitation) est incubé avec la membrane. Il est dilué dans une solution contenant une faible quantité de sel tel que le chlorure de sodium, quelques protéines (telle que la BSA) pour empêcher les fixations non spécifiques de l'anticorps sur la membrane et dans un tampon afin de garder la solution proche d'un pH neutre. La solution diluée d'anticorps et la membrane sont doucement agitées pour une "incubation" d'environ une heure. L'anticorps primaire ne reconnaît et ne va se fixer que sur la protéine d'intérêt. Cet anticorps primaire est obtenu en immunisant un animal (habituellement un lapin ou une souris) avec la protéine d'intérêt (c'est-à-dire, en injectant la protéine dans le corps de l'animal). On prélève ensuite les anticorps que l'animal a produit contre cette protéine.

La membrane va ensuite être rincée afin d'enlever les anticorps primaires non liés, puis des anticorps secondaires vont être incubés avec la membrane. Ces anticorps vont se lier aux premiers anticorps

Chapitre III : Approche méthodologique

(ils sont habituellement produits par un animal différent). Cet anticorps secondaire est lié à une enzyme (*e.g.* peroxydase) qui permet l'identification visuelle de la protéine d'intérêt sur la membrane. Comme pour les techniques ELISPOT et ELISA, lorsque l'on va rajouter le substrat adapté à l'enzyme, il va en résulter une réaction colorée qui sera visible sur la membrane.

IV.2.2.1. Immunoprécipitation

Les analyses par Immunoprécipitation/Western Blot ont été réalisées sur la protéine HEF1, en utilisant 2 anticorps :

Cas-L/2G9 (Santa Cruz Biotechnology®) reconnaissant la partie N-terminale de HEF1 des acides aminés 82 à 398 (IgG monoclonal de souris). Les différentes protéines pouvant être reconnues font, 115, 105 et 55 kD

Cas-L/H70 (Santa Cruz Biotechnology®) reconnaissant la partie C-terminale de HEF1 des acides aminés 765 à 834 (IgG polyclonal de lapin). Les différentes protéines pouvant être reconnues font, 115, 105, 65 et 29 kD.

L'actine a été choisie comme protéine de contrôle :

Actin/C2 (Santa Cruz Biotechnology®) reconnaissant la partie C-terminale de l'actine humaine (IgG monoclonal de souris). La protéine reconnue fait 39kD.

L'anticorps primaire (environ 1µg) est directement placé dans l'extrait de protéines cellulaire et incubé sous agitation à 4°C sur la nuit. Le

Chapitre III : Approche méthodologique

lendemain on ajoute 20µl de protéine A/G-Plus agarose® (Santa Cruz Biotechnology, Inc), le tout est remplacé sous agitation à 4°C pendant 2h. Le complexe protéine/anticorps/protéine A/G ainsi formé est précipité par centrifugation 5 min à 1000g. Le surnageant contenant le reste des protéines est alors éliminé et le culot est rincé 3 fois au PBS. Les complexes sont enfin repris dans 20µl de PBS et placés à 100°C pendant 5min. Cette phase de chauffage va casser les liaisons entre anticorps et protéine et libérer notre protéine d'intérêt. Le tout est ensuite directement passé sur gel d'électrophorèse.

IV.2.2.2. Electrophorèse de protéine

Préparation du gel : L'électrophorèse est réalisée sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE à l'aide du support protean II BioRad®. Le gel est composé d'un stacking à 4% surmontant un gel de séparation variant entre 7,5 et 12% en fonction de la taille des protéines étudiées (Tableau 11). Le gel est donc réalisé en deux étapes tout d'abord le gel de séparation qui se termine à environ 1,5 cm du bord de la plaque de verre la plus basse (environ 3,7ml de gel), le niveau supérieur du gel termine droit (il est recouvert d'eau pour faciliter la polymérisation). Puis une fois celui-ci polymérisé, on dépose le gel de stacking (environ 1,5ml) et on y place le peigne.

Tableau 11 : Composition des différents gels de polyacrylamide utilisés pour l'électrophorèse de protéine.

Chapitre III : Approche méthodologique

Produits	Gel de stacking	Gel de séparation		
	4%	7,50%	10%	12%
Acrylamide/Bis 37,5:1, 30%	330µl	1250µl	1670µl	2000µl
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	625µl			
Tris-HCl 1,5M pH 8,8		1250µl	1250µl	1250µl
SDS 10%	25µl	50µl	50µl	50µl
H₂O Δ	1495µl	2400µl	1980µl	1650µl
APS 10%	25µl	50µl	50µl	50µl
Temed	5µl	5µl	5µl	5µl

Le gel est ensuite placé dans la cuve d'électrophorèse et baigne dans le tampon de migration : Tris 0,25M, Glycine 1,95M, SDS 1%, pH 8,3. Chaque électrode est séparée par le gel, le courant ne passe donc qu'à travers le gel d'électrophorèse.

Dépôt des échantillons : Les échantillons mélangés au tampon de charge (Tris-HCl 50mM, DTT 100mM, SDS 2%, Bleu de bromophénol 0,1%, Glycérol 10%, pH 6,8) sont déposés sur le gel, avant d'être soumis à un champ électrique de 110V pendant environ 2h. La migration est suivie grâce au bleu de charge et au Kaleidoscope marqueur de taille (Precision plus Protein™ Standards, BioRad®).

IV.2.2.3. Western Blot

Transfert sur membrane : Le transfert est réalisé dans un électroblotter semi-sec en réalisant le montage suivant : Cathode, trois feuilles de papier absorbant imbibées de tampon de transfert (Tris 20mM, Glycine 150mM, Méthanol 20%, SDS 0,2%, pH 8), gel contenant les protéines, membrane de nitrocellulose (Hybond™-ECL™,

Chapitre III : Approche méthodologique

Nitrocellulose membrane, Amersham Biosciences®), trois feuilles de papier absorbant imbibées de tampon de transfert, anode. Le montage est alors soumis à un courant d'intensité constante de 150 à 300 mA selon la taille de la membrane. Le transfert est réalisé pendant 45min à 2h30min en fonction de la taille des protéines à transférer. La membrane est ensuite immédiatement placée dans le tampon de blocage (PBS, Tween 20 0,1%, Lait en poudre écrémé 5%) pour une nuit à 4°C sous agitation constante.

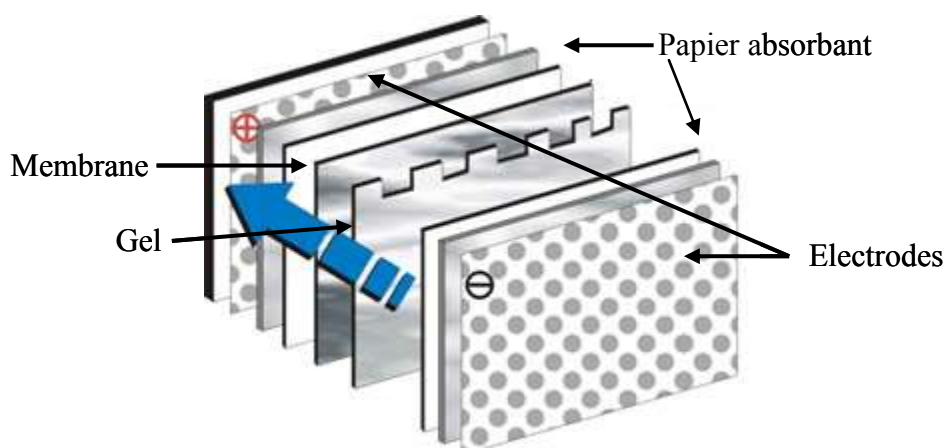


Figure 48 : Représentation schématique du transfert de protéine sur membrane de nitrocellulose.

Fixation des anticorps : Le lendemain, la membrane subit trois lavages dans le tampon de lavage (PBS, Tween 20 0,1%) avant d'être mise en présence de l'anticorps dilué au 200^{ème} dans le tampon anticorps (Tris

Chapitre III : Approche méthodologique

25mM, NaCl 125 mM, Tween 20 0,02%, Lait en poudre écrémé 2%, pH 8), le tout est incubé à 37°C sous agitation pour une heure.

La membrane est ensuite lavée à nouveau 3 fois, pour éliminer les anticorps non fixés à leur protéine cible. Elle est alors incubée, dans les mêmes conditions que précédemment, avec l'anticorps secondaire, spécifique de l'anticorps primaire, dilué au 2000^{ème}. Cet anticorps secondaire est couplé à une peroxydase (anti-Mouse IgG (H+L)-Peroxydase, et anti-Rabbit IgG (H+L)-Peroxydase, Uptima®) capable de dégrader un substrat chimioluminescent qui sera révélé par autoradiographie.

Révélation par chimioluminescence : La membrane est mise en présence du réactif UptiLight HRP blot™ substrate (Uptima®) préparé selon le protocole du fabricant à l'obscurité. Après une minute d'incubation, un film photo (Hyperfilm™-ECL™, Amersham Biosciences®) est placé sur la membrane pendant une à deux minutes. Le film est enfin révélé classiquement avec un révélateur photo puis un fixateur.

V. ETUDE *IN VIVO*

Les tests *in vivo* représentent la dernière étape de l'étude d'une molécule avant la validation au niveau clinique. L'objectif est donc alors de passer à un test dans des conditions se rapprochant au mieux de la réalité de la maladie. Pour cela, il faudra donc induire la maladie, par xénogreffe dans le cas du cancer, chez un organisme vivant, afin de se rapprocher des conditions physiologiques humaines. Ceci permettra donc d'étudier, la toxicité de la molécule, sa biodisponibilité, sa dégradation dans l'organisme et son réel potentiel thérapeutique.

Le modèle animal utilisé : Les études ont été réalisées sur des souris nudes NMRI nu/nu non consanguines femelles (NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}TM, Janvier®), âgées de 6 semaines. Elles sont élevées dans des modules à air filtré en surpression à 22°C. Le matériel : cages, litières, biberons est stérilisé à l'autoclave.

Evaluation de la toxicité de la molécule : L'objectif est ici d'observer la réaction de souris saines à une ou plusieurs injections de la molécule à différentes doses. Les injections, à des doses supérieures ou égales au traitement, sont suivies d'une observation de l'effet sur les souris pendant 2 semaines avec des pesées journalières.

Xénogreffe de tumeur humaine : 10⁶ cellules (NSCLC-N6) sont injectées en sous-cutané sur le flanc de 3 à 4 souris (Figure 49). Après

Chapitre III : Approche méthodologique

2 à 3 semaines, la tumeur mesurant environ 0.5 cm^3 est prélevée, les cellules sont dissociées, puis transplantées de la même manière au flanc de l'ensemble des souris utilisées pour l'expérimentation. De nouvelles tumeurs apparaissent, les souris sont alors réparties de manière homogène en différents lots : un lot témoin et trois lots traités.



Figure 49 : Xénogreffe sous cutané de tumeur humaine chez une souris nude.

Mesure des tumeurs : Les tumeurs sont mesurées au pied à coulisse sur deux dimensions : la largeur l et la longueur L . Le volume tumoral V_t (en mm^3) est calculé d'après la formule : $V_t = L * l^2 / 2$.

Les volumes tumoraux au jour J_X (V_{tJ_X}) sont calculés pour chaque lot. La croissance tumorale est évaluée en rapportant V_{tJ_X} à V_{tJ_0} (volume

Chapitre III : Approche méthodologique

tumoral moyen de chaque lot le jour du début du traitement). Les courbes : $V_{tJ_X} / V_{tJ_0} = f(\text{temps})$ sont tracées d'après ces valeurs.

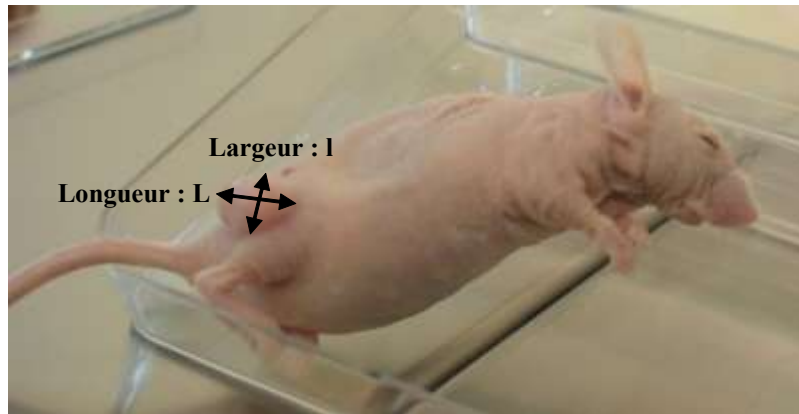


Figure 50 : Mesure du volume tumoral. Chaque mesure est réalisée par le même manipulateur à l'aide d'un pied à coulisse électronique.

Résultats
expérimentaux

VI. TESTS DE CYTOTOXICITE (CI₅₀) SUR LIGNEES CELLULAIRE

La recherche de nouvelles molécules originales à activité antiproliférative, passe tout d'abord par des tests simples de cytotoxicité, en condition *in vitro*, sur des modèles cellulaires de la pathologie étudiée.

VI.1 SCREENING DES EXTRAITS MICROALGAUX

Le travail concernant le screening d'extraits microalgaux a commencé par des tests simples de cytotoxicité sur les deux lignées cellulaires de cancer bronchopulmonaire. Les conséquences de la présence d'un extrait sont évaluées par le calcul de la concentration capable d'inhiber 50% de la croissance cellulaire (CI₅₀). Cette première étude nous permet de sélectionner les espèces et les extraits présentant un intérêt, pour les soumettre aux futures étapes d'identification de molécules originales. Les résultats pour chaque extrait sont présentés ci-après : Tableau 12.

Tableau 12 : Résultats des tests des différents extraits microalgaux sur les deux lignées cellulaires. Le tableau récapitule les différentes CI₅₀ (en µg/ml) évaluées pour les extraits éthanol, dichlorométhane et aqueux de chaque espèce de microalgue (les extraits ne présentant pas d'activité sont identifiés par un tiret). Chaque test a été répété 2 à 5 fois.

Genres	Espèces	Lignées cellulaires					
		A549			NSCLC-N6		
		EtOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	EtOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
Diatomophyceae	<i>O. aurita</i>	-	-	20,6± 0,5	55,8± 3,7	36,9± 1,5	42,6± 5,8
	<i>C. c. f. pumilum</i>	-	41,5± 3,4	61,1± 8,6	-	13,5± 2,4	-
	<i>P. purpureum</i>	-	-	13,9± 0,4	-	-	6,3± 0,5
Rhodophyceae	<i>R. violacea</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>G. sulphuraria</i>	-	37,3± 2,5	9,1± 1,3	-	18,7± 2,5	4,8± 0,5
Chlorophyceae	<i>C. reinhardtii</i>	-	-	16± 2,2	-	36,6± 0,6	24,6± 2

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Ces résultats particulièrement révélateurs du potentiel des microalgues, nous montrent que près de la moitié des extraits présentent une activité inhibitrice de la croissance. On retrouve 53% d'extraits actifs sur NSCLC-N6 et 30% sur A549. De plus, on remarque que la grande majorité des extraits actifs ont une CI_{50} inférieur à 40µg/ml. Ce sont les espèces *O. aurita*, *C. calcitrans* forma *pumilum*, *I. affinis galbana* et *G. sulphuraria* qui semblent au vu de ces tests les plus importantes productrices de molécules bioactives. En effet, pour ces quatre espèces, appartenant à trois classes différentes, plus de 70% des tests réalisés ont montré une inhibition de la croissance cellulaire. C'est donc à partir de là, que nous avons sélectionné deux extraits en vue d'une purification puis d'une identification des principes actifs. Nous avons choisi les extraits apolaires des espèces : *Odontella aurita* et *Galdieria sulphuraria*, pour les soumettre aux différentes étapes de chimie analytique. Ce choix a été réalisé du fait que, ces deux espèces : appartiennent à deux genres phylogénétiquement éloignés, vivent dans des milieux très différents, et peuvent être facilement produites en laboratoire.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Malgré ce premier choix indispensable, il paraît clair que les différents extraits de chaque espèce devront être soumis à une étude chimique approfondie, afin de trouver l'origine des très bons résultats d'activité mise en évidence ici. Il ne semble donc aujourd'hui pas évident de présélectionner une ou plusieurs familles d'algues, puisque l'on voit ici que malgré la grande diversité phylogénétique des espèces, chacune d'entre elles peut présenter un intérêt pharmacologique.

VI.1.1 Extraction, purification et biosuivi

VI.1.1.1. Extrait apolaire d'*Odontella aurita*

L'extrait brut sélectionné pour une première étude de chimie analytique est : l'extrait dichlorométhane d'*O. aurita*. Ce choix s'est appuyé sur plusieurs arguments :

La reproductibilité des résultats des tests CI_{50} (Tableau 12),

Les observations microscopiques de l'activité, qui montrent que le principe actif ne semble pas être toxique, puisque pour la plus part l'intégrité des cellules est conservée.

Et enfin la facilité d'accès à une quantité importante de biomasse pour permettre une purification et une identification de la molécule d'intérêt.

VI.1.1.1.1. *Chromatographie sur colonne*

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

A partir de cet extrait brut, un fractionnement en fonction de la polarité des composants permet de commencer à éliminer bon nombre de molécules non liées à l'activité.

Tableau 13 : Résultats de la première étape de purification de l'extrait dichlorométhane d'*O. aurita* (Tableau 12). Le tableau détail les solvants d'élution, la couleur et l'activité cytotoxique sur NSCLC-N6 des différentes fractions obtenues par chromatographie sur colonne.

Fractions	Couleur	CH ₂ Cl ₂ (%)	EtOAc (%)	EtOH (%)	CI ₅₀ (µg/ml)
F1	Vert/bleu	100	0	0	-
F2	Jaune orangé	100	0	0	9,1±0,2
F3	Rouge	70	30	0	8,5±0,5
F4	Jaune	50	50	0	29±1,3
F5	Vert	0	0	100	-

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane ; EtOAc : Acétone ; EtOH : Ethanol

On voit que cette méthode nous permet de rapidement écarter une partie de l'extrait totale ne contenant apparemment pas de molécule active. En effet, les fractions F1 et F5 ne seront pas intégrés dans la poursuite de la purification du faite de leur inactivité lors du test CI₅₀. Cette première semi-purification a permis de commencer l'isolation d'un ou plusieurs principes actifs, ce qui a logiquement engendré une chute de la CI₅₀, donc une augmentation de l'activité. La CI₅₀ pour la lignée NSCLC-N6 passe de 30µg/ml pour l'extrait brut (Tableau 12) à moins de 10µg/ml pour les fractions F2 et F3. On remarque ici que l'activité est répartie sur les trois fractions centrales, on peut penser à ce stade que plusieurs molécules sont en cause, ou bien que la

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

molécule d'intérêt a une polarité moyenne qui implique une répartition assez large du fait de la faible sensibilité de la méthode.

La Figure 51 nous montre, elle : la forte proportion de composés ne présentant ici pas d'intérêt pharmacologique. En effet, on voit que les fractions inactives F1 et F5 représentent plus de la moitié de l'extrait brut.

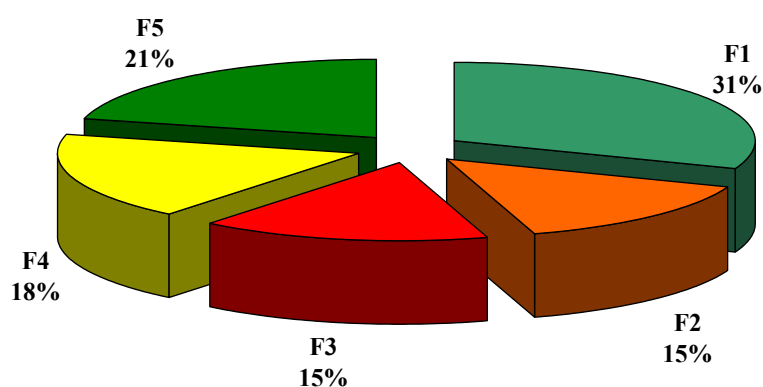


Figure 51 : Proportion des différentes fractions obtenues.

Cette démarche associant la chimie analytique et les tests pharmacologiques, nous permet ainsi de rapidement éliminer une grande partie de la production biochimique des microalgues, pour se concentrer sur fractions contenant les principes actifs.

VI.1.1.1.2. Chromatographie sous vide

A ce stade les fractions isolées contiennent encore un grand nombre de composés différents dont la plupart ne nous intéressent pas. C'est

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

pourquoi la purification se poursuit à l'aide de techniques toujours plus fines. La fraction F3, présentant ici l'activité la plus intéressante (Tableau 13), a donc été soumise à un nouveau fractionnement, réalisé cette fois par chromatographie sous vide. Cette nouvelle étape a permis de différencier 15 fractions (Tableau 14), contenant de moins en moins de molécules, et allant même jusqu'à des produits purs (Figure 52). La totalité de ces nouveaux isolats ont directement été soumise à de nouveaux tests de cytotoxicité sur la lignée NSCLC-N6, pour permettre de poursuivre l'identification du ou des principes actifs.

Tableau 14 : Détail du fractionnement de la fraction active F3 (Tableau 13) par chromatographie sous vide (). 15 fractions ont été obtenues et seulement deux présentent une activité sur NSCLC-N6.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Fractions	Chex (%)	EtOAc (%)	MeOH (%)	CI ₅₀ (µg/ml)
F3a	100	0	0	-
F3b	95	5	0	-
F3c	90	10	0	-
F3d	85	15	0	-
F3e	75	25	0	-
F3f	65	35	0	-
F3g	60	40	0	-
F3h	55	45	0	-
F3i	50	50	0	-
F3j	45	55	0	7±0,3
F3k	40	60	0	8,4±0,8
F3l	20	80	0	-
F3m	0	100	0	-
F3n	0	0	100	-
F3o	0	0	100	-

Chex : Cyclohexane ; EtOAc : Acétone ; MeOH : Méthanol

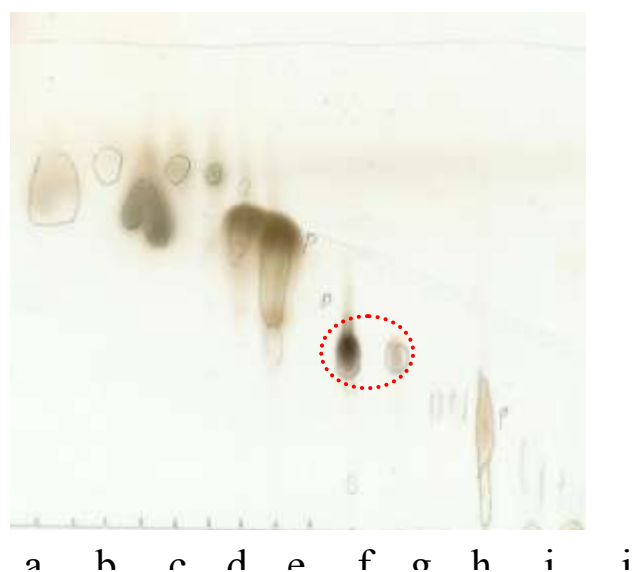


Figure 52 : Chromatographie en couche mince des 15 fractions de chromatographie sous vide, détaillées ci dessus (Tableau 14). Les fractions actives sont F3j et k (entourées en rouge).

Ce nouveau fractionnement met en évidence deux fractions actives (F3j et k) qui présentent une tache au même niveau sur la

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

chromatographie en couche mince (Figure 52). On peut remarquer que les nouvelles CI_{50} sont légèrement inférieures aux précédentes, passant de 8,5 (F3) à 7 $\mu\text{g/ml}$ (F3j). Ceci reste dans la logique de purification. En effet, l'extrait de plus en plus pure contient proportionnellement toujours plus de molécules actives.

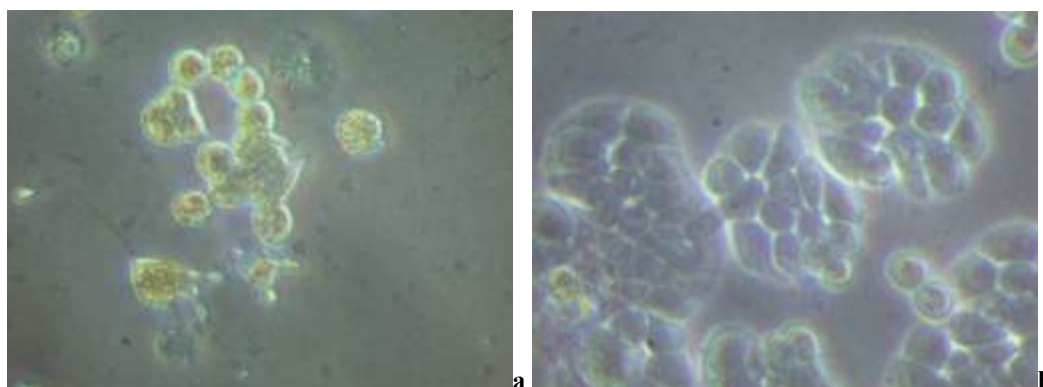


Figure 53 : Observation microscopique du traitement des cellules NSCLC-N6 par F3j à 10 $\mu\text{g/ml}$ (a : cellules traitées, b : cellules témoins en croissance ; x100).

Les observations microscopiques confirment les activités évaluées par les tests CI_{50} (Figure 53). La présence de l'extrait dans les cellules est facilement observable, donnant une teinte orangée aux cellules. On remarque que l'organisation en rosace typique des cellules NSCLC-N6 en croissance, est totalement perdue lors du traitement. La forme naturelle de la cellule est malgré tout généralement gardée après 72h de traitement, et dans le même temps la division est stoppée. Le composé n'apparaît donc pas être toxique à cette dose *in vitro*.

VI.1.1.2. L'extrait apolaire de *Galdieria sulphuraria*

Pour cette espèce nous avons voulu étudier l'influence de l'état physiologique de l'algue sur la production de molécules bioactives. Cette décision a été prise en raison de la variabilité des résultats des tests de cytotoxicité réalisés avec des extraits issue de différentes cultures d'algues. Pour cela, les extraits étudiés ont été réalisés sur deux types de cultures : une culture continue (en photobioréacteur LAMP, cf. III.2.1.3.1) et une culture en batch laissée pendant 90 jours après l'atteinte de la phase plateau sans apport de nutriment.

Chromatographie sur colonne

VI.1.1.2.1. Chromatographie sur colonne

Les extractions apolaires réalisées sur les lyophilisats des deux cultures de *G. sulphuraria* ont été directement soumises à un test de cytotoxicité sur NSCLC-N6. On remarque alors une nette différence d'activité entre les deux avec : une CI_{50} de 47,6 μ g/ml pour la culture batch et une $CI_{50} > 90\mu$ g/ml pour la culture continue. Ces premières observations semblent déjà montrer une influence des conditions de culture sur la production de molécules actives. Ces fractions sont donc soumises aux premières étapes de purification par chromatographie sur colonne afin de comparer les productions de principes actifs entre les deux états physiologiques. Les comparaisons sont réalisées d'un point de vue qualitatif (Tableau 15) et quantitatif (Figure 54).

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Tableau 15 : Détail du fractionnement des l'extraits de *Galdieria sulphuraria* cultivée en batch ou en continue et résultats des tests de cytotoxicité réalisés sur la lignée cellulaire NSCLC-N6.

Fraction	Couleur	CH ₂ Cl ₂ (%)	EtOAc (%)	EtOH (%)	CI ₅₀ (µg/ml)	
					Batch	Continue
F1	Orange	100	0	0	-	-
F2	Gris/vert	50	50	0	16,2 ±3,3	80,9 ±17,8
F3	Jaune	50	50	0	39,7 ±0,3	43,8 ±9
F4	Vert	0	0	100	-	-

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane ; EtOAc : Acétone ; EtOH : Ethanol

Ce tableau décrit le fractionnement réalisé sur l'extrait brut dichlorométhanique. Celui-ci a pu être réalisé de manière quasi-identique pour les deux cultures. En effet, pour chacune d'elle les mêmes solvants ont été utilisés et les mêmes couleurs d'extrait ont été obtenues. En revanche, c'est au niveau des activités sur lignée cellulaire que les différences apparaissent. On a donc pour chacune « des algues » deux fractions actives (F2 et F3) avec des différences d'activité plus ou moins importantes. Pour la culture batch (discontinue), correspondant aux cellules en phase plateau, la F2 est beaucoup plus active que la F3 et passe sous la barre des 20µg/ml. Pour la culture continue au contraire l'activité de la F2 est bien inférieure à celle de la F3. Lorsque l'on compare les fractions une à une entre les deux types de culture, l'activité de la F2 est supérieure pour la culture batch, alors que pour la F3 les activités sont assez proches entre les deux cultures. Ces résultats nous laissent donc

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

penser, que plusieurs principes actifs pourraient être en cause dans ces activités et que la régulation de leur production dans la cellule ne serait pas la même.

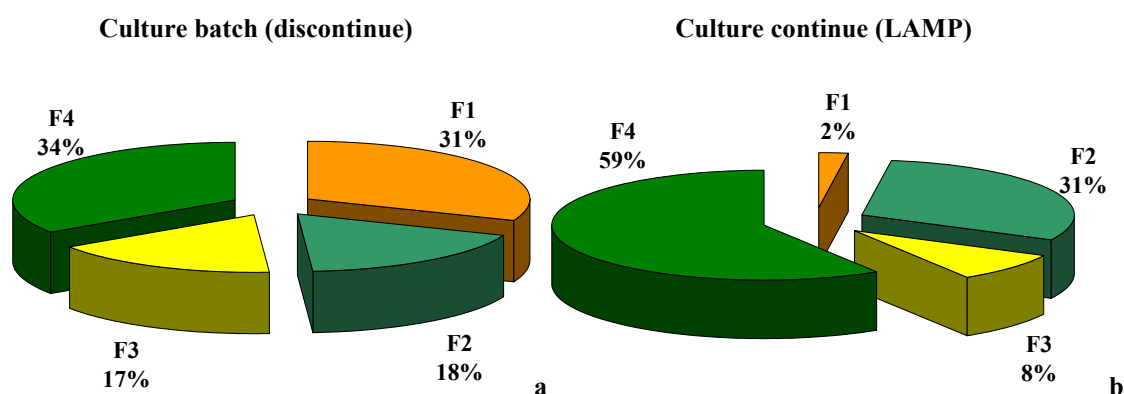


Figure 54 : Proportion de chaque fraction isolée, pour les deux types de cultures (a : culture batch, b : culture continue).

L'étude de la proportion de chaque fraction (Figure 54), nous apporte de nouvelles preuves de la différence du contenu biochimique des deux types de cultures. On remarque en effet que, malgré un rapport de quantité de fraction inactive/active (60/40) assez semblable entre les deux types cultures, la quantité relative de chaque fraction diffère énormément entre les deux extraits. En effet, pour la culture batch les fractions actives sont en proportion équivalentes, alors que pour la culture continue il y a un rapport 3 entre ces deux mêmes fractions.

VI.1.1.2.2. Chromatographie liquide à haute pression

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Suite aux résultats des tests réalisés, la fraction 2 issues de la culture batch a été purifiée par chromatographie liquide à haute prestation (HPLC). Celle-ci a été réalisé sur une colonne phenomenex LUNA SI 605 μ avec flux 0,7 ml/min, avec comme éluant un mélange hexane : acétate de éthyle (6 : 4) 6 nouvelles fractions ont alors été obtenues :

Tableau 16 : Détail du fractionnement par HPLC de la fraction F2 issue de l'extrait de *Galdieria sulphuraria* cultivée en batch et résultats des tests de cytotoxicité réalisés sur les lignées cellulaires NSCLC-N6 et A549.

Fraction	Masse (mg)	CI ₅₀ (μ g/ml)	
		NSCLC-N6	A549
Gs batch F2a	1,9	10,8 $\pm$ 0,3	19 $\pm$ 2
Gs batch F2b	1,3	26,8 $\pm$ 3,8	35,8 $\pm$ 2,4
Gs batch F2c	1,2	54,1 $\pm$ 0,1	45,9 $\pm$ 4,6
Gs batch F2d	2,2	-	-
Gs batch F2f	2,9	-	-
Gs batch F2g	2,4	-	-

On voit ici que 3 fractions présentent une activité sur les deux lignées. Une chromatographie (non présentée ici) en couche mince a révélé que la fraction F2b était composée d'un mélange de F2a et F2c, et que ces deux dernières sont des molécules pures. Les résultats des tests sont donc logiques, l'activité de F2b se situant exactement entre celle des deux composés purs.

VI.1.2 Identification des principes actifs

VI.1.2.1. Le composé bioactif d'*Odontella aurita*

Les fractions actives issues de la chromatographie sous vide ont été soumises à une étude par RMN/spectrométrie de masse, réalisé par l'équipe du Pr. V. Roussis du Laboratoire de Pharmacognosie de la Faculté de Pharmacie d'Athènes. Cette nouvelle analyse chimique a montré que la fraction F3j contient un produit pur dont la structure a été déterminée en réalisant :

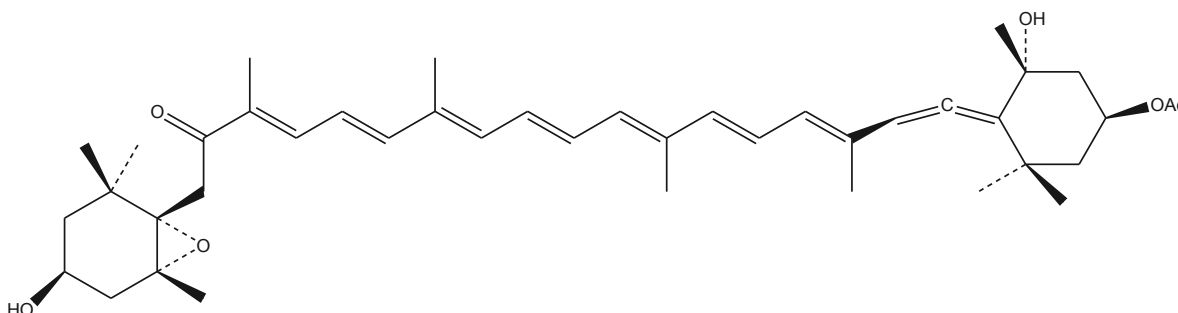
Un spectre 1H NMR 400MHz, spectre du proton.

Un spectre 2D COSY 400MHz: spectre 2D du proton.

Un spectre HMQC 400MHz : spectre 2D carbone-proton.

Un spectre de masse.

Les différents spectres obtenus ne seront pas présentés ici. La molécule identifiée est la fucoxanthine (Figure 55), qui est un caroténoïde xanthophylle (caroténoïde comportant au moins un oxygène) typique chez les diatomées, les haptophycées (Berger *et al.*, 1977) et les algues brunes.



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 55 : Structure chimique de la fucoxanthine ($C_{42}H_{58}O_6$, PM : 658,92).

VI.1.2.2. Les composés actifs de *Galdieria sulphuraria*

Le même type de travail que pour la fucoxanthine a été effectué ici par l'équipe du professeur E. Fattorusso. Les trois fractions actives ont été à une analyse chimique par RMN/spectrométrie de masse. Les différents spectres obtenus ne seront pas présentés ici. Ainsi deux molécules pures ont été identifiées.

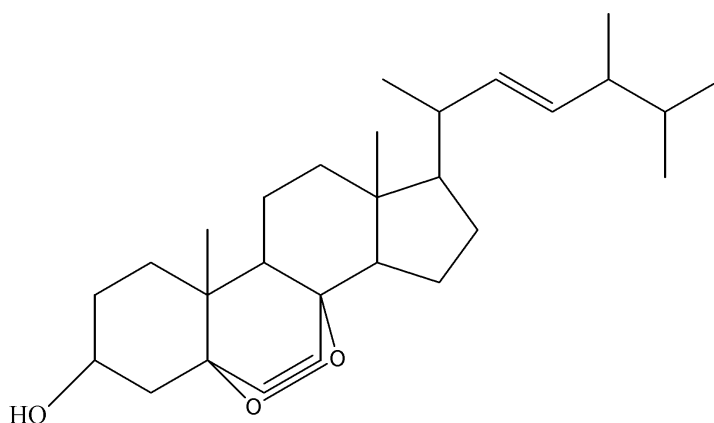
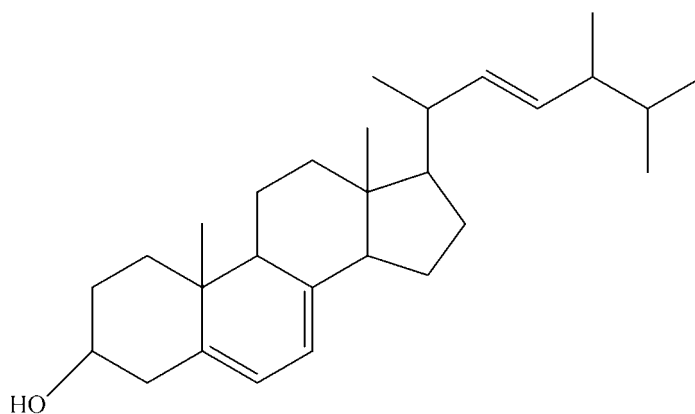


Figure 56 : Structure chimique de la molécule Gs batch F2a (Tableau 16). Cette molécule est un stéroïde nommé peroxyergostérol ($C_{29}H_{47}O_3$, P.M. 443,35).



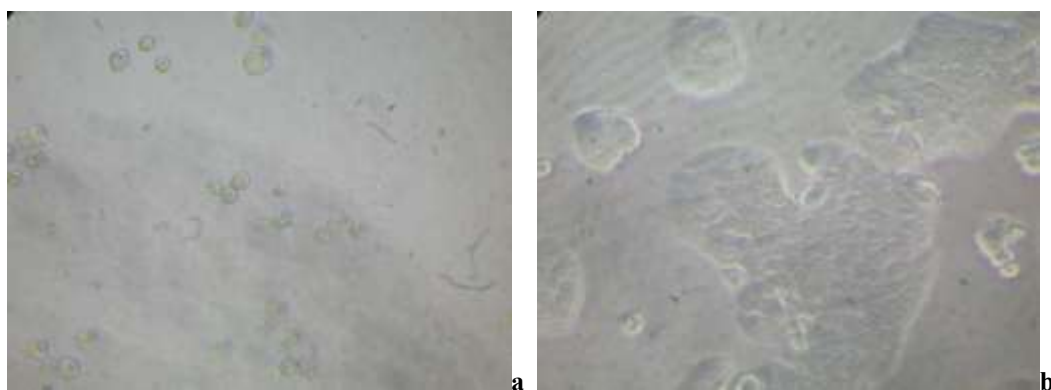
Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 57 : Structure chimique de la molécule Gs batch F2c (Tableau 16). Cette molécule est un stéroïde nommé ergostérole ($C_{29}H_{47}O_1$, P.M. 411,36).

Ces deux molécules sont connues et leur production a été décrite chez différents organismes vivants. Ces molécules ont fait l'objet de différentes études pharmacologiques notamment en cancérologie (Kimura, 2005).

VI.2 A190 UNE NOUVELLE MOLECULE INNOVANTE

La sélection de la molécule A190 a été réalisée suite au screening d'une famille de plus de 200 triazines de synthèse lors de travaux précédent. Cette molécule présente une activité intéressante sur les lignées de cancer bronchopulmonaire NSCLC-N6 et A549 avec des CI_{50} respectivement de : $39,4\mu M$ et $52,6\mu M$. Les observations microscopiques, de la morphologie des cellules au cours d'un traitement, ont permis de favoriser la sélection de cette molécule du fait de sa non toxicité apparente *in vitro* (Figure 58).



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 58 : Observation microscopique du traitement des cellules NSCLC-N6 par A190 à 39,4 μ M pendant 72h (a : cellules traitées, b : cellule témoin en croissance ; x40).

Les observations microscopiques montrent une absence quasi-totale de prolifération des cellules après 72h. Les cellules gardent malgré tout pour la plupart une forme normale, les membranes ne sont pas déstructurées le contenu cellulaire semble rester intact.

VII. ETUDE DES CINETIQUES DE CROISSANCE

VII.1 CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE LA FUCOXANTHINE

L'identification de la molécule active nous permet alors d'envisager la caractérisation de son activité au niveau cellulaire. Pour cela de nouveaux tests sur les lignées cellulaires sont engagés. La poursuite de l'étude consiste donc à réaliser des cinétiques de croissance (Figure 59, Figure 60) suivie d'une étude de l'apoptose.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

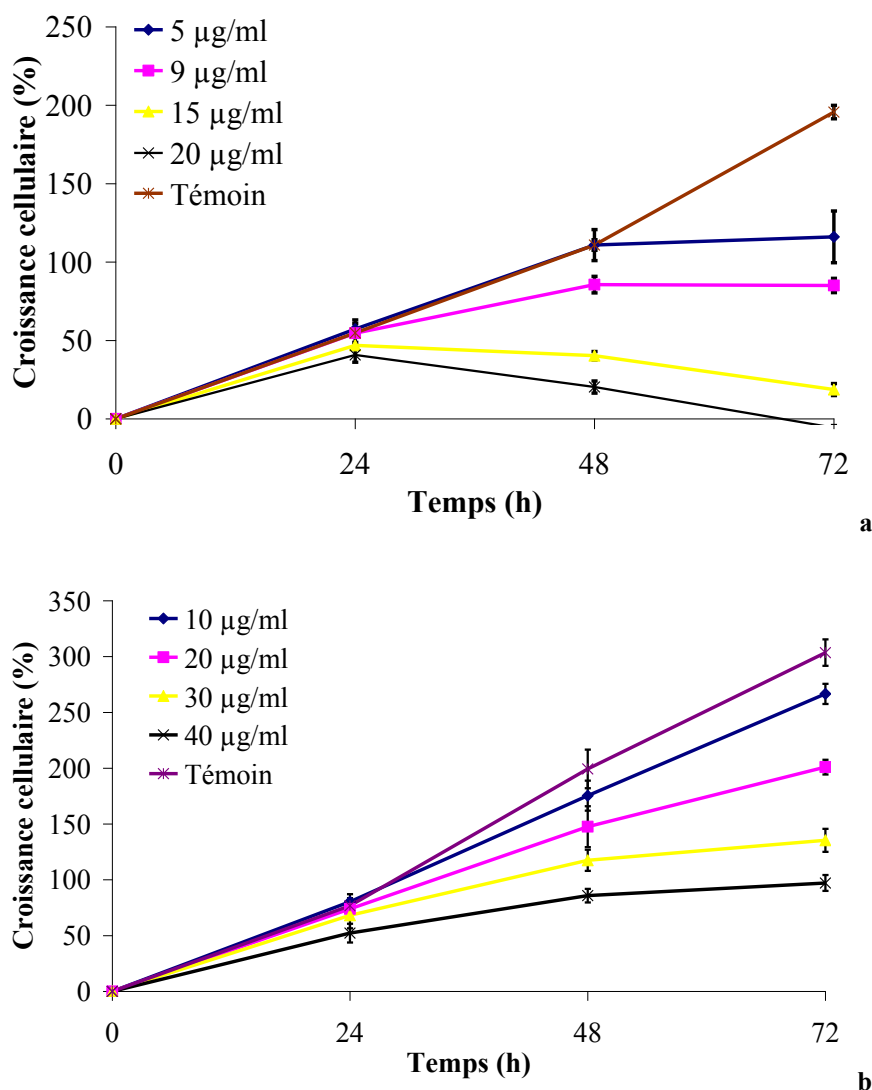


Figure 59 : Cinétiques de croissance continues avec traitement par la fucoxanthine, réalisées sur les deux lignées cellulaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b).

Les résultats des cinétiques continues (Figure 59) montrent un ralentissement dès 24h, suivi d'un arrêt complet de la croissance pour les deux lignées cellulaires, lors d'un traitement par la fucoxanthine, avec un effet dose bien marqué. En effet, on remarque une séparation nette des courbes de croissance entre les cellules traitées et les cellules

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

témoins. Pour NSCLC-N6, cette inhibition de croissance poursuivie d'un plateau est observable lors d'un traitement à 9 μ g/ml. Pour A549, le même phénomène est observé à partir de 30 μ g/ml. Les profils résultant d'un traitement à dose raisonnable présentent une allure typique de l'activité de type cytostatique, induisant un blocage des cellules en G1. On voit clairement ici le fléchissement de la courbe de croissance dans les premières heures de traitement, avant qu'elle ne décrive une ligne plane indiquant un arrêt total de la croissance cellulaire. Ce profil, montre que les cellules ne sont pas totalement détruites, comme lors de l'activité d'un produit toxique, au contraire le traitement implique ici progressivement un arrêt de croissance en induisant une sortie des cellules du cycle normal.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

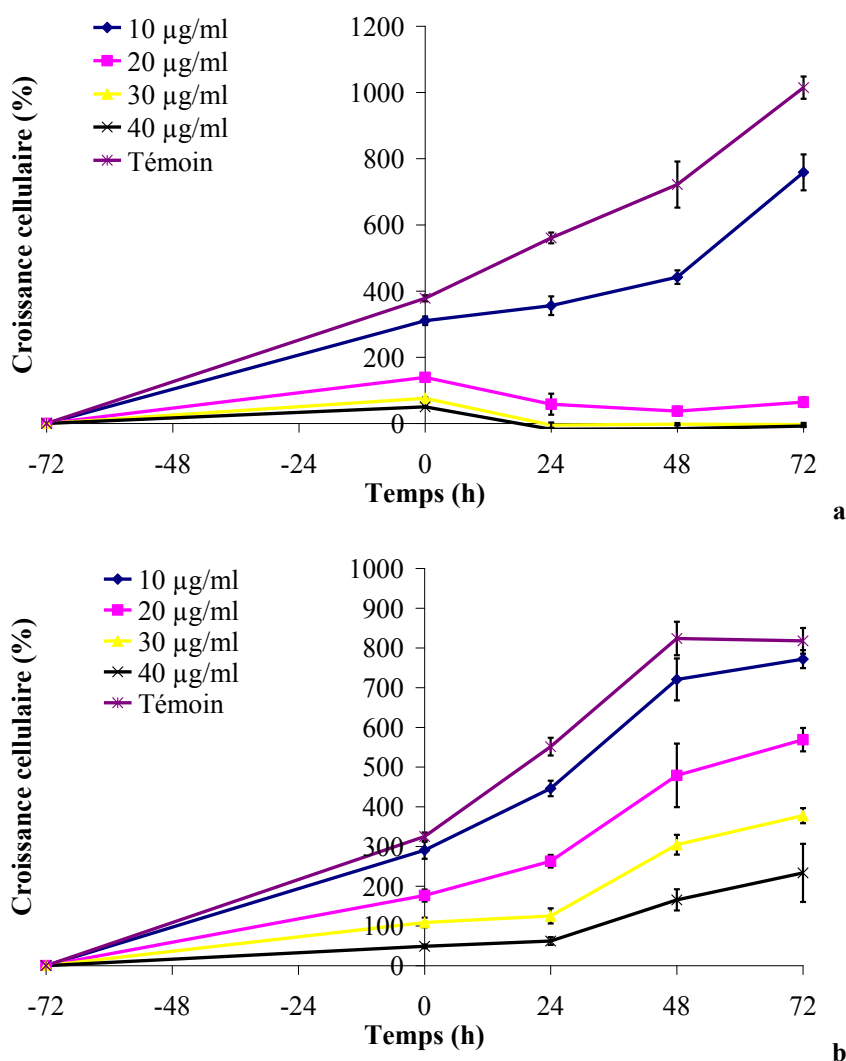


Figure 60 : Cinétiques de croissance discontinues avec traitement par la fucoxanthine, réalisées sur les deux lignées cellulaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b).

Les résultats des cinétiques discontinues confirment parfaitement les précédents. En effet, on voit qu'après arrêt du traitement au bout de 72h, on a peu ou pas de reprise de croissance pour les doses supérieures à la CI_{50} . En effet, les cellules NSCLC-N6 ne montrent aucune reprise de croissance pour un traitement supérieur ou égale à 20µg/ml. En revanche, les cellules A549 semble reprendre une

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

croissance qui reste plus lente que celle du témoin 24h après l'arrêt du traitement.

VII.2 CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DU PEROXYERGOSTEROLE

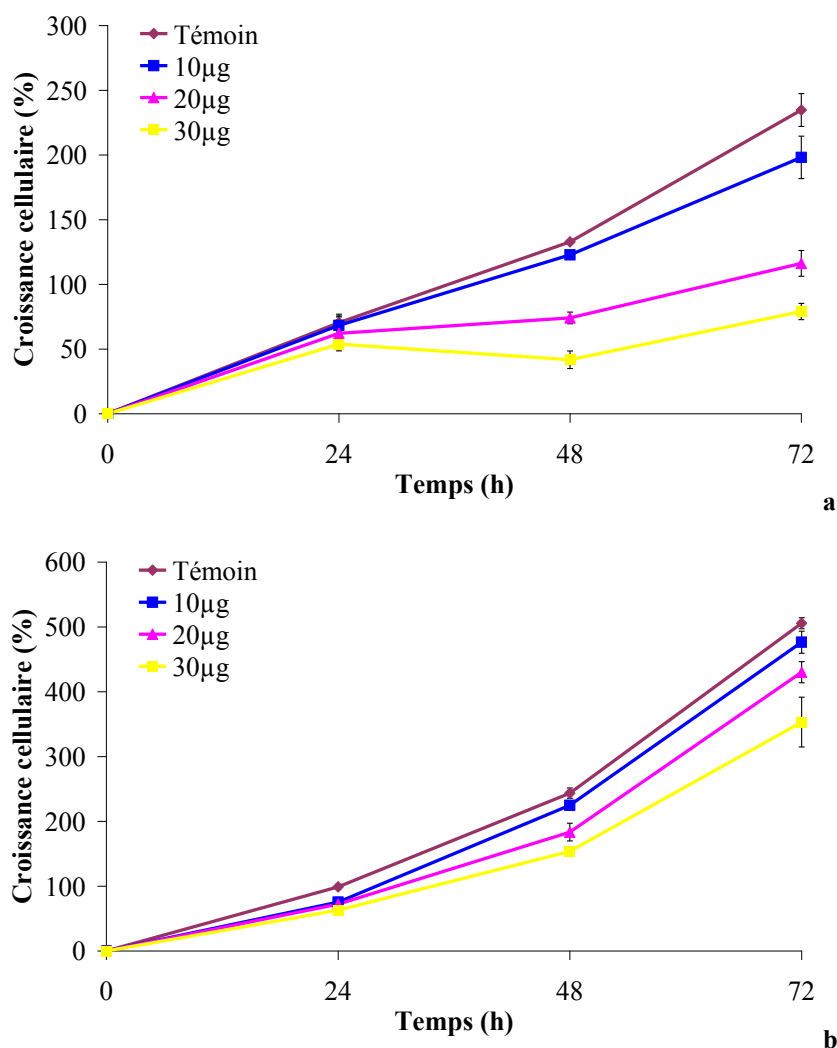


Figure 61 : Cinétiques de croissance continues avec traitement par le peroxyergostérol, réalisées sur les deux lignées cellulaires : NSCLC-N6 (a), A549 (b).

La molécule Gs90 1 la plus active des deux molécules issues de la culture batch de *Galdieria sulphuraria* a été soumise à un test de

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

cinétique. On voit qu'elle est responsable d'un ralentissement de la croissance de manière dose dépendante chez NSCLC-N6. Cet effet est moins visible chez A549, les doses ne semblant pas assez fortes. Nous n'avons pu réaliser plus de tests à partir de ces molécules du fait de la faible quantité de produit disponible pour l'instant. En effet, il n'a été possible d'extraire qu'1 à 2 mg de molécules à partir de 25g de lyophilisat d'algue. On voit donc ici tout l'intérêt de pouvoir disposer d'une biomasse importante afin d'isoler une quantité suffisante de principes actifs utilisable lors des différents tests pharmacologiques.

VII.3 CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DE A190

La réalisation des cinétiques de croissance nous permet ici encore de commencer à approfondir la compréhension du mécanisme d'action de la molécule. Les profils révèlent une cinétique d'activité qui rend compte de la réaction cellulaire face à la présence du principe actif. Pour cette étude nous avons comparé la réaction de cellules synchrones (Figure 64) et asynchrones (Figure 62).

VII.3.1 Cinétique sur cellules non synchronisées

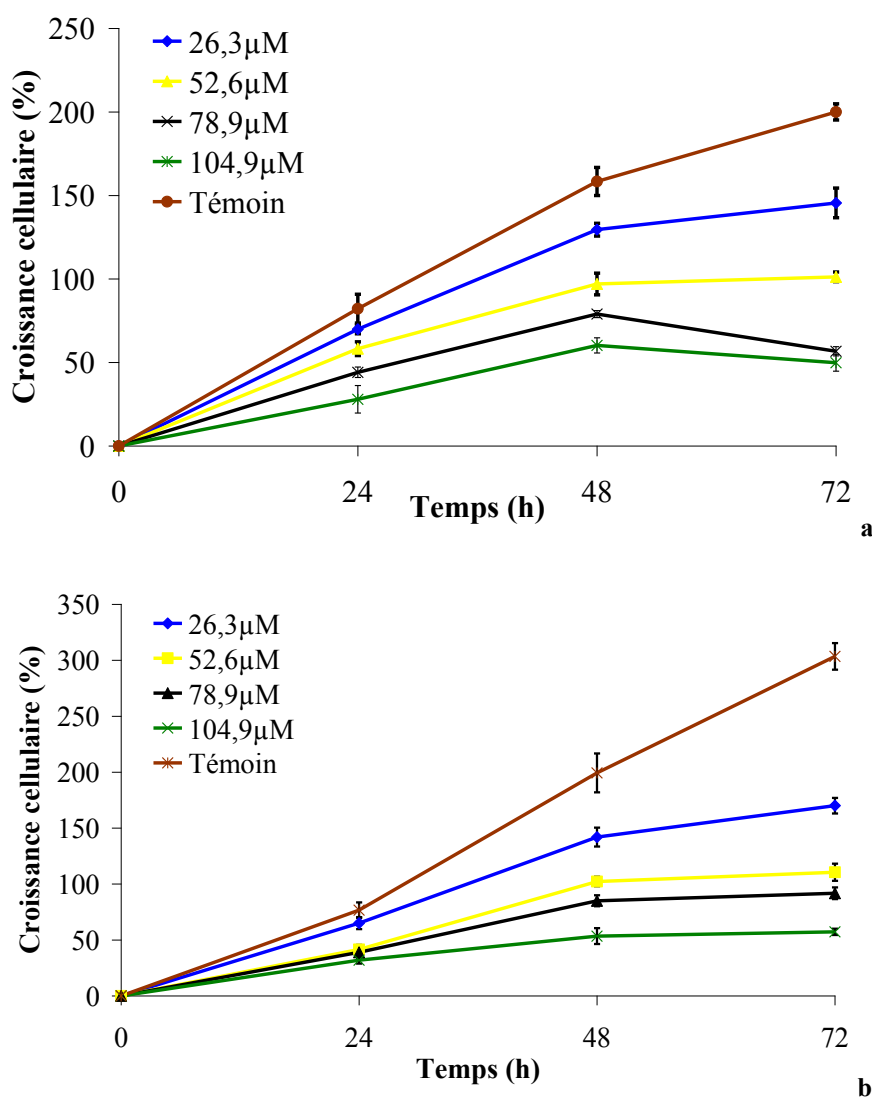


Figure 62 : Cinétiques de croissance continues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b).

Les résultats des cinétiques de croissance de cellules traitées par A190 montrent un réel ralentissement de la croissance cellulaire par rapport au témoin dès 24h de traitement. On observe de plus l'atteinte d'un

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

plateau à partir de 48h, ce qui représente le profil typique d'une activité de type cytostatique. On remarque aussi un effet dose très net pour les deux lignées.

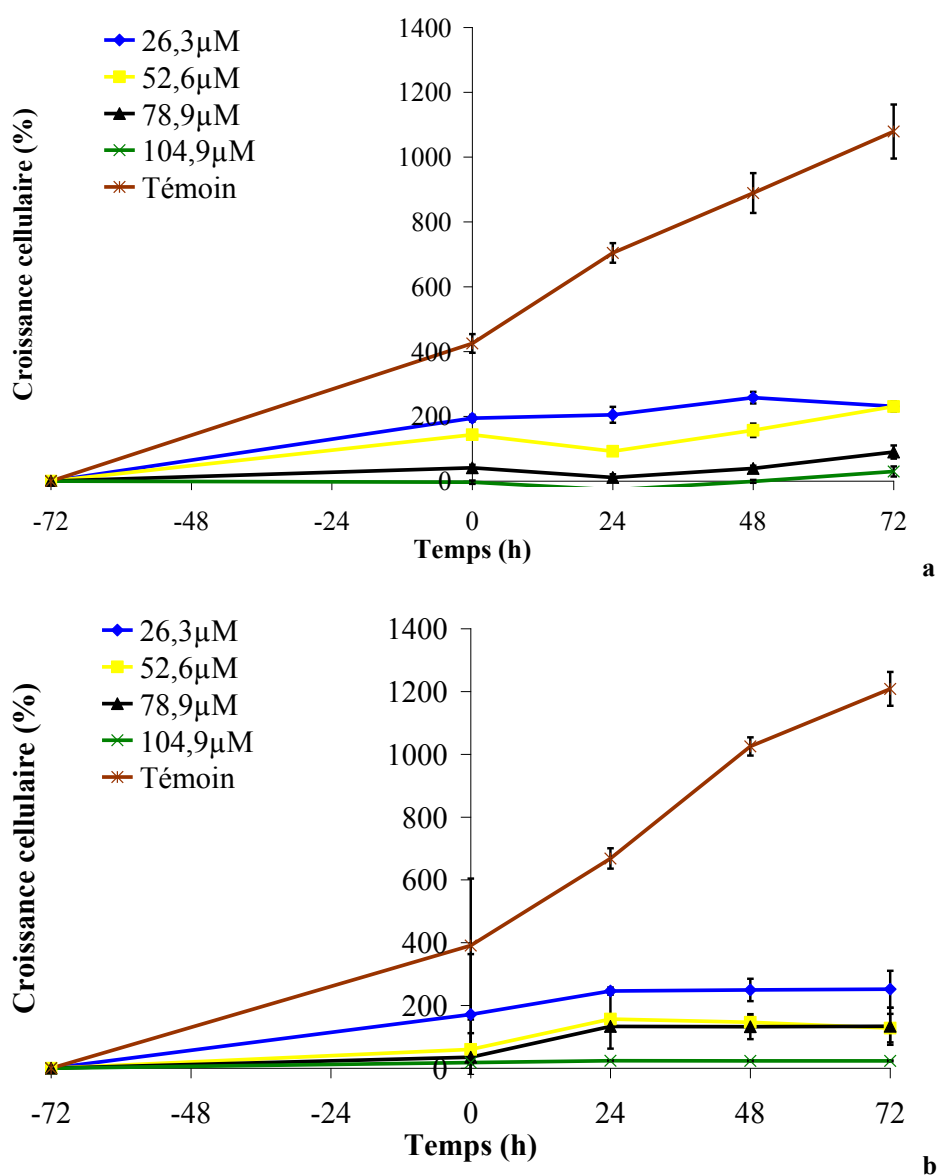


Figure 63 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b)

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Les cinétiques de croissance discontinues montrent très clairement que la molécule A190 est responsable d'une activité irréversible. En effet, on voit ici que les cellules ne reprennent aucune croissance après arrêt du traitement. Pour autant, on observe pas de mortalité cellulaire importante ce qui confirme le diagnostique réalisé à la suite des cinétiques continues, à savoir qu'on sans aucun doute un blocage de type cytostatique des cellules.

VII.3.2 Cinétique sur cellules synchronisées

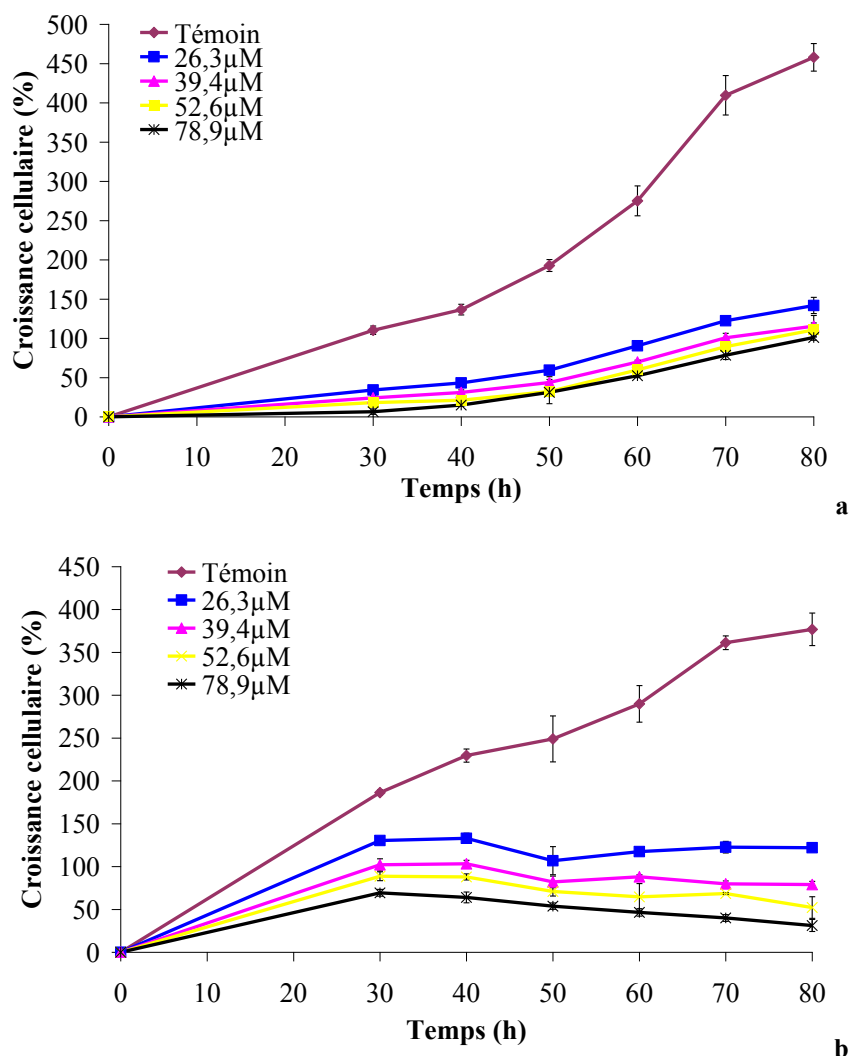
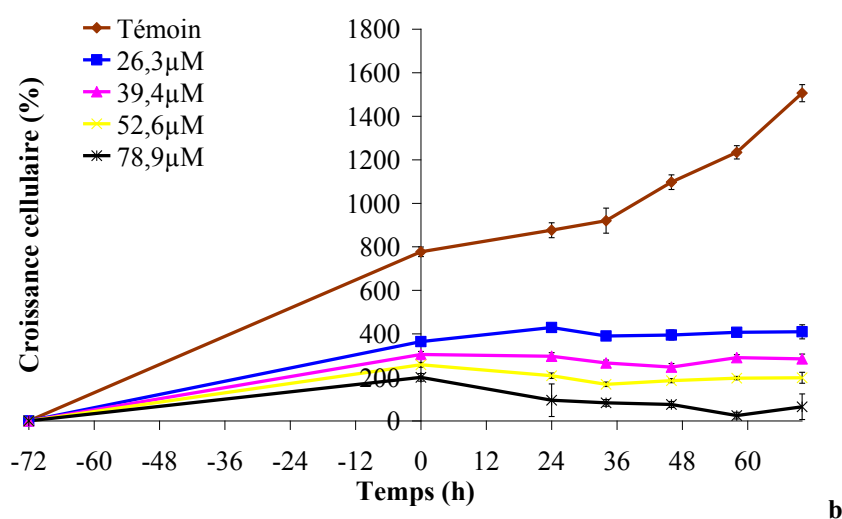
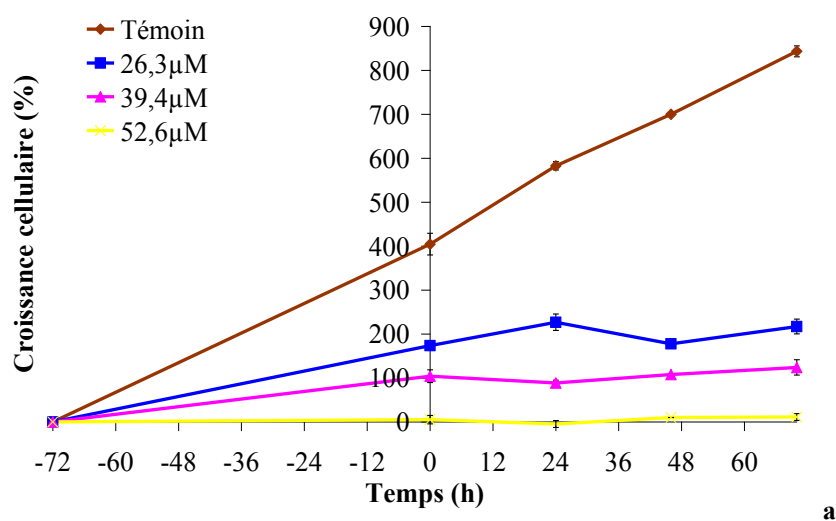


Figure 64 : Cinétiques de croissance continues sur cellules synchronisées traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b)

Les courbes de cinétiques de croissance des deux lignées mettent en évidence un blocage de la croissance lors d'un traitement par A190. L'évolution de la croissance cellulaire est ici totalement ralentie par la présence du composé. On peut remarquer l'atteinte d'un plateau de

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

croissance dès 30h. La molécule A190 ne présente apparemment pas de toxicité cellulaire même à la plus forte dose, ce qui confirme les observations microscopiques réalisées. Les profils sont malgré tout assez différents de ceux des cellules normale (Figure 62). En effet, on remarque ici que l'effet dose est beaucoup moins prononcé. L'arrêt de la croissance survient plus tôt que dans le cas des cellules non synchronisées.



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

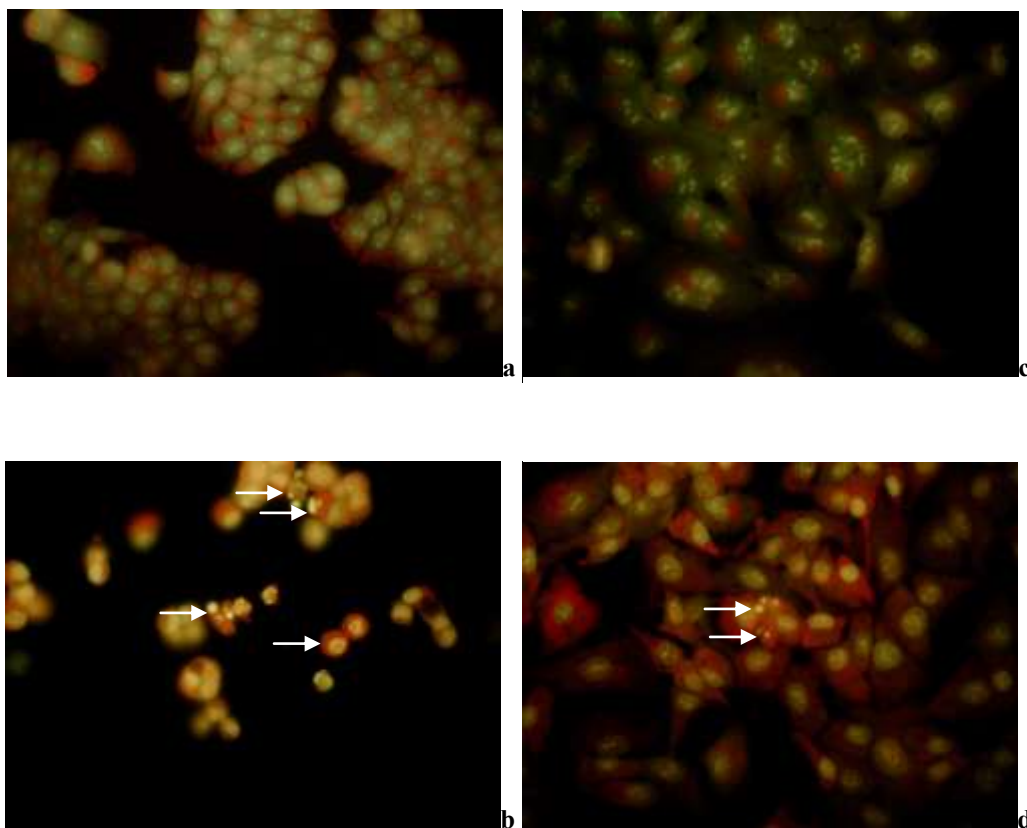
Figure 65 : Cinétiques de croissance discontinues sur cellules synchronisées traitées par A190 à différentes concentrations réalisées sur les deux lignées de cancer bronchopulmonaire : NSCLC-N6 (a), A549 (b)

Les cinétiques discontinues montrent clairement que les cellules ne peuvent reprendre une croissance normale après un traitement de 72h par A190. La molécule bloque donc la croissance cellulaire de manière irréversible.

VIII. ETUDE DE L'APOPTOSE

VIII.1 ACTIVITE PROAPOPTOTIQUE DE LA FUCOXANTHINE

L'induction d'une activité cytostatique, doit mener les cellules vers une mort de type apoptotique. Celle-ci, peut être observée par différentes techniques, la plus simple met en évidence un morphotype apoptotique par observation des cellules marquées par un fluorochrome, puis par l'observation de la dégradation de l'ADN génomique induite qui vient confirmer le diagnostique.



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 66 : Observation de cellules marquées à l'acridine orange. Comparaison de cellules témoins et de cellules traitées par la fucoxanthine à 15µg/ml (22,76µM). Sur lignée NSCLC-N6 (a, b) et sur A549 (c, d).

Les observations en microscopie à fluorescence montrent pour la lignée NSCLC-N6 une forte proportion de cellule à morphotype apoptotique (Figure 66). En effet, on remarque facilement grâce au marquage fluorescent bon nombre de cellules ayant perdues leur allure originale et montrant pour certaine une condensation du noyau et pour d'autres une destruction organisée en corps apoptotique. En effet, on différencie clairement des petites vésicules contenant du matériel génétique marqué en vert. Pour la lignée A549, le nombre de cellules en fin d'apoptose semble moins important. On remarque malgré tout ici une forte proportion de cellules à noyau condensé, laissant apparaître plus facilement l'ARN cellulaire différenciellement colorée en rouge. L'induction de l'apoptose par la fucoxanthine est donc largement confirmée par ces premières observations.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

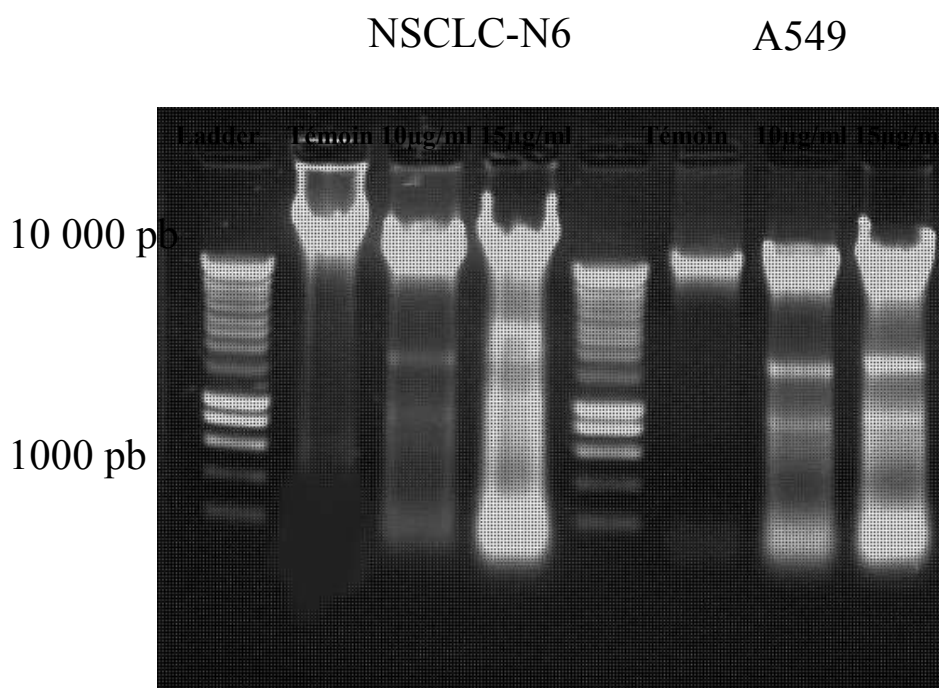


Figure 67 : Observation de la dégradation de l'ADN par induction de l'apoptose lors d'un traitement par la fucoxanthine à 10 et 15µg/ml (15,18 et 22, 76µM) sur NSCLC-N6 (à gauche) et sur A549 (à droite).

La confirmation de ce diagnostic est apportée par l'étude des conséquences du traitement sur l'intégrité de l'ADN génomique des cellules traitées. L'extraction réalisée montre (Figure 67) une dégradation de l'ADN des cellules traitées par la fucoxanthine, typique de l'apoptose, avec un profil en échelle et une concentration importante de fragments autour de 180 paires de bases (Wyllie *et al.*, 1984).

VIII.2 INFLUENCE DE A190 SUR L'INDUCTION DE L'APOPTOSE

Les résultats des études réalisées au niveau cellulaire, laissent à penser que la molécule A190 activité de type cytostatique, qui aura pour

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

conséquence de mener les cellules vers une mort de type apoptotique. En effet, malgré la sortie du cycle cellulaire lui permettant de proliférer, la cellule reste sous le contrôle de mécanismes génomiques de régulation. Ceux-ci induiront une mort programmée du fait de l'incapacité de la cellule à poursuivre un processus de division cellulaire normale. La mise en évidence de mort par apoptose vise donc à confirmer le mécanisme d'action supposé de la molécule A190.

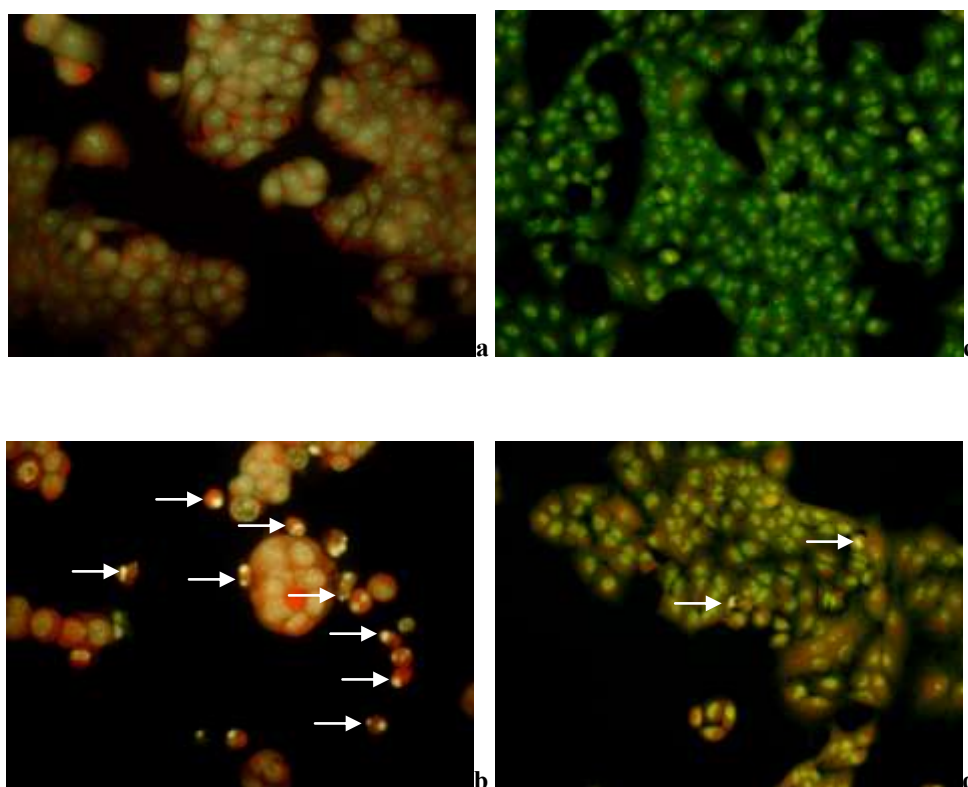


Figure 68 : Observation de cellules marquées à l'acridine orange. Comparaison de cellules témoins et de cellules traitées par A190 à 39,4µM. Sur la lignée NSCLC-N6 (a, b) et A549 (c, d).

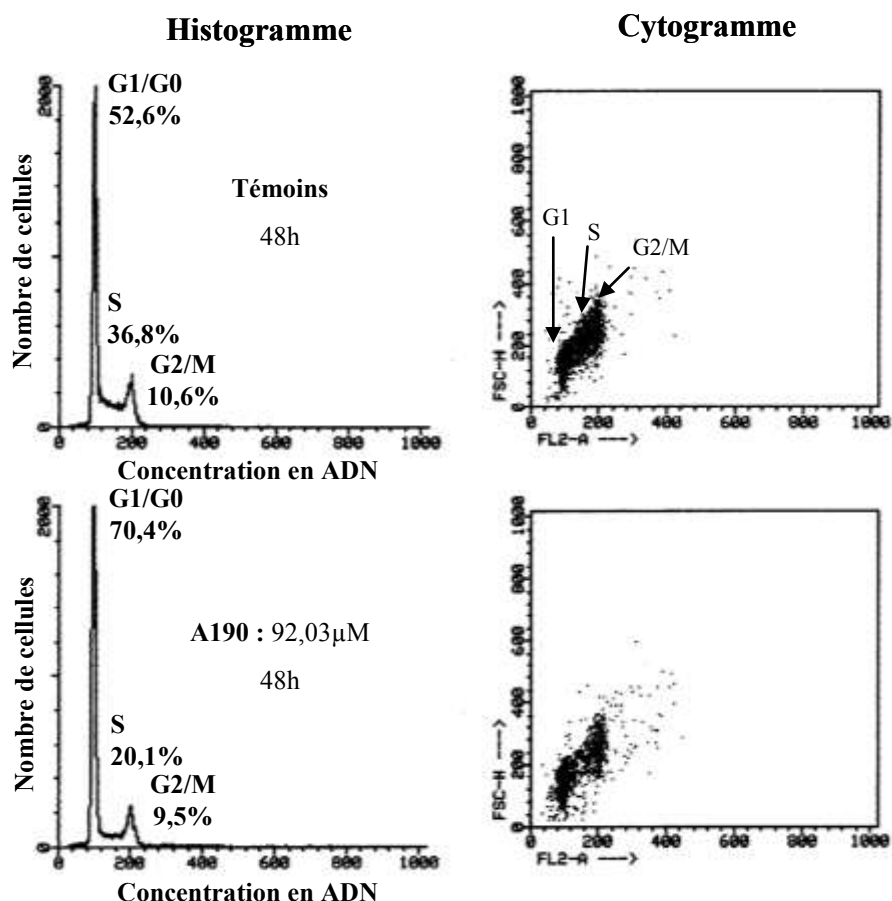
Chapitre IV : Résultats expérimentaux

L'observation en microscopie à fluorescence, des cellules marquées à l'acridine orange après un traitement par A190 sur 70h, montre un évident effet pro-apoptotique de la molécule. Chez les cellules NSCLC-N6 on retrouve un grand nombre de cellules en phase de mort programmée, laissant apparaître une morphologie typique avec une condensation du noyau et l'apparition de corps apoptotiques facilement identifiable (Figure 68b). Ces structures se retrouvent moins facilement pour A549, chez qui on observe plus particulièrement une condensation très nette du noyau (Figure 68d). Les observations du déclenchement de l'apoptose ont été réalisées à différents temps de traitement (50h, 60h et 70h, résultats non intégralement présentés ici), et on a pu observer un réel départ de l'induction de l'apoptose à partir de 60h.

IX. ETUDE DE L'INFLUENCE D'A190 SUR LE CYCLE CELLULAIRE

Suite aux résultats d'analyse de l'activité de la molécule A190, il apparaît que celle-ci présente un effet antiprolifératif de type cytostatique. La cytofluorimétrie en flux permet de préciser dans quelle phase du cycle les cellules se trouvent bloquées.

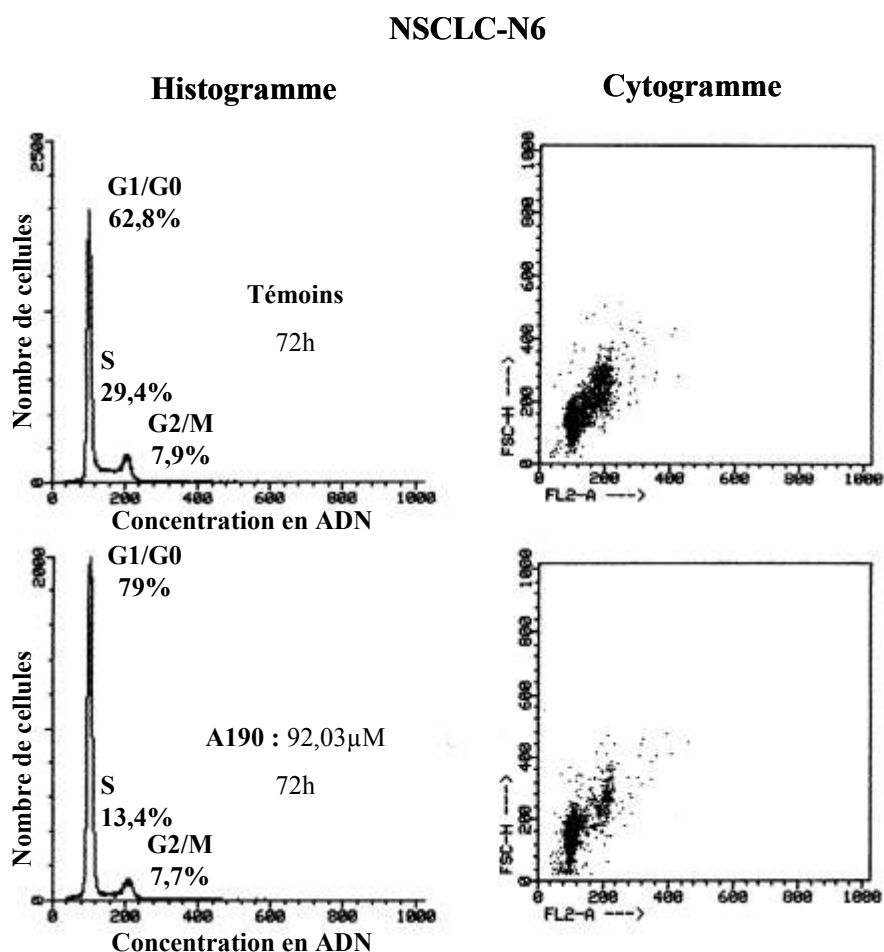
NSCLC-N6



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 69 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules NSCLC-N6 (non synchronisées) dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 48h à 92,03 μ M.

Ce premier résultat montre que dès 48h la molécule A190 induit un blocage des cellule en phase G1. Cet effet est facilement identifiable à la vue des différences de pourcentage de cellules dans chaque phase entre les cellules témoins et traitées. On voit que pour la phase G1 on a, 52% de cellule pour les témoins alors que pour les traitées le ratio monte à 70%. Dans le même temps on a une diminution typique des cellules en phase S avec 36% pour les témoins et seulement 20% pour les traitées.

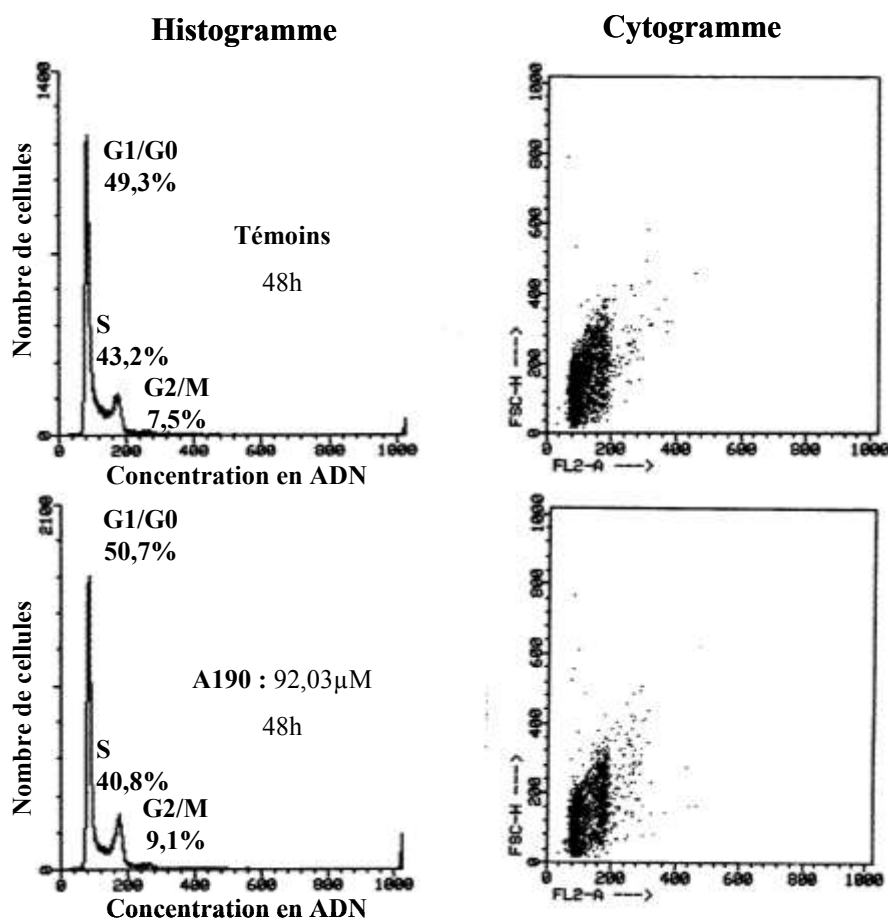


Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 70 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules NSCLC-N6 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 72h à 92,03 μ M.

Le deuxième test est réalisé au bout de 72h de traitement. On voit ici que le ratio de cellule en phase G1 a encore augmenté pour les cellules traitées, mais l'écart par rapport aux témoins reste constant. La même tendance se retrouve pour les cellules en phase S. Cette étude confirme donc l'activité décrite par les cinétiques de croissance. Elle nous apporte des informations quant à la phase dans laquelle sont bloquées les cellules NSCLC-N6.

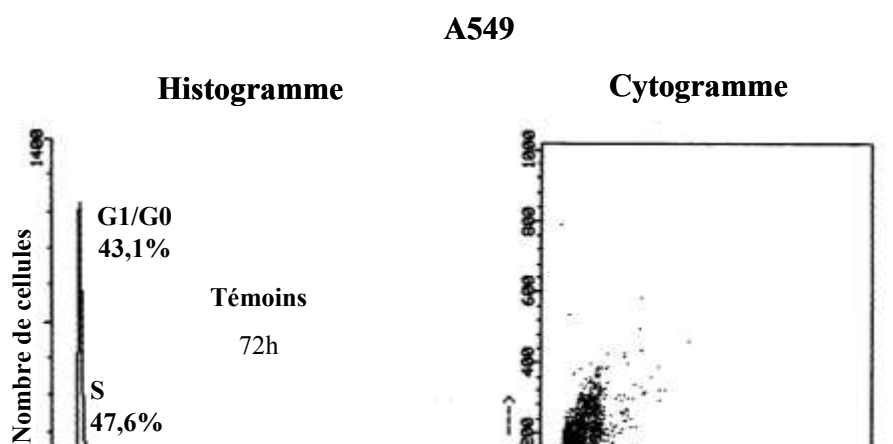
A549



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 71 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 pendant 48h à 92,03 μ M.

L'étude en cytofluorimétrie en flux montre pour A549 comme pour NSCLC-N6 un blocage des cellules en phase G0/G1. Cet effet semble toute fois moins marqué, les différences par rapport aux témoins sont plus minimes. On voit pourtant sur le cytogramme des cellules traitées que la quantité de cellules en phase S est bien plus faible que pour les témoins.



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 72 : Résultats de l'étude en cytofluorimétrie en flux. Comparaison des proportions de cellules A549 dans les différentes phases du cycle cellulaire, lors d'un traitement par A190 à 92,03 μ M.

Au bout de 72h de traitement on observe toujours une diminution des cellules en phase S, mais dans le même temps, on a une augmentation des cellules en phase G2/M. Ceci correspond à des cellules à 4n chromosomes bloquées en phase G1, car la lignée A549 est polyploïde et possède une faible quantité de cellules avec 4 noyaux.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

X. INFLUENCE D'UN TRAITEMENT PAR A190 SUR LES CIBLES GENOMIQUES HEF1 ET B2

X.1 EFFET SUR LA TRANSCRIPTION

Les résultats présentés ci-après (Figure 73, Figure 74) détaillent l'évolution de l'expression des gènes HEF1 et B2, rapporté à un gène contrôle (la β -actine), sur 70h d'observation de cellules NSCLC-N6 témoins et traitées par A190 à une concentration équivalente à la CI_{50} .

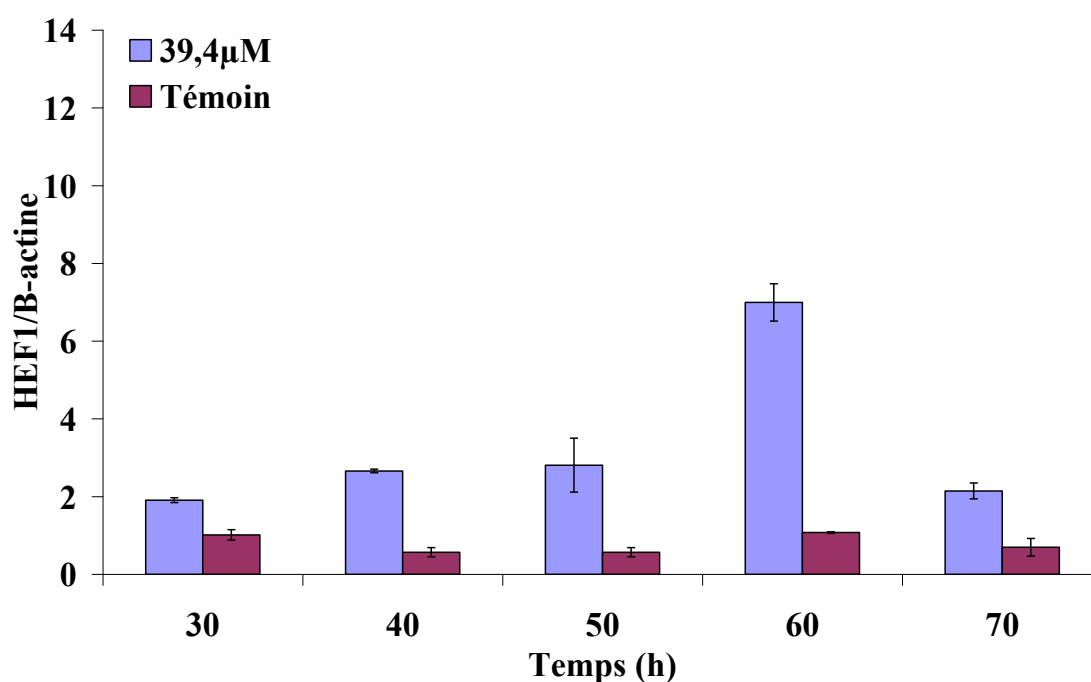


Figure 73 : Histogramme représentant l'évolution de la transcription du gène HEF1 chez les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par A190 à 39,4µM.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

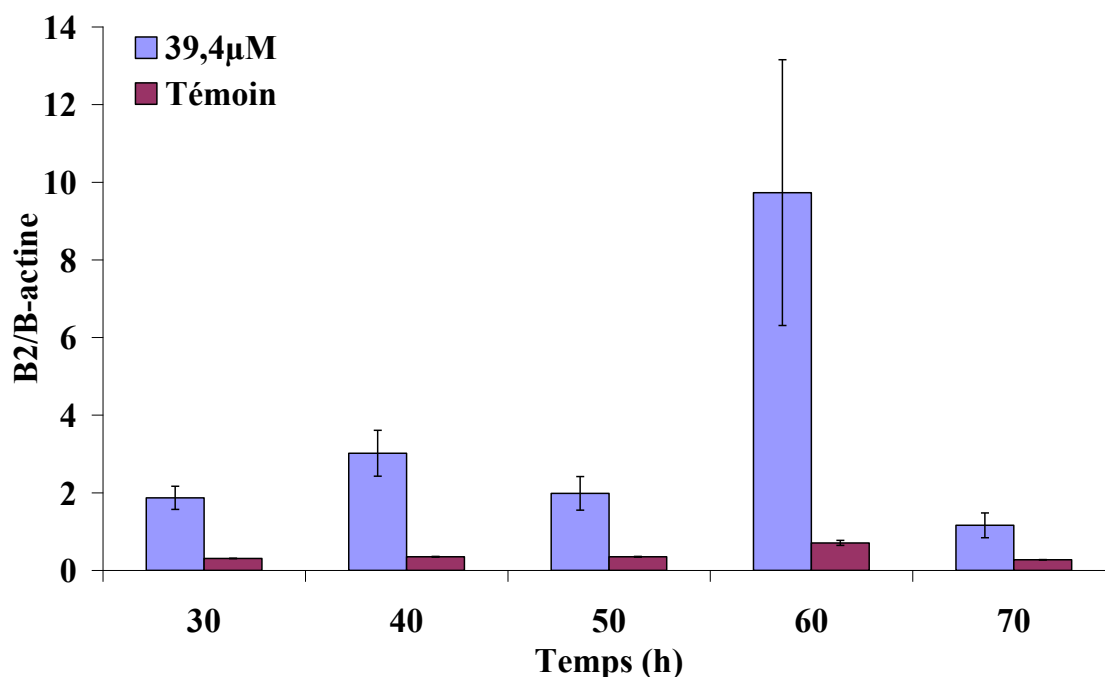


Figure 74 : Histogramme représentant l'évolution de la transcription du gène B2 chez les cellules NSCLC-N6 sur 70 heures avec traitement ou non par A190 à 39,4µM.

Les résultats des études par PCR quantitative, semblent montrer pour les deux gènes, une même tendance à la surexpression lors d'un traitement par A190. Cette surexpression est visible dès 30h de traitement et se poursuit sur 70h. Pour chaque temps, les cellules traitées présentent, en effet, une quantité plus de deux fois supérieure d'ARNm cible par rapport au témoin. Pour les deux gènes on remarque que la modulation de l'expression n'est pas constante au cours du temps. En effet, dans les deux cas, on observe un pic d'expression au bout de 60h.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

X.2 EFFET SUR LA PRODUCTION DES DIFFERENTES FORMES DE LA PROTEINE HEF1

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude de l'expression du gène HEF1, il est apparu indispensable de compléter l'interprétation de l'effet de la molécule A190 au niveau moléculaire par une analyse de la production de la protéine HEF1. En effet, 2 gènes sont impliqués et le seul dosage des ARN messenger pourrait compromettre la compréhension précise des mécanismes en jeu. Nous avons donc mis au point un protocole de détection et de dosage des différentes formes de la protéine HEF1.

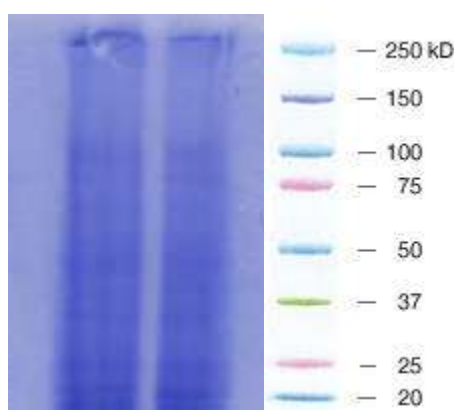


Figure 75 : Electrophorèse monodimensionnelle d'un extrait de protéine total issue de cellules NSCLC-N6 en culture. Les protéines sont révélées par un réactif colorant le SimplyBlue™, SafeStain (Invitrogen™).

L'électrophorèse monodimensionnelle (Figure 75) de l'extrait protéique totale nous permet de confirmer l'efficacité de la méthode

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

d'extraction utilisée. On voit en effet un smear de protéine typique, indiquant que toutes les tailles de protéines semblent avoir été correctement extraites.

Ainsi, il est apparu indispensable de réaliser une concentration des protéines par immunoprécipitation pour arriver à les détecter lors d'un western blot. C'est alors que plusieurs des différentes formes de la protéine HEF1 ont pu être mises en évidence (Figure 76).

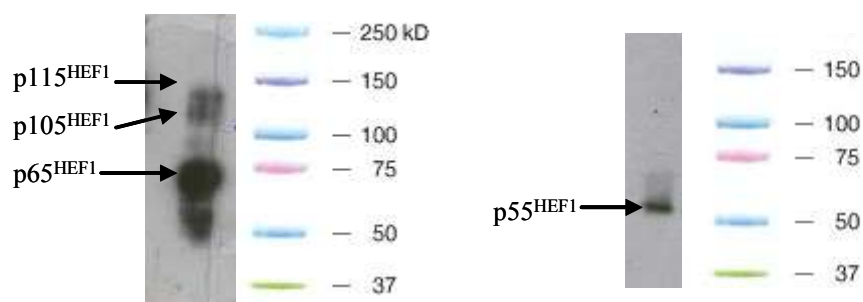


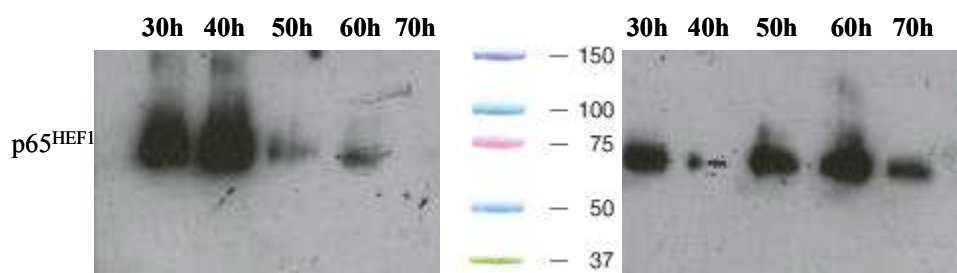
Figure 76 : Isolation et détection des différentes formes de la protéine HEF1 par immunoprécipitation/western blot. Les formes p115^{HEF1}, p105^{HEF1} et p65^{HEF1} ont été isolées par l'anticorps Cas-L (H-70) reconnaissant la partie C-terminale, la forme p55^{HEF1} est elle isolée grâce à l'anticorps Cas-L (2G9) reconnaissant la partie N-terminale de la protéine. La taille des différentes formes est ici révélée par le kaleidoscope™ (Précision plus protein™ Standards, Bio-Rad™), elle est exprimée en kiloDalton.

Ces premiers résultats d'immunoprécipitation/western blot confirment la présence de différentes isoformes de la protéine HEF1. Nous avons

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

ainsi identifié 4 de ces formes : $p115^{\text{HEF1}}$, $p105^{\text{HEF1}}$, $p65^{\text{HEF1}}$ et $p55^{\text{HEF1}}$. Nous avons validé ici l'efficacité et la spécificité des anticorps sélectionnés. En effet, les différentes mises au point réalisées n'ont montré apparemment aucun problème d'hybridation d'anticorps aspécifique. En effet, seules les tailles de protéine attendues, d'après la bibliographie, ont été observées. Nous avons de plus réussi à mettre au point un protocole assez simple et rapide de reconcentration des différentes formes de la protéine permettant d'envisager une analyse quantitative.

La mise au point de la détection de la protéine HEF1 par réaction immunogène nous a permis de réaliser une étude sur l'influence du traitement par A190. Ainsi, nous avons réalisé le même protocole que pour l'étude de l'expression du gène. En effet, des cellules synchronisées ont été traitées par A190 à $39,4\mu\text{M}$ et les protéines extraites toutes les 10 heures à partir de la 30^{ème} heure de traitement (Figure 77).



Chapitre IV : Résultats expérimentaux

Figure 77 : Révélation de la quantité de p65^{HEF1} chez des cellules NSCLC-N6 témoins (à gauche) et des cellules traitées par A190 à 39,4μM (à droite) au cours du temps. Pour cette étude les extraits protéiques totaux ont tous été étalonnés à la même concentration. Un problème expérimental ne nous a pas permis de réaliser un contrôle avec l'anticorps anti-actin.

Le résultat de cette étude montre une nette différence entre les taux de protéine HEF1 sous la forme p65^{HEF1}. On voit, que pour les cellules témoins la quantité de protéine a tendance à diminuer au cours de la croissance, alors que dans le même temps pour les cellules traitées cette quantité augmente et atteint un pic à 60h avant de redescendre à 70h. La même étude a été réalisée 3 fois en donnant des résultats identiques.

XI. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTICANCEREUSE *IN VIVO*

La dernière étape avant le passage en essai clinique d'une molécule, est la réalisation d'une étude visant à démontrer son potentiel d'inhibition tumorale. Pour cela, nous utilisons un organisme vivant (ici la souris nude) auquel est greffé une tumeur cancéreuse. Quatre lots de souris ont donc été greffés avec la lignée NSCLC-N6, trois ont été traités par A190 à différentes doses et un lot témoin n'a reçu aucun traitement. L'évolution des volumes tumoraux a alors été suivie pendant trois semaines, avec des mesures intervenant tous les 3 à 4 jours. Les résultats compilés dans la Figure 78 ont été soumis à des tests d'analyse de variance pour mettre en évidence les différences significatives entre les lots. Les différents lots ont été comparés à chaque temps, pour chacun des tests réalisés la normalité et l'équivalence des données étaient respectées.

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

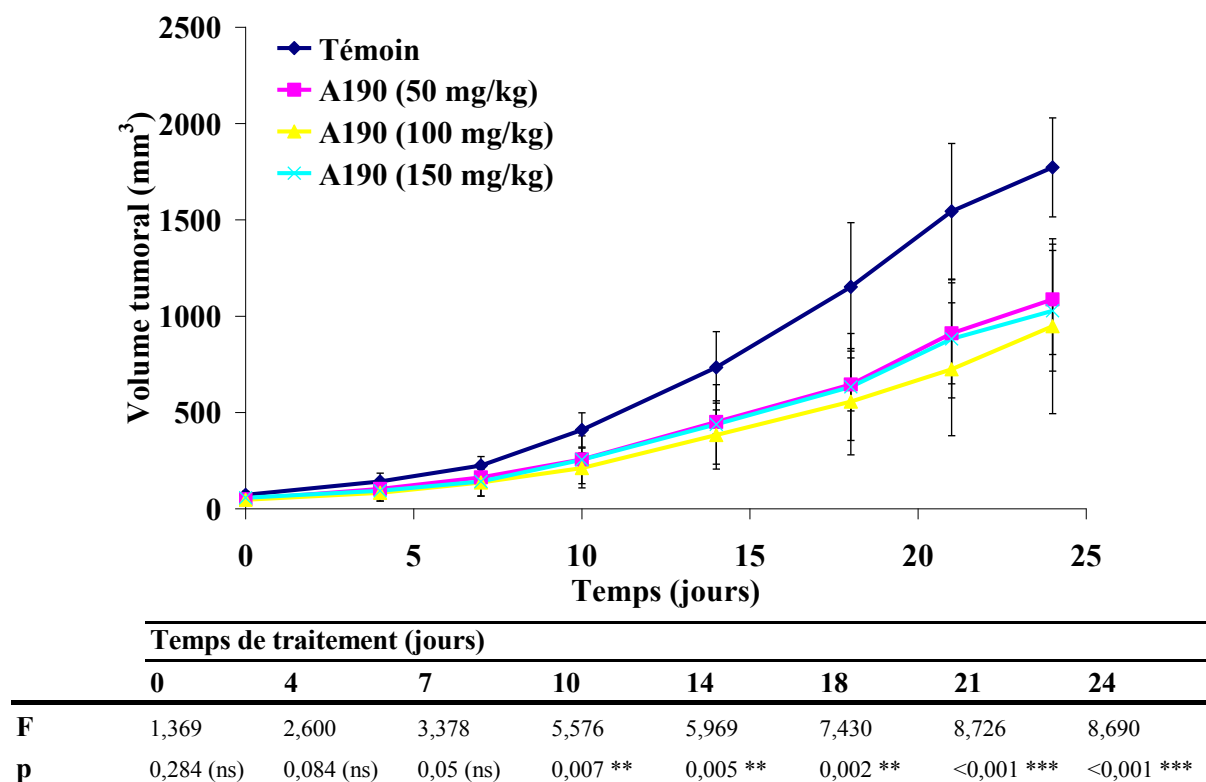


Figure 78 : Valeurs moyennes des volumes tumoraux ($\text{mm}^3 \pm$ intervalle de confiance 95%) pour chacun des lots tout au long du traitement. Chaque lot contient 6 souris réparties aléatoirement. Le tableau indique les résultats du test ANOVA avec : F = statistique de Fisher, et p = seuil de signification.

Les résultats des tests d'analyse de variance sont ici particulièrement probants. On remarque, qu'il existe une différence significative entre les groupes à partir du 10^{ème} jour de traitement ($p < 0,05$). Les résultats des tests ANOVA montrent d'ailleurs une augmentation constante de F en fonction du temps de traitement, et le seuil de significativité p lui, au contraire diminue. Ce qui traduit, un effet significatif croissant du traitement vis-à-vis du volume tumoral.

Lorsque l'effet du traitement est significatif, à partir du 10^{ème} jour, il est possible de réaliser des tests de comparaison multiple, selon la

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

méthode de Tukey (Sokal & Rohlf, 1995). Ces derniers montrent alors, qu'après 10 jours de traitement, chaque lot traité diffère du lot témoin ($p < 0,05$, Figure 79). Les souris traitées présentent donc une évolution du volume tumoral significativement plus lente que celle des souris témoins non traitées. L'efficacité du traitement par A190 et son influence au cours du temps, toujours plus importante est donc confirmée. En revanche ces tests, ne montrent aucune différence tout au long du traitement entre les lots de souris traités. Il n'y a donc pas ici d'effet dose, le seuil d'activité est atteint dès la première dose de 50 mg/kg.

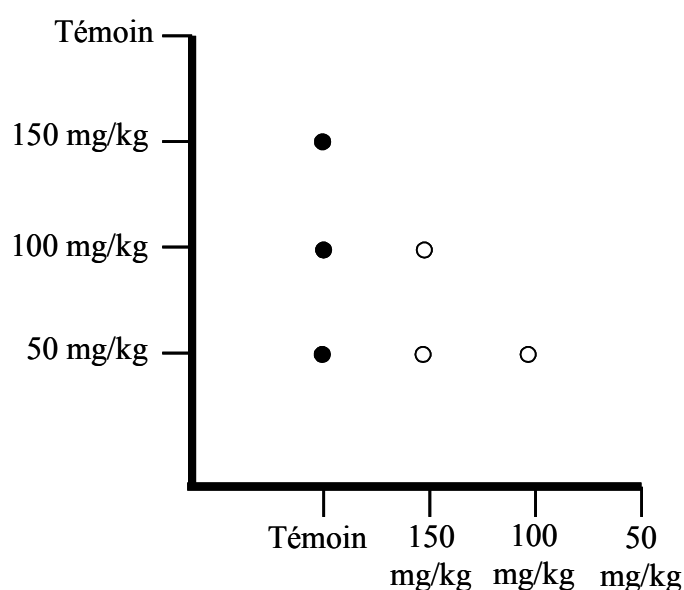


Figure 79 : Graphique représentant les résultats des comparaisons multiples par le test de Tukey. Les axes mettent en relation les différents lots. Chaque point noir indique une différence statistiquement

Chapitre IV : Résultats expérimentaux

significative entre les deux lots comparés ($p < 0,05$), les blancs ne présentent aucune différence. Les résultats sont identiques pour les temps 10 à 24 jours.

Discussion

XII. DISCUSSION

XII.1 LE SCREENING DES MICROALGUES

La découverte de nouveaux composés ayant des vertus thérapeutiques, s'appuie depuis des centaines d'années sur les ressources naturelles (Gurib-Fakim, 2006). Tous les phyla du vivant ont ainsi été étudiés à la recherche de nouveaux médicaments (Chin *et al.*, 2006; Newman *et al.*, 2000). Aujourd'hui, les sources et les méthodes d'investigation ont évolué (Gullo *et al.*, 2006) et influencent largement la médecine moderne (Balunas & Kinghorn, 2005; Jones *et al.*, 2006; Koehn & Carter, 2005; Newman *et al.*, 2003; Paterson & Anderson, 2005). Depuis une cinquantaine d'années le monde de la recherche pharmacologique, a pris conscience du potentiel exceptionnel du monde marin comme source de molécules originales bioactives. En effet, les océans sont le berceau de la vie, ils ont vu le développement d'un nombre incalculable d'espèces différentes, adaptées à des milieux extrêmement diversifiés. Le monde marin implique donc aujourd'hui logiquement un travail interdisciplinaire concernant la chimie, la biochimie, la biologie, l'écologie et la pharmacologie (Capon, 2001) dans le but de découvrir les médicaments de demain. La recherche anticancéreuse n'échappe pas à cet intérêt tout particulier pour les molécules bioactives d'origine naturelle (Mann, 2002) et

Chapitre V : Discussion

particulièrement marine (Mayer & Gustafson, 2004; Nagle *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2005). Ainsi, plus de 60% des anticancéreux utilisés actuellement en chimiothérapie sont d'origine naturelle (Cragg *et al.*, 1997). Les organismes marins les plus étudiés jusqu'ici étaient les éponges, les tuniciers et les coelentérés (Faulkner, 2002). Mais aujourd'hui, un intérêt tout particulier se porte sur les microorganismes marins (Jensen *et al.*, 2003), du fait de leur simplicité, de leur grande biodiversité, et de la possibilité de les produire en dehors du milieu naturel et ainsi d'accéder à une ressource compatible avec le travail de recherche pharmacologique.

C'est ainsi que notre attention s'est portée au cours de cette thèse, sur des organismes encore peu présents dans le domaine de la recherche pharmacologique : les microalgues. Celles-ci sont reconnues depuis de nombreuses années pour leur production de métabolites secondaires (Metting & Pyne, 1986; Shimizu, 1996; Tringali, 1997) et pour certaines espèces pour leur production toxinique (Daranas *et al.*, 2001; Katircioglu *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2005; Van Dolah & Ramsdell, 2001). Leurs caractéristiques biochimiques et le développement des bio-productions contrôlées fait de ces organismes une source idéale pour la recherche de nouveaux composés bioactifs. C'est ainsi que nous avons engagé au cours de ce travail, une étude portant sur 10 espèces différentes produites en laboratoire. Le choix de ces espèces a été réalisé selon plusieurs critères :

Chapitre V : Discussion

La disponibilité de souches isolées, cultivées en milieu artificiel en conditions contrôlées.

La sélection d'espèces ne présentant pas de production toxinique connue, pouvant induire des faux positifs lors de la réalisation des tests de cytotoxicité.

Le choix d'espèces phylogénétiquement éloignées, dû à une séparation évolutive particulièrement ancienne, laissant donc envisager une diversité biochimique d'autant plus importante.

Le choix d'espèces aux conditions de vies naturelles très différentes, impliquant des adaptations et donc des voies métaboliques différentes.

Les différentes souches sélectionnées ont donc été cultivées sur milieu artificiel jusqu'à atteinte de la phase stationnaire de croissance. En effet, les microalgues présentent une croissance en 3 phases principales, typiques des microorganismes : la phase de latence, la phase exponentielle de croissance, la phase stationnaire. De plus, on sait aujourd'hui que la production de métabolites secondaires est maximale en fin de croissance et lors de la phase stationnaire (Skulberg, 2000). Les différentes extractions chimiques réalisées sur chaque espèce ont pu être testées sur lignées cancéreuses. Les résultats de ces tests confirment clairement le potentiel envisagé pour ces organismes comme sources de molécules bioactives. En effet, le screening mets en évidence un grand nombre d'extraits capable d'inhiber la croissance des cellules cancéreuses. Cette première étape indispensable à la découverte de nouveaux médicaments issus de

Chapitre V : Discussion

composés naturels semble concluante et ouvre la voie vers un travail plus complet et plus approfondi sur chaque extrait bioactif. Un des autres objectifs de ce travail a été de commencer à sélectionner des groupes phylogéniques particulièrement adaptés à la découverte de composés bioactifs. Mais les résultats positifs des études de cytotoxicité présentent une répartition aléatoire et ne mettent aucun groupe en évidence.

XII.2 ISOLATION ET IDENTIFICATION DES MOLECULES BIOACTIVES

A partir de ces premiers résultats et des observations microscopiques réalisées au cours des traitements, deux extraits ont été sélectionnés pour tenter de déterminer la nature de la ou des molécules impliquées dans les activités mis en évidence.

XII.2.1 La fucoxanthine issue d'*Odontella aurita*

Le premier est l'extrait apolaire dichlorométhane issu de la microalgue *Ondotella aurita*. Chaque étapes de chimie visant à fractionner l'extrait ont en permanence été suivies par des tests d'activité, ce qui a permis d'isoler progressivement les fractions actives, jusqu'à la découverte de la molécule bioactive. Ce travail a donc permis d'isoler et d'identifier la fucoxanthine. Cette molécule très présente chez les algues est un pigment, c'est plus précisément un caroténoïde xanthophylle impliqué dans la photosynthèse et la photoprotection (Demmig-Adams & Adams, 1996). Les différents travaux visant à

Chapitre V : Discussion

comprendre le type d'activité induite par la fucoxanthine ont mis en évidence son potentiel antiprolifératif de type cytostatique. En effet, les cinétiques continues ont montrées des profils typiques d'une activité cytostatique (Figure 59). La croissance est bloquée au bout de 24h de traitement avec un arrêt total de croissance, sans pour autant induire une mortalité excessive. Les cinétiques discontinues, elles, indiquent l'irréversibilité de l'activité, les cellules traitées ne pouvant reprendre une croissance normale même après arrêt du traitement (Figure 60). La combinaison des résultats nous permet de dire que cette molécule est capable d'induire un blocage du cycle cellulaire, interdisant tout retour des cellules dans un cycle de croissance normale et les menant vers une mort programmée de type apoptotique. En effet, ceci est aussi confirmé par l'étude menée sur la détection de l'apoptose induite par la fucoxanthine. Celle-ci possède un effet pro-apoptotique très net, d'une importance rarement observée avec d'autres molécules actives (Figure 66, Figure 67).

Toute cette étude est en corrélation avec les précédents travaux réalisés par différentes équipes. En effet, depuis de nombreuses années des études épidémiologiques ont montré un lien évident entre les caroténoïdes et la diminution des risques de maladie chronique (Krinsky & Johnson, 2005; Rock, 1997; Tapiero *et al.*, 2004). En effet, c'est particulièrement dans les cas de cancer qu'un effet de prévention a pu être démontré lors de la consommation de caroténoïdes (Agarwal & Rao, 2000; Kotake-Nara *et al.*, 2001;

Chapitre V : Discussion

Nishino *et al.*, 2000; Slattery *et al.*, 2000). On attribue aujourd'hui principalement ces effets bénéfiques aux propriétés antioxydantes des caroténoïdes (El-Agamey *et al.*, 2004; Hix *et al.*, 2004; Kiokias & Gordon, 2004; Stahl & Sies, 2003), et c'est particulièrement le cas pour le cancer du poumon (Ruano-Ravina *et al.*, 2006).

La fucoxanthine est elle-même connue pour posséder une activité antiproliférative depuis plusieurs années (Okuzumi *et al.*, 1990). Mais récemment plusieurs équipes ont mené des études sur cette molécule, visant à mettre en évidence son potentiel d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses (Kotake-Nara *et al.*, 2005b). Plusieurs types de cancer ont ainsi été étudiés, la fucoxanthine inhibe la prolifération de cellules de cancer de la prostate (Kotake-Nara *et al.*, 2005a), du colon (Das *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 2004; Konishi *et al.*, 2006), de la leucémie (Hosokawa *et al.*, 1999; Konishi *et al.*, 2006), du sein (Konishi *et al.*, 2006) et du neuroblastome (Okuzumi *et al.*, 1990). Notre travail réalisé sur un nouveau type de cancer confirme ces différentes études, de plus la description d'une activité de type cytostatique inductrice d'un blocage des cellules en G0/G1 est en totale corrélation avec d'autres travaux (Das *et al.*, 2005; Okuzumi *et al.*, 1990). Comme nous l'avons observé avec nos modèles, l'arrêt de la croissance est suivi par une mort de type apoptotique dans les autres types de cancer (Das *et al.*, 2005; Hosokawa *et al.*, 1999; Kotake-Nara *et al.*, 2005a). L'approfondissement de la compréhension des mécanismes d'arrêt de la prolifération et d'induction de l'apoptose,

Chapitre V : Discussion

ont permis de mettre en évidence plusieurs cibles moléculaires pharmacomodulées par la fucoxanthine. Ainsi, pour le cas des cellules du neuroblastome, c'est l'oncogène N-Myc qui semble être impliqué, alors que pour le cancer du colon il s'agirait d'une surexpression de l'oncogène p21^{WAF1/Cip1} (Das *et al.*, 2005).

Les études de l'influence d'un traitement par la fucoxanthine sur le transcriptome, réalisées grâce à la méthode du RF-Differential display, non pas permis d'identifier les gènes différentiellement exprimés (pour des raisons techniques), bien que les profils obtenus montrent des différences entre les cellules témoins et traitées.

XII.2.2 Les molécules issues de *Galdieria sulphuraria*

L'objectif était de comparer l'activité de l'extrait apolaire issu de deux cultures différentes. Ainsi, on a choisi deux algues aux conditions physiologiques très différentes : une étant en phase de croissance exponentielle (culture continue), l'autre étant dans une phase quiescence (culture batch). Les algues en culture continue vont donc avoir tendance à se multiplier très rapidement par division cellulaire et donc à optimiser leur production biochimique pour permettre la séparation du matériel biologique entre les deux cellules filles. Au contraire, les cellules en latence dans une culture batch vont stopper leur division en raison d'une carence en ressources, nutritive et lumineuse. Elles vont aussi modifier leur métabolisme et avoir

Chapitre V : Discussion

tendance à accumuler des réserves et des métabolites secondaires (Muller-Feuga *et al.*, 2004).

Ainsi les études réalisées montrent que les deux cultures présentent des différences importantes tant au niveau des activités antiprolifératives que du contenu biochimique. En effet, on a pu démontrer que l'activité de l'extrait brut des algues en phase plateau (culture batch) était bien supérieure à celle de l'extrait des algues en phase exponentielle de croissance. Ces résultats sont confirmés lors du fractionnement sur colonne avec toujours la culture batch plus active. Ce travail appuie donc l'hypothèse que les algues en quiescence auront tendance à accumuler des molécules surnuméraires et notamment des métabolites secondaires pouvant avoir une activité antiproliférative. Il semble donc clair que l'état physiologique de l'organisme utilisé pour l'extraction de molécule active est de toute première importance. Il faut donc, dans un souci de répétabilité des résultats, être capable de disposer d'une biomasse constante d'un point de vue physiologique et biochimique. Ceci, confirme l'intérêt de l'utilisation des microalgues dans ce type d'étude, du fait que leur production soit indépendante des conditions environnementales naturelles qui sont un paramètre particulièrement incontrôlable. Ces observations confirment de plus l'importance de notre choix de réaliser un screening sur différentes espèces de microalgues cultivées de manière similaire et arrêtées, pour en extraire le contenu biochimique, toutes au même « moment » lors de la phase plateau. Ce

Chapitre V : Discussion

choix de protocole, essentiel, nous permet alors d'affirmer que les résultats des tests CI_{50} réalisés lors du screening sont réellement comparables.

XII.3 A190 ET LES NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES

Les travaux réalisés ici sur l'étude de l'activité au niveau cellulaire de la nouvelle molécule A190 ont démontré un mécanisme particulièrement intéressant et adapté au traitement des cancers bronchopulmonaires non à petites cellules. L'étude de l'activité de A190 sur les lignées NSCLC-N6 et A549 montre une capacité d'inhibition de la croissance très nette. Les cinétiques continues et discontinues montrent des profils typiques d'une activité antiproliférative de type cytostatique (Figure 62, Figure 63). En effet, on observe un arrêt de la croissance sans destruction cellulaire et une irréversibilité de ce blocage après l'arrêt du traitement. La réalisation de ces cinétiques sur des cellules synchronisées montre un effet plus marqué que sur les cellules asynchrones, avec un blocage de la croissance intervenant plus rapidement et de manière plus importante (Figure 64, Figure 65). On peut donc supposer que l'effet de la molécule intervient rapidement sur un plus grand nombre de cellules. Ce qui confirme le fait que la grande majorité des cellules est bien synchronisée et que l'activité du traitement est cycle et phase dépendant. Ce que démontre l'étude en cytofluorimétrie en flux qui précise que le traitement des lignées NSCLC-N6 et A549, a induit un

Chapitre V : Discussion

blocage des cellules en phase G1 (Figure 69, Figure 70, Figure 71, Figure 72). Ce type d'activité conduit à un arrêt total de la prolifération, puis à une mort de type apoptotique, ce qui est démontré par les observations de l'effet pro-apoptotique d'A190 (Figure 68). Ces différents résultats sont donc logiquement liés et confirment une activité antiproliférative de type cytostatique, capable d'induire spécifiquement un arrêt de la croissance des cellules cancéreuses.

La description de cette activité réalisée grâce aux différentes études au niveau cellulaire, nous amène à une réflexion sur les causes génétiques de cette activité. On sait que la particularité de la cellule cancéreuse est entre autre de ne plus répondre aux mécanismes de contrôle de la prolifération, plusieurs gènes étant parfois impliqués dans une croissance anarchique et infinie. L'induction d'un arrêt de la croissance cellulaire sans passer par une destruction totale des cellules, semble implicitement due à une interférence avec les processus moléculaires particuliers de la cellule cancéreuse. De plus on sait que le déclenchement d'une mort de type apoptotique est totalement contrôlé par des processus génétiques. Il semble donc ici logique, que les résultats au niveau cellulaire, témoignent de la mise en place de voies alternatives de régulation induisant une désorganisation des voies métaboliques de prolifération de la cellule cancéreuse. Or, la recherche de nouveaux traitements toujours plus spécifiques des cellules cancéreuses, nous amène aujourd'hui vers la découverte de molécules capables de cibler ces mécanismes

Chapitre V : Discussion

génomiques responsables des capacités de prolifération et d'invasion si particulières des cellules cancéreuses. En effet, comme nous l'avons vu, le cancer est une maladie génétique acquise, impliquant la mutation d'un certain nombre de gènes intervenant à différents niveaux de la vie cellulaire. C'est donc pour contrer les conséquences de ces mutations, que nous devons aujourd'hui trouver les moyens d'induire les mécanismes génomiques capables de rétablir un contrôle du cycle cellulaire et d'induire une mort programmée. L'étude du transcriptome est complexe, la découverte de cibles génomiques pharmacomodulées passe par des techniques d'isolation des ARNm différentiellement exprimés. Ainsi, c'est lors d'une étude réalisée avec la technique de Differential display (Liang & Pardee, 1992), qu'une expression différentielle des gènes HEF1 (Law *et al.*, 1996) et B2 (Jacquot *et al.*, 2004) a pu être mise en évidence. Le gène B2 (GenBank AY166681), ne semble pas coder pour une protéine, en effet nous avons identifié 13 480 paires de bases de cet ARN sans pouvoir définir de cadre de lecture significatif. Il se situe dans la région 6p24-p25 au niveau de l'intron n°2 du gène HEF1. L'activité de la molécule A190 étant maintenant décrite comme antiproliférative de type cytostatique, la suite de l'étude consistait donc à comprendre si et comment les deux cibles moléculaires HEF1 et B2, étaient régulées lors d'un traitement par A190. Nous avons donc réalisé pour cela une étude visant à décrire l'expression des ARNm tout au long du cycle cellulaire en présence de la molécule d'intérêt. Le

Chapitre V : Discussion

développement des biotechnologies actuelles permet d'aller toujours plus loin dans l'analyse de la quantification d'un ARNm. L'étude de l'expression des gènes HEF1 et B2 a donc été réalisée par PCR quantitative, qui nous permet de doser les quantités relatives d'ARNm produits par les cellules en réponse au traitement.

Les travaux en RT-PCR quantitative réalisés sur cellules NSCLC-N6 traitées par A190, ont très nettement démontré une importante surexpression des deux gènes lors du traitement (Figure 73, Figure 74). L'étude menée sur des cellules synchronisées a de plus mis en évidence une variation du taux de surexpression au cours du temps. On peut voir sur les histogrammes qu'un pic d'expression se détache à 60h. On peut supposer que cette surexpression intervient dans une phase précise du cycle cellulaire, puisque celui-ci dure environ 30h pour les cellules NSCLC-N6 synchronisées (Figure 64). A 60h les cellules démarrent une deuxième phase G1 et ont toutes pu intégrer la molécule A190 dont l'effet inducteur de l'expression des gènes HEF1 et B2 apparaît très marqué. Il semble que les nouvelles cibles décrites sont pharmacomodulées et se trouvent directement impliquées dans l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire à différents niveaux du cycle et selon différentes voies de régulations. En effet, les deux gènes étudiés ici sont différents, HEF1 produit une protéine qui va être clivée au cours du cycle cellulaire pour intervenir à différents niveaux, alors que B2 semble plutôt correspondre à un ARN non-codant séquestré dans le noyau, du fait de sa taille et de sa structure.

Chapitre V : Discussion

La poursuite de la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu concerne la régulation de la protéine HEF1. Comme nous l'avons vu plus avant la protéine HEF1 est différentiellement exprimée au cours du cycle cellulaire (cf. II.8.3.3.2). La protéine est alors sous différentes formes, pour intervenir dans plusieurs mécanismes. Nous avons donc tenter, en utilisant deux anticorps différents reconnaissant les parties N ou C-terminale de la protéine, de doser les différentes formes connues de la protéine. Mais bien que, les électrophorèses monodimensionnelles (Figure 75) et les dosages par la méthode de Bradford révèlent que l'extraction de protéine totale était de bonne qualité, il est rapidement paru impossible de mettre en évidence et à fortiori de doser la protéine HEF1, présente en trop faible quantité, par un simple western blot. Ainsi, nous avons fait le choix de passer par une immunoprécipitation afin de reconcentrer les protéines avant de les soumettre au western blot. Cette mise au point nous a ainsi permis d'identifier les différentes formes attendues de la protéine (Figure 76). Nous validons ainsi l'utilisation de deux anticorps capables de reconnaître spécifiquement les deux extrémités de la protéine. La poursuite de l'étude consistait donc à réaliser le même suivi que celui effectué pour l'analyse de l'expression des ARN messagers. L'étude réalisée montre que pour les témoins la forme $p65^{HEF1}$ a tendance à diminuer au cours de la croissance. Ce résultat s'explique par le fait que le nombre de cellules en division va avoir tendance à diminuer du fait de l'atteinte de la confluence (Figure 77). Or $p65^{HEF1}$ apparaît en

Chapitre V : Discussion

même temps que p55^{HEF1} lors de la transition G2/M. En revanche dans le cas des cellules traitées on a, à la fois un blocage de la croissance et une augmentation de la synthèse de la protéine, avec un pic semblable à celui de l'ARN messager (Figure 73). On a donc ici des cellules bloquées qui vont mourir par apoptose et qui dans le même temps surexpriment p65^{HEF1}, qui peut être clivée pour donner la forme p28^{HEF1} impliquée dans le déclenchement de l'apoptose. On peut donc raisonnablement envisager que le traitement par A190 soit notamment capable d'induire une surexpression de la protéine HEF1 qui provoquerait alors un déclenchement de l'apoptose.

La cohérence des différentes études réalisées tant au niveau cellulaire que moléculaire indique que ces deux gènes ont un rôle dans la régulation de la croissance de la cellule cancéreuse, et que leur surexpression va induire un arrêt de la prolifération suivi d'une mort par apoptose. Ceci est soutenu par les différents travaux qui ont montré que le gène HEF1 est impliqué dans un grand nombre de processus de la vie cellulaire (Law *et al.*, 1998). Ce gène est impliqué dans le contrôle de la croissance (O'Neill & Golemis, 2001), dans la mort apoptotique (Law *et al.*, 2000), dans la motilité (Lauffenburger & Horwitz, 1996) et dans la différenciation cellulaire (Boudreau & Bissell, 1998), par l'intermédiaire d'interaction au niveau des sites d'adhésion cellulaire et du fuseau mitotique. Le gène HEF1 est responsable de la production de 5 protéines différentes : p115^{HEF1},

Chapitre V : Discussion

p105^{HEF1}, p65^{HEF1}, p55^{HEF1} et p28^{HEF1}. L'induction des caspases conduit au clivage de la forme complète de la protéine (p105^{HEF1} et p115^{HEF1}) en : p55^{HEF1}, impliquée dans la mitose et dégradée lors de l'apoptose par le protéasome et p65^{HEF1}, conservée lors de la mitose alors qu'elle est dégradée lors de l'apoptose, celle-ci sera clivée pour donner alors p28^{HEF1} responsable de l'activité pro-apoptotique (Law *et al.*, 2000).

L'étude *in silico* (Jacquot, 2001; Jacquot *et al.*, 2004) de la structure primaire de l'ARN B2 nous laissent penser qu'il s'agit d'un nouveau membre de la famille des ARN non codant. En effet, les ARN ont longtemps paru être de simples intermédiaires entre ADN et protéines : les ARN codants, correspondant aux ARN messager (ARNm) transmettant le message du gène dans le cytoplasme, ARN non-codant, correspondant aux ARN ribosomiaux et ARN de transfert oeuvrant au déchiffrement et à la traduction de l'ARNm en protéine, et les ARN catalytiques participant à l'épissage des introns. Or, on sait que les protéines produites sont codées par seulement 2% du génome. Les recherches menées pour comprendre le ou les rôles des 98% du génome restant, nous ont amené à la découverte d'un nouveau type d'ARN. Il s'agit des ARN non codant (ARNnc) régulateurs, qui ont été découverts à la fin des années 90 et qui semblent impliqués dans différents processus de régulation de l'expression génique. Ils comprennent plusieurs familles, notamment deux nouvelles classes de petits ARN : les microARN (ARNmi) et les petits ARN interférants

Chapitre V : Discussion

(ARNsi : small interfering RNA) qui remplissent de nombreuses fonctions, en particulier celle de l'inhibition post-transcriptionnelle des gènes. Les premiers (ARNmi) proviennent de gènes qui leur sont propres et dont ils sont les uniques produits (Bartel, 2004; Mattick & Makunin, 2005; Pfeffer *et al.*, 2004). Les seconds (ARNsi) dérivent de deux sources, exogène ou endogène (Mattick & Makunin, 2005). La source exogène correspond soit à l'apport extérieur d'un ARN double brin par injection expérimentale, soit à un apport en provenance de génomes à ARN double brin comme ceux de certains virus à ARN. La source endogène correspond à une production naturelle par utilisation des parties exoniques (codantes ou non codantes) d'un gène plus étendu. Dans les deux cas, ces ARN seront responsable de la formation de complexe avec un ARN messenger cible, ce dernier sera alors dégradé par une ribonucléase reconnaissant le complexe. L'expression du gène sera donc inhibé, l'ARNm n'existant plus, il n'y aura plus production de la protéine. Mais malgré l'engouement actuelle pour ces petits ARN interférant, d'autres types d'ARN non codant régulateurs ont été identifiés, ceux-ci sont de plus grande taille et impliqués dans d'autres modes de régulation (Brockdorff *et al.*, 1992; Sleutels *et al.*, 2002). En effet, au contraire des ARNmi/si, ceux-ci vont avoir pour cible l'ADN génomique. Ils peuvent donc être responsables de la formation de complexes avec l'ADN pour en inhiber la fonction (Wutz, 2003), on parlera alors de régulation épigénétique. C'est notamment le cas du mécanisme d'extinction du

Chapitre V : Discussion

chromosome X découvert chez la souris (Chang *et al.*, 2006; Furuno *et al.*, 2006). Dans ce cas, l'inactivation du chromosome X semble s'être développée pour compenser le déséquilibre dans la production des protéines codées par des gènes liés au X entre les mâles et les femelles. Le chromosome est inactivé par modification chromatinienne : constitué exclusivement d'hétérochromatine, il est visible en microscopie et connu sous le nom de corps de Barr (Bennett, 1963), cette conformation rendant impossible la fixation de l'ARN polymérase sur sa matrice ADN. Structure identifiée depuis 1949, les mécanismes induisant sa conformation commencent seulement à être sinon compris, du moins appréhendés. Elles passent par des modifications covalentes de l'ADN et des histones (Jenuwein & Allis, 2001) : méthylation de l'ADN, hypoacétylation et méthylation de la lysine 9 et hypoacétylation de la lysine 4 de l'histone H3, enrichissement du chromosome en histone macro-H2A, une version alternative de l'histone H2A, déacétylation de l'histone H4, qui permettent l'établissement et le maintien de l'hétérochromatinisation et de l'inactivation. Une avancée dans la compréhension du phénomène a été le développement du concept du *Xic* (X inactivation center) (Heard *et al.*, 1997). Il a été observé que l'hétérochromatinisation se propageait du X vers l'autosome et inactivait des gènes autosomaux uniquement en *cis* (Russell & Montgomery, 1970). Cela a mené à l'identification dans la bande D du chromosome X, dont la taille a été évaluée entre 35 et 700 kb selon les

Chapitre V : Discussion

expériences de transgénèse qui ont été menées (Herzing *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996). Le premier gène impliqué dans l'inactivation à avoir été identifié est *Xist* (*X Inactive Specific Transcript*), il mesure 17 kb (Brockdorff, 1998; Kay, 1998; Rastan, 1994; Takagi, 1996). Il code pour un ARN non traduit qui s'accumule et « peint » le chromosome à inactiver jusqu'à la métaphase. Fait étonnant, cet ARN ne diffuse pas dans le noyau et reste localisé sur le chromosome qui l'exprime. Il reste aujourd'hui à comprendre d'une part, comment cet ARN déclenche les modifications menant à l'hétérochromatinisation du chromosome, et d'autre part les mécanismes qui régulent l'expression de cet ARN et le « choix » du chromosome à inactiver. Récemment, un ARN antisens, *Tsix*, a été identifié 16 kb en aval de *Xist* et serait impliqué dans la régulation de son taux d'expression. Ces différents phénomènes correspondent à des régulations épigénétiques, et on peut les retrouver dans plusieurs maladies humaines (Delaval & Feil, 2004).

Aux vues des différences entre ces deux gènes, nous supposons donc que leur implication dans l'activité observée sera différente. Plusieurs hypothèses quant aux mécanismes moléculaires en causes peuvent être avancées :

Le rôle de l'ARN B2 semble lui plus complexe, on peut imaginer qu'il soit directement impliqué dans la régulation de l'expression du gène HEF1, ou alors qu'il soit impliqué dans une régulation épigénétique du même type que les ARN non-codant de grande taille décrit

Chapitre V : Discussion

jusqu'ici. Mais contrairement à ce qui a été décrit pour le gène Xist, B2 n'est pas responsable de l'extinction des gènes du chromosome dont il est issu, puisque l'on a l'expression du gène HEF1 simultanément. Il faut donc envisager un nouveau type de régulation. Nous supposons donc que B2 pourrait être impliqué dans une modification de la structure tertiaire de l'ADN rendant impossible la fixation de l'ADN polymérase et ainsi la réplication.

La surexpression du gène HEF1 va engendrer une surproduction de la protéine et impliquer une apparition de la forme p28^{HEF1} responsable du déclenchement de l'apoptose. Ceci s'appuie sur les travaux réalisés par Law et al. (2000), qui montrent que l'induction d'une surproduction de la protéine HEF1 chez les cellules MCF-7 entraîne l'apparition de p28^{HEF1} et une mort par apoptose.

Les différents mécanismes possibles pourraient être concomitant en intervenant à différents niveaux du cycle cellulaire et ainsi cibler les différentes populations de cellules : en phase de quiescence ou dans le cycle. En effet, on sait que la proportion des cellules dans le cycle va en augmentant au cours du développement du cancer bronchopulmonaire non à petites cellules. Un traitement capable de déclencher un arrêt de la prolifération de type cytotatique et une mort par apoptose, chez les différents types de population cellulaire serait donc particulièrement adapté à ce type de cancer.

Conclusion
perspectives

XIII. CONCLUSION, PERSPECTIVES

XIII.1 LE FUTUR DES MICROALGUES EN PHARMACOLOGIE

L'utilisation des microalgues est une réalité depuis de nombreuses années. C'est le secteur de l'aquaculture qui le premier a commencé à utiliser les microalgues et pour cela a mis en place des productions de masse. En effet, une dizaine d'espèce est utilisé actuellement dans l'élevage larvaire de mollusques ou de poisson. Mais ces dernières années, les recherches menées sur ces organismes, nous ont permis de mieux appréhender leur énorme potentiel biochimique. Leurs particularités biochimiques les plus marquées concernent les lipides, les polysaccharides, les pigments protéiques et caroténoïques, les enzymes et les substances bioactives. Ainsi, est apparu de nouveaux potentiels d'applications concernant les domaines de l'alimentation, la cosmétique, de la vie dans l'espace, de la production d'énergie renouvelable (hydrocarbures, hydrogènes ...) et surtout de la santé.

Le travail que nous avons réalisé lors de cette thèse était donc de confirmer, l'intérêt des microalgues dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Jusqu'ici ce sont principalement les cyanobactéries et les dinoflagellés qui ont fait l'objet d'une attention toute particulière (Shimizu, 2003; Skulberg, 2000), et qui ont d'ailleurs révélé de bonnes activités cytotoxiques. Ainsi une étude sur

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

près de 1 000 souches de cyanobactéries révèle une activité *in vitro* pour près de 12 % des extraits testés. Si parmi les différentes molécules isolées certaines s'avèrent être des outils pharmacologiques intéressants, aucune ne fait pourtant actuellement l'objet d'utilisation thérapeutique. C'est donc logiquement que nous nous sommes intéressé aux autres groupes de microalgues qui n'ont jusqu'ici que très faiblement été étudiés d'un point de vue pharmacologique. Ainsi, l'étude réalisée a révélé un potentiel plus qu'intéressant quant à la découverte de composés à activité antiproliférative sur lignée cellulaire cancéreuse (Moreau *et al.*, 2006). Les résultats obtenus nous laissent donc à penser que les microalgues feront partie des futurs organismes prépondérants dans la découverte de nouveaux médicaments d'origine naturelle. En effet, les microalgues semblent aujourd'hui réunir les différentes conditions pour leur utilisation en recherche pharmacologique. Elles sont d'évidentes productrices de molécules à potentiel bioactif, de plus les biotechnologies de production contrôlée semblent aujourd'hui, pour bon nombre d'espèces, suffisamment évoluées pour être en accord avec la production particulièrement sensible de molécules thérapeutiques. Il semble donc aujourd'hui particulièrement intéressant d'engager un screening de grande envergure sur un grand nombre d'espèces isolées et produites de façon contrôlé. Ce travail devra voir s'organiser une étroite collaboration entre les chimistes, pouvant prendre la responsabilité des extractions et des purifications, et les

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

pharmacologues qui grâce, aux résultats des tests réalisés devront intégralement diriger le travail de chimie.

Pour ce qui est des molécules identifiées que sont : la fucoxanthine, l'ergostérol et le peroxyergostérol. Il semble évident, que malgré les très bons résultats obtenus ici sur les lignées de cancer du poumon non à petites cellules et ceux obtenus sur d'autres types de cancer, un développement comme nouveau médicament sera impossible. En effet, les molécules étant connues, un développement par l'industrie pharmaceutique est difficilement envisageable. Ces découvertes laissent malgré tout envisager la possibilité d'isoler des molécules à activité anticancéreuse capables d'induire un arrêt de la prolifération cellulaire en agissant sur des cibles moléculaires spécifiques, comme c'est le cas pour la fucoxanthine.

Ainsi les futurs travaux devront porter sur différentes problématiques :
Poursuivre le screening sur toutes les espèces isolées et produites en laboratoire

Réaliser un travail d'isolation et d'identification des principes actifs présents dans les extraits déjà sélectionnés

Etudier en détail l'importance de l'état physiologique des microalgues dans la production de molécules bioactives.

XIII.2 A190 REpond AUX ATTENDES DES NOUVELLES THERAPIES CIBLEES

La caractérisation de l'activité de cette nouvelle molécule nous a permis de mettre en évidence son potentiel d'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, nous avons mis en évidence au cours de ce travail, la capacité de cette molécule à induire un arrêt de la prolifération des cellules en phase G1/G0, qui se poursuit par une mort de type apoptotique. Cet effet cytostatique, nous intéresse particulièrement du fait de sa spécificité et de sa non toxicité, ce qui est d'ailleurs très évident à la vue des résultats de l'étude *in vivo*. On sait, en effet aujourd'hui que l'un des principaux objectifs dans la découverte de nouveaux traitements anticancéreux, est d'améliorer fondamentalement la spécificité de ceux-ci. Ainsi, une molécule ne doit plus seulement présenter une bonne activité cytotoxique, mais doit cibler les mécanismes moléculaires particuliers impliqués dans la prolifération de la cellule cancéreuse, pour retenir l'attention du monde pharmaceutique. Depuis plusieurs années, l'amélioration de la connaissance de la biologie du cancer, a permis de mettre en évidence un certain nombre de cibles moléculaires pouvant être visées par les nouveaux traitements (Eckhardt, 2006; Gridelli *et al.*, 2004; Petros & Evans, 2004; Rosell *et al.*, 2004a; Toloza, 2005; Toloza & D'Amico, 2005).

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

Ainsi la molécule A190 semble parfaitement entrer dans les nouveaux critères de sélection des futurs médicaments anticancéreux. Les résultats nous montrent en effet, que l'activité cytostatique observée serait liée à une surexpression de deux nouvelles cibles moléculaires, que sont l'ARN non codant de grande taille B2 et le gène HEF1 largement impliqué dans différents processus de la vie cellulaire. Mais, bien que les différents résultats des études en RT-PCR quantitative et en Immunoprécipitation Western blot soient particulièrement probant, il semble clair que les mécanismes moléculaires en jeux restent encore à décrypter. Les différentes hypothèses développées devront faire l'objet de nouveaux travaux à plusieurs niveaux :

Au niveau de la régulation des ARN messenger des gènes HEF1 et B2 : Il sera important dans un premier temps d'affiner la visualisation de la cinétique d'expression de ces gènes, en réalisant des dosages d'ARN à des intervalles de temps plus court, pour essayer de mettre en évidence une possible régulation de HEF1 par B2.

Au niveau du rôle de l'ARN B2 : il faudra ici étudier les différentes relations possible entre l'ARN B2 et l'ADN génomique, et tenter de mettre en évidence sa possible influence sur la réplication de l'ADN ou sur l'expression du gène HEF1. Pour cela différents types de techniques pourront être utilisées. Il serait notamment intéressant de mettre au point une étude par la technique d'hybridation *in situ*. Ceci permettrait en effet de mettre en évidence les possibles liaisons entre

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

l'ARN B2 et l'ADN génomique. Une étude en utilisant les nouvelles techniques d'ARN interférant, pourrait permettre d'éteindre B2 et ainsi de comprendre son influence sur l'expression d'HEF1. A un autre niveau, une étude *in silico* pourrait aussi être réalisée sur la structure spatiale de l'ARN B2. En effet, La fonction d'un ARN non-codant est déterminée par sa conformation spatiale, c'est-à-dire sa structure. La structure d'un ARN est organisée en quatre niveaux hiérarchiques et est induite par le niveau de stabilité énergétique de la molécule. Ainsi, il existe aujourd'hui des algorithmes mathématiques capables de déduire la structure spatiale d'un ARN à partir de sa séquence. Ensuite, la comparaison avec des structures d'ARN aux fonctions connues, répertoriés dans des bases de données, nous permettrait d'établir une relation structure activité, et ainsi de diriger les travaux de biologie moléculaire.

Au niveau de l'induction de l'apoptose : Nous avons en effet montré lors d'expériences préliminaires que le traitement des cellules NSCLC-N6 et A549 par la molécule A190 se traduisait par l'apparition de corps apoptotiques caractéristiques colorés par l'acridine orange. On sait que la forme p28^{HEF1} de la protéine HEF1, induit l'apoptose en cas de surexpression du gène. Nous envisageons de poursuivre l'étude, par immunoprécipitation/western blot, de l'évolution des différentes formes de HEF1 au cours du traitement par A190. la forme p28^{HEF1} n'a pu être détecté pour l'instant, il faut peut

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

être envisager de réaliser une étude sur des cellules ayant subi un traitement plus long (>70h).

Au niveau de l'activité antitumorale. Les résultats obtenus lors de la première expérimentation animale, montrent un réel effet anti-tumoral de la molécule A190. L'absence d'effet dose, avec une activité identique de 50 à 150 mg/kg, indique que l'on a ici un plateau thérapeutique. Il serait donc intéressant par la suite de tester de nouvelles doses pour trouver la plus efficace. Une étude pourrait aussi être menée en injectant A190 par intraveineuse. Enfin, il serait intéressant de greffer les souris avec des cellules synchronisées, d'observer l'effet d'un traitement puis d'étudier l'induction des cibles moléculaires HEF1 et B2 *in vivo*.

Ce travail aura donc permis d'ouvrir de nouvelles voies quant aux sources de molécules bioactives à potentiel anticancéreux et quant aux nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans un arrêt spécifique de la prolifération cellulaire cancéreuse. Ainsi, il est raisonnable d'envisager la mise en place de nouveaux types de criblage, permettant une sélection plus efficace de molécules actives particulièrement spécifique de la pathologie cancéreuse et présentant une toxicité toujours moindre. La mise en place de ce type de projet, verra la poursuite des collaborations étroites entre les équipes de chimie des professeur V. Roussis et E. Fattorusso et notre équipe de pharmacologie. La réalité d'un travail commun particulièrement

Chapitre VI : Conclusion, Perspectives

contrôlé et cohérent permettra d'accélérer l'isolation et l'identification des nouveaux composés bioactifs. La poursuite du développement du projet d'étude de la molécule A190, devra impliquer la mise en place d'un partenariat avec le monde de l'industrie pharmaceutique, afin d'envisager l'atteinte des prochaines étapes que sont les tests cliniques.

Bibliographie

Bibliographie

A

Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281, 1322-1326.

Agarwal, S. & Rao, A.V. (2000). Carotenoids and chronic diseases. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17, 189-210.

Alam, J.J. (2003). Apoptosis: target for novel drugs. *Trends in Biotechnology*, 21, 479-483.

Albertano, P., Ciniglia, C., Pinto, G. & Pollio, A. (2000). The taxonomic position of Cyanidium, Cyanidioschyzon and Galdieria: An update. *Hydrobiologia*, 433, 137-143.

Alexandropoulos, K. & Baltimore, D. (1996). Coordinate activation of c-Src by SH3- and SH2-binding

Bibliographie

sites on a novel p130Cas-related protein, *Sin. Genes and Development*, 10, 1341-1355.

Ameisen, J.C., Idziorek, T., Billaut-Mulot, O., Loyens, M., Tissier, J.P., Potentier, A. & Ouiassi, A. (1995).

Apoptosis in an unicellular eucaryote (*trypanosoma cruzi*) : implication for the evolutionary origin and the role of programmed cell death in the control of cell proliferation. *Cell Death Difference*, 2, 285-300.

Apolinario, R.M., Van Der Valk, P., De Jong, J.S., Deville, W., Van Ark-Otte, J., Dingemans, A.C., Van Mourik, J.C., Postmus, P.E., Pinedo, H.M. & Giaccone, G. (1997).

Prognostic value of the expression of p53, bcl-2, and box oncoproteins, and neovascularization in patients with radically resected non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 2456-2466.

Arriagada, R., Bergman, B., Dunant, A., Le Chevalier, T., Pignon, J.P. & Vansteenkiste, J. (2004). Cisplatin-

Bibliographie

Based Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 350, 351-360.

Ashkenazi, A. & Dixit, V.M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.

Astier, A., Manié, S.N., Avraham, H., Freedman, A.S., Avraham, S., Fu, Y., Hirai, H., Law, S.F., Zhang, Y., Golemis, E.A., Druker, B.J. & Haghayeghi, N. (1997a). The related adhesion focal tyrosine kinase differentially phosphorylates p130(Cas) and the Cas-like protein, p105(HEF1). *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19719-19724.

Astier, A., Manié, S.N., Canty, T., Haghayghi, N., Salgia, R., Freedman, A.S., Law, S.F., Golemis, E.A. & Druker, B.J. (1997b). Association of the Cas-like molecule HEF1 with CrkL following integrin and antigen receptor signaling in human B-cells: Potential

Bibliographie

relevance to neoplastic lymphohematopoietic cells.

Leukemia and Lymphoma, 28, 65-72.

**Astier, A., Manié, S.N., Law, S.F., Canty, T.,
Haghighi, N., Druker, B.J., Salgia, R., Golemis, E.A. &
Freedman, A.S. (1997c).** Association of the Cas-like
molecule HEF1 with CrkL following integrin and
antigen receptor signaling in human B-cells: potential
relevance to neoplastic lymphohematopoietic cells.

Leukemia & Lymphoma, 28, 65-72.

Au, J.L.-S., Panchal, N., Li, D. & Gan, Y. (1997).

Apoptosis: A new Pharmacodynamic Endpoint.

Pharmaceutical Research, 14, 1659-1671.

B

**Bai, F., Matsui, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y.,
Ding, Y. & Sakai, T. (1998).** Promoter activation and
following induction of the p21/WAF1 gene by flavone is

Bibliographie

involved in G1 phase arrest in A549 lung adenocarcinoma cells. *FEBS Letters*, 437, 61-64.

Balick, M.J. & Cox, P.A. (1997). *Plants, People and Culture: The Science of Ethnobotany*. Scientific American Library: New York.

Balunas, M.J. & Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78, 431-441.

Bannerman, D.D., Sathyamoorthy, M. & Goldblum, S.E. (1998). Bacterial lipopolysaccharide disrupts endothelial monolayer integrity and survival signaling events through caspase cleavage of adherens junction proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 35371-35380.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116, 281-297.

Baselga, J., Rischin, D., Ranson, M., Calvert, H., Raymond, E., Kieback, D.G., Kaye, S.B., Gianni, L.,

Bibliographie

Harris, A., Bjork, T., Averbuch, S.D., Feyereislova, A., Swaisland, H., Rojo, F. & Albanell, J. (2002). Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 4292-4302.

Bates, S., Bonetta, L., MacAllan, D., Parry, D., Holder, A., Dickson, C. & Peters, G. (1994). CDK6 (PLSTIRE) and CDK4 (PSK-J3) are a distinct subset of the cyclin-dependent kinases that associate with cyclin D1. *Oncogene*, 9, 71-79.

Bennett, J.H. (1963). Random mating and sex linkage. *Journal of Theoretical Biology*, 4, 28-36.

Berger, R., Liaaen-Jensen, S., McAlister, V. & Guillard, R.R.L. (1977). Carotenoids of the Prymnesiophyceae

Bibliographie

(Haptophyceae). *Biochemical Sytematics and Ecology*, 5, 71-75.

Bergmann, W. & Burke, D.C. (1955). Contributions to the study of marin products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *Journal of Organic Chemistry*, 20, 1501-1507.

Berry, L.D. & Gould, K.L. (1997). Fission yeast dim1+ encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. *Journal of Cell Biology*, 137, 1337-1354.

Bessö, A., Nyberg, F. & Pershagen, G. (2003). Air pollution and lung cancer mortality in the vicinity of a nonferrous metal smelter in Sweden. *International Journal of Cancer*, 107, 448-452.

Bicknell, G.R. & Cohen, G.M. (1995). Cleavage of DNA to large kilobase pair fragments occurs in some forms of

Bibliographie

necrosis as well as apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207, 40-47.

Blaukat, A., Ivankovic-Dikic, I., Grönroos, E., Vuori, K., Dikic, I., Tokiwa, G. & Dolfi, F. (1999). Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 14893-14901.

Bloom, J. & Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in Cancer Biology*, 13, 41-47.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northcote, P.T. & Prinsep, M.R. (2003). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 20, 1-48.

Boudreau, N. & Bissell, M.J. (1998). Extracellular matrix signaling: Integration of form and function in normal

Bibliographie

and malignant cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 640-646.

Brenner, C., Peisach, D., Ringe, D., Petsko, G.A., Garrison, P., Gilmour, J. & Lowenstein, J.M. (1997). Crystal structures of hint demonstrate that histidine triad proteins are GalT-related nucleotide-binding proteins. *Nature Structural Biology*, 4, 231-238.

Brockdorff, N. (1998). The role of Xist in X-inactivation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8, 328-333.

Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S. & Rastan, S. (1992). The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 71, 515-526.

Brognard, J., Clark, A.S., Ni, Y. & Dennis, P.A. (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-

Bibliographie

small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation.

Cancer Research, 61, 3986-3997.

Brooks, K.R., To, K., Moore Joshi, M.B., Conlon, D.H., Herndon II, J.E., D'Amico, T.A., Harpole Jr, D.H., Smythe, W.R. & Daniel, T.M. (2003). Measurement of chemoresistance markers in patients with stage III non-small cell lung cancer: A novel approach for patient selection. *Annals of Thoracic Surgery*, 76, 187-193.

Brown, J.M. & Attardi, L.D. (2005). The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*, 5, 231-237.

Brown, M.R. (1991). The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 145, 79-99.

Bibliographie

Brownson, R.C., Alavanja, M.C.R., Caporaso, N., Berger, E. & Chang, J.C. (1997). Family history of cancer and risk of lung cancer in lifetime non-smokers and long-term ex-smokers. *International Journal of Epidemiology*, 26, 256-263.

Brownson, R.C., Figgs, L.W. & Caisley, L.E. (2002). Epidemiology of environmental tobacco smoke exposure. *Oncogene*, 21, 7341-7348.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. & Hannon, G.J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature*, 377, 552-557.

Bump, N.J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T. & Li, P. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269, 1885-1888.

Bibliographie

- Burbee, D.G., Forgacs, E., Zöchbauer-Mu?ller, S., Shivakumar, L., Fong, K., Gao, B., Randle, D., Kondo, M., Virmani, A., Bader, S., Sekido, Y., Latif, F., Milchgrub, S., Toyooka, S., Gazdar, A.F., Lerman, M.I., Zabarovsky, E., White, M. & Minna, J.D. (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 691-699.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. & Turner, C.** (1988). Focal adhesions: Transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annual Review of Cell Biology*, 4, 487-525.
- Butler, M.S.** (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153.

C

Bibliographie

Cai, D.W., Mukhopadhyay, T., Roth, J.A., Fujiwara, T. & Liu, Y. (1993). Stable expression of the wild-type p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. *Human Gene Therapy*, 4, 617-624.

Camerini, D., Walz, G., Loenen, W.A., Borst, J. & Seed, B. (1991). The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family *Journal of Immunology*, 147, 3165-3169.

Capon, R.J. (2001). Marine bioprospecting - Trawling for treasure and pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*, 633-645.

Carbonnelle, D., Jacquot, C., Lanco, X., Le Dez, G., Tomasoni, C., Briand, G., Tsotinis, A., Calogeropoulou, T. & Roussakis, C. (2001). Up-regulation of a novel mRNA (NY-CO-1) involved in the methyl 4-methoxy-3-(3-methyl-2-butenoyl) benzoate (VT1)-induced

Bibliographie

proliferation arrest of a non-small-cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6). *International Journal of Cancer*, 92, 388-397.

Carte, B.K. (1993). Marine natural products as a source of novel pharmacological agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 4, 275-279.

Cary, L.A., Han, D.C., Guan, J.-L., Polte, T.R. & Hanks, S.K. (1998). Identification of p130(Cas) as a mediator of focal adhesion kinase- promoted cell migration. *Journal of Cell Biology*, 140, 211-221.

Cavasotto, C.N., Ortiz, M.A., Abagyan, R.A. & Piedrafita, F.J. (2006). In silico identification of novel EGFR inhibitors with antiproliferative activity against cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 1969-1974.

Bibliographie

Chang, S.C., Tucker, T., Thorogood, N.P. & Brown, C.J.

(2006). Mechanisms of X-chromosome inactivation.

Frontiers in Bioscience, 11, 852-866.

Chaudhary, P.M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A.,

Murray, J. & Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new

member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-

dependent apoptosis and activate the NF-kappaB

pathway. *Immunity*, 7, 821-830.

Cheresh, D.A., Leng, J. & Klemke, R.L. (1999).

Regulation of cell contraction and membrane ruffling by

distinct signals in migratory cells. *Journal of Cell Biology*,

146, 1107-1116.

Chiang, P.W., Song, W.J., Wu, K.Y., Korenberg, J.R.,

Fogel, E.J., Van Keuren, M.L., Lashkari, D. & Kurnit,

D.M. (1996). Use of a fluorescent-PCR reaction to detect

genomic sequence copy number and transcriptional

abundance. *Genome Research*, 6, 1013-1026.

Bibliographie

Chin, Y.-W., Balunas, M.J., Chai, H.B. & Kinghorn, A.D. (2006). Drug discovery from natural sources. *AAPS Journal*, 8, E239-E253.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M. & Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81, 505-512.

Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Yu, G.L., Lyons, R.H., Garg, M., Duan, D.R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J. & Dixit, V.M. (1996). Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science*, 274, 990-992.

Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156-159.

Bibliographie

Chung, G.T.Y., Sundaresan, V., Hasleton, P., Rudd, R., Taylor, R. & Rabbitts, P.H. (1995). Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene*, 11, 2591-2598.

Colin Garner, R. (1998). The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402, 67-75.

Coll, J., Vandenbunder, B. & Stehelin, D. (1992). Oncogens and antioncogens. *Gynecologie*, 43, 344-349.

Cooper, M.S. & Schliwa, M. (1986). Motility of cultured fish epidermal cells in the presence and absence of direct current electric fields. *Journal of Cell Biology*, 102, 1384-1399.

Coqueret, O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biology*, 13, 65-70.

Bibliographie

Cornillon, J., Campos, L. & Guyotat, D. (2003). Focal adhesion kinase (FAK), une protéine aux fonctions multiples. *Médecine sciences*, 19, 743-752.

Cragg, G.M., Newman, D.J. & Weiss, R.B. (1997). Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. *Semin Oncol*, 24, 156-63.

Croce, C.M., Sozzi, G. & Huebner, K. (1999). Role of FHIT in human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 17, 1618-1624.

Crompton, M. (2000). Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 12, 414-419.

Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M. & Lord, J.M. (2000).

Bibliographie

Serine/threonine protein kinases and apoptosis.

Experimental Cell Research, 256, 34-41.

Crouch, D.H., Fincham, V.J. & Frame, M.C. (1996).

Targeted proteolysis of the focal adhesion kinase pp125(FAK) during c-Myc-induced apoptosis is suppressed by integrin signalling. *Oncogene*, 12, 2689-2696.

Crowell, J.A. & Steele, V.E. (2003). AKT and the phosphatidylinositol 3-kinase/ AKT pathway: Important molecular targets for lung cancer prevention and treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 252-253.

D

D'Amico, T.A. (2004). Angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 13-18.

Bibliographie

Dammann, R., Li, C., Yoon, J.H., Chin, P.L., Bates, S. & Pfeifer, G.P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics*, 25, 315-319.

Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Klein, B., Zhuang, S.M., Van Der Eb, A.J., Noteborn, M.H.M., Fischer, D.F., Backendorf, C., Grimbergen, J.M., Quax, P.H.A. & Falkenburg, J.H.F. (1997). Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5843-5847.

Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Van Der Eb, A.J. & Noteborn, M.H.M. (1999). BCL-2 stimulates apoptin®-induced apoptosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 457, 245-249.

Danen-Van Oorschot, A.A.A.M., Van Der Eb, A.J. & Noteborn, M.H.M. (2000). The chicken anemia virus-

Bibliographie

derived protein Apoptin requires activation of caspases for induction of apoptosis in human tumor cells. *Journal of Virology*, 74, 7072-7078.

Daranas, A.H., Norte, M. & Fernandez, J.J. (2001). Toxic marine microalgae. *Toxicon*, 39, 1101-1132.

Darbon, J.M., Devault, A., Taviaux, S., Fesquet, D., Martinez, A.M., Galas, S., Cavadore, J.C., Doree, M. & Blanchard, J.M. (1994). Cloning, expression and subcellular localization of the human homolog of p40(MO15) catalytic subunit of cdk-activating kinase. *Oncogene*, 9, 3127-3138.

Das, S.K., Hashimoto, T., Shimizu, K., Kanazawa, K., Yoshida, T., Sakai, T., Sowa, Y. & Komoto, A. (2005). Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1726, 328-335.

Bibliographie

De Bondt, H.L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H.D., Morgan, D.O. & Kim, S.H. (1993). Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 363, 595-602.

Debs, R.J., Fuchs, H.J., Philip, R., Brunette, E.N., Duzgunes, N., Shellito, J.E., Liggitt, D. & Patton, J.R. (1990). Immunomodulatory and toxic effects of free and liposome-encapsulated tumor necrosis factor in rats. *Cancer Research*, 50, 375-380.

Delaval, K. & Feil, R. (2004). Epigenetic regulation of mammalian genomic imprinting. *Current Opinion in Genetics and Development*, 14, 188-195.

Demetrick, D.J., Zhang, H. & Beach, D.H. (1994). Chromosomal mapping of human CDK2, CDK4, and CDK5 cell cycle kinase genes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 66, 72-74.

Bibliographie

Demmig-Adams, B. & Adams, I., William W. (1996).

The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 1, 21-26.

Deng, C., Zhang, P., Herper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. (1995).

Mice lacking p21(CIP1/WAF1) undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, 82, 675-684.

Denissenko, M.F., Pfeifer, G.P., Pao, A. & Tang, M.S.

(1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274, 430-432.

Denlinger, C.E., Rundall, B.K. & Jones, D.R. (2004).

Modulation of antiapoptotic cell signaling pathways in non-small cell lung cancer: The role of NF-kB. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 28-39.

Bibliographie

Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsedale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO Journal*, 17, 2215-2223.

Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388, 300-304.

Dolfi, F., Garcia-Guzman, M., Ojaniemi, M., Nakamura, H., Vuori, K. & Matsuda, M. (1998). The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 15394-15399.

Doll, R. & Peto, R. (1978). Cigarette smoking and bronchial carcinoma: dose and time relationships among

Bibliographie

regular smokers and lifelong non smokers *Journal of Epidemiological Community Health*, 32, 303-313.

Doll, R., Peto, R., Boreham, J. & Sutherland, I. (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *British Journal of Cancer*, 92, 426-9.

Doll, R., Peto, R., Wheatley, K., Gray, R. & Sutherland, I. (1994). Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *British Medical Journal*, 309, 901-911.

Dong, Z., Saikumar, P., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A. (1997). Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *American Journal of Pathology*, 151, 1205-1213.

Bibliographie

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.

Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M.A., Franza Jr, B.R., Karsenti, E. & Draetta, G. (1991). Cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO Journal*, 10, 3311-3319.

Dunphy, W.G. & Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell*, 67, 189-196.

Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B. & Stein, H. (1992). Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* 68.

Dy, G.K. & Adjei, A.A. (2002). Novel targets for lung cancer therapy: Part II. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 3016-3028.

E

Eckhardt, S. (2006). Molecular targeted therapy: A strategy of disillusion or optimism? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 147, 108-113.

El-Agamey, A., Lowe, G.M., McGarvey, D.J., Mortensen, A., Phillip, D.M., Truscott, T.G. & Young, A.J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430, 37-48.

El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825.

Bibliographie

Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science*, 274, 1664-1672.

Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, 375, 78-81.

Endicott, J.A., Nurse, P. & Johnson, L.N. (1994). Mutational analysis supports a structural model for the cell cycle protein kinase p34. *Protein Engineering*, 7, 243-253.

Evan, G.I., Brown, L., Whyte, M. & Harrington, E. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 7, 825-834.

F

Fashena, S.J., Einarson, M.B., O'Neill, G.M., Patriotis, C. & Golemis, E.A. (2002). Dissection of HEF1-

Bibliographie

dependent functions in motility and transcriptional regulation. *Journal of Cell Science*, 115, 99-111.

Faulkner, D.J. (1991). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 8, 97-147.

Faulkner, D.J. (2002). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 19, 1-48.

Fenical, W. (1997). New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends Biotechnol*, 15, 339-41.

Fenical, W. & Jensen, P.R. (1993). Marine Microorganisms : A New Biomedical Resource. In *Marine Biotechnology : Pharmaceutical and Bioactive Nature Products*, Attaway, D.H. & Zaborsky, O.R. (eds), Vol. 1. pp. 419-450. Plenum Press: New York and London.

Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*, 5, 876-885.

Bibliographie

Field, R.W. (2001). A review of residential radon case-control epidemiologic studies performed in the United States. *Review of Environmental Health*, 16, 151-167.

Fincham, V.J., Frame, M.C., James, M. & Winder, S.J. (2000). Active ERK/MAP kinase is targeted to newly forming cell-matrix adhesions by integrin engagement and v-Src. *EMBO Journal*, 19, 2911-2923.

Fisher, R.P. & Morgan, D.O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78, 713-724.

Florin, I., Rutberg, L., Curvall, M. & Enzell, C.R. (1980). Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test. *Toxicology*, 15, 219-232.

Bibliographie

- Foster, B.A., Coffey, H.A., Morin, M.J. & Rastinejad, F.** (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science*, 286, 2507-2510.
- Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L. & Audus, K.L.** (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental Cell Research*, 243, 359-66.
- Frisch, S.M. & Francis, H.** (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 124, 619-626.
- Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E. & Chan-Hui, P.Y.** (1996). Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *Journal of Cell Biology*, 134, 793-799.
- Frosina, G.** (2000). Overexpression of enzymes that repair endogenous damage to DNA. *European Journal of Biochemistry*, 267, 2135-2149.

Bibliographie

Fujiwara, T., Mukhopadhyay, T., Zhang, W.W., Roth, J.A., Grimm, E.A. & Owen-Schaub, L.B. (1994).

Induction of chemosensitivity in human lung cancer cells in vivo by adenovirus-mediated transfer of the wild-type p53 gene. *Cancer Research*, 54, 2287-2291.

Furuno, M., Pang, K.C., Ninomiya, N., Fukuda, S., Frith, M.C., Bult, C., Kai, C., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Mattick, J.S. & Suzuki, H. (2006).

Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 2, 537-553.

G

Garcia de Palazzo, I.E., Adams, G.P., Sundareshan, P., Wong, A.J., Testa, J.R., Bigner, D.D. & Weiner, L.M.

(1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research*, 53, 3217-3220.

Bibliographie

Ghobrial, I.M., Witzig, T.E. & Adjei, A.A. (2005).

Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Ca-A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 178-194.

Giaccone, G., Herbst, R.S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., Natale, R.B., Schiller, J.H., Von Pawel, J., Pluzanska, A., Gatzemeier, U., Grous, J., Ochs, J.S., Averbuch, S.D., Wolf, M.K., Rennie, P., Fandi, A. & Johnson, D.H. (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial - INTACT 1. *Journal of Clinical Oncology*, 22, 777-784.

Giaccone, G., Johnson, D.H. & Manegold, C. (2002). A phase III clinical trial of ZD1839 ('Iressa') in combination with gemcitabine and cisplatin in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer (INTACT 1). *Annals in Oncology*, 13, 2-3.

Bibliographie

Giancotti, F.G. & Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science*, 285, 1028-1032.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. & Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institut*, 51, 1417-23.

Gibson, U.E.M., Heid, C.A. & Williams, P.M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research*, 6, 995-1001.

Glading, A., Chang, P., Wells, A. & Lauffenburger, D.A. (2000). Epidermal growth factor receptor activation of calpain is required for fibroblast motility and occurs via an ERK/MAP kinase signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 2390-2398.

Bibliographie

Green, D.R. & Amarante-Mendes, G.P. (1998). The point of no return: mitochondria, caspases, and the commitment to cell death. *Results and problems in cell differentiation*, 24, 45-61.

Green, D.R. & Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.

Gridelli, C., Maione, P., Rossi, A., Massarelli, E., Herbst, R.S., Onn, A. & Ciardiello, F. (2004). Potential role of molecularly targeted therapy in the management of advanced nonsmall cell lung carcinoma in the elderly. *Cancer*, 101, 1733-1744.

Gross, W., Heilman, I., Lenze, D. & Schnarrenberger, C. (2001). Biogeography of the Cyanidiacea based on 18 S ribosomal RNA sequence data. *European Journal of Phycology*, 36, 275-280.

Gross, W., Küver, Tischendorf, Biouchaala & Bosch. (1998). Cryptoendolithic growth of the red alga

Bibliographie

Galdieria sulphuraria in volcanic areas. *European Journal of Phycology*, 33, 25-31.

Gross, W. & Oesterhelt, C. (1999). Ecophysiological studies on the red alga *Galdieria sulphuraria* isolated from Southwest Iceland. *Plant Biology*, 1, 694-700.

Gross, W. & Schnarrenberger, C. (1995). Hétérotrophic growth of two strains of the acido-thermophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. *Plant Cell Physiol.*, 36, 633-638.

Gullo, V.P., McAlpine, J., Lam, K.S., Baker, D. & Petersen, F. (2006). Drug discovery from natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 523-531.

Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.

H

Hackshaw, A.K., Law, M.R. & Wald, N.J. (1997). The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *British Medical Journal*, 315, 980-988.

Hall, J. & Angele, S. (1999). Radiation, DNA damage and cancer. *Molecular Medecin Today*, 5, 157-164.

Hammond, E.C., Selikoff, I.J. & Seidman, H. (1979). Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Annals of New York Academic Science*, 330, 473-490.

Han, D.K., Chaudhary, P.M., Wright, M.E., Friedman, C., Trask, B.J., Riedel, R.T., Baskin, D.G., Schwartz, S.M. & Hood, L. (1997). MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *PNAS*, 94, 11333-11338.

Bibliographie

Harbour, J.W., Lai, S.L., Whang-Peng, J., Gazdar, A.F., Minna, J.D. & Kaye, F.J. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science*, 241, 353-357.

Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell*, 75, 805-816.

Harris, H., Miller, O.J., Klein, G., Worst, P. & Tachibana, T. (1969). Supression of the malignancy by cell fusion. *Nature*, 223, 363-368.

Harte, M.T., Hildebrand, J.D., Burnham, M.R., Bouton, A.H. & Parsons, J.T. (1996). P130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13649-13655.

Bibliographie

Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5, 294-300.

Hatakeyama, M., Brill, J.A., Fink, G.R. & Weinberg, R.A. (1994). Collaboration of G1 cyclins in the functional inactivation of the retinoblastoma protein. *Genes and Development*, 8, 1759-1771.

Heard, E., Clerc, P. & Avner, P. (1997). X-chromosome inactivation in mammals. *Annual Review of Genetics*, 31, 571-610.

Hecht, S.S. (2002a). Cigarette smoking and lung cancer: Chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncology*, 3, 461-469.

Hecht, S.S. (2002b). Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 39, 119-126.

Bibliographie

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M.
(1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6,
986-994.

Heinrich, M. & Gibbons, S. (2001). Ethnopharmacology
in drug discovery: An analysis of its role and potential
contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53,
425-432.

Henkart, P.A. (1996). ICE family proteases: mediators of
all apoptotic cell death? *Immunity*, 4, 195-201.

Herbst, R.S. (2003). Dose-comparative monotherapy
trials of ZD1839 in previously treated non-small cell
lung cancer patients. *Seminars in Oncology*, 30, 30-38.

Herzing, L.B., Romer, J.T., Horn, J.M. & Ashworth, A.
(1997). Xist has properties of the X-chromosome
inactivation centre. *Nature*, 386, 272-5.

Bibliographie

Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Kroemer, G. & Geuskens, M. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15, 1573-1581.

Hiriyama, T. (1981). Passive smoking and lung cancer. *British Medical Journal*, 282, 1394.

Hix, L.M., Lockwood, S.F. & Bertram, J.S. (2004). Bioactive carotenoids: Potent antioxidants and regulators of gene expression. *Redox Report*, 9, 181-191.

Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A.F., Piatyszek, M.A. & Shay, J.W. (1995). Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 895-902.

Bibliographie

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C.C. (1991). p53 Mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.

Hood, J.D. & Cheres, D.A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration *Nature Reviews Cancer*, 2, 91-100.

Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T. & Miyashita, K. (2004). Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR[gamma] ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1675, 113-119.

Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Takahashi, K., Kohno, H., Odashima, S. & Kawabata, J. (1999). Apoptosis-Inducing Effect of Fucoxanthin on Human Leukemia Cell Line HL-60. *Food Science and Technology Research*, 5, 243-246.

Bibliographie

Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. & Goeddel, D.V. (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, 84, 299-308.

Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D.V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell*, 81, 495-504.

Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. & Dixit, V.M. (1997). I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 17255-17257.

Hungerford, J.E., Compton, M.T., Matter, M.L., Hoffstrom, B.G. & Otey, C.A. (1996). Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 135, 1383-1390.

Bibliographie

Hunter, A.J. & Shimizu, Y. (1997). Integrin-Mediated Tyrosine Phosphorylation in Human T Cells: Characterization of Crk- and Fyn-Associated Substrates (pp105, pp115, and Human Enhancer of Filamentation-1) and Integrin-Dependent Activation of p59fyn1. *Journal of Immunology*, 159, 4806-4814.

I

Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M. & Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377, 539-44.

Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. & Nunez, G. (1997). CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis *PNAS*, 94, 10717-10722.

Bibliographie

Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. & Tschoopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195.

Ishii, H., Dumon, K.R., Vecchione, A., Fong, L.Y.Y., Baffa, R., Huebner, K. & Croce, C.M. (2001). Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene: Review of the preclinical studies. *Journal of the American Medical Association*, 286, 2441-2449.

Ishino, M., Ohba, T., Sasaki, H. & Sasaki, T. (1995). Molecular cloning of a cDNA encoding a phosphoprotein, Efs, which contains a Src homology 3 domain and associates with Fyn. *Oncogene*, 11, 2331-8.

Itoh, N., Mizushima, S.I., Seto, Y., Nagata, S., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Sameshima, M. & Hase, A. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA

for human cell surface antigen fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243.

J

Jacquot, C. (2001). Recherche d'une activité anti-oncogénique (gènes dlés p53/p21 et nouveaux gènes) dans un modèle cellulaire de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules (NSCLC-N6) préalablement induit en différenciation terminale atypique. In *Faculté de Pharmacie* pp. 254. Nantes

Jacquot, C., Carbonnelle, D., Tomasoni, C., Papaconstadinou, A. & Roussakis, C. (2004). Identification of a novel putative noncoding RNA involved in proliferation arrest of a non-small-cell lung carcinoma cell line treated with an original chemical substance, methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1). *Internationale Journal of Oncology*, 25, 519-527.

Bibliographie

**Jacquot, C., Moreau, D., Tomasoni, C., Juge, M.,
Coiffard, L., Roussis, V. & Roussakis, C. (2003).**

Proliferation arrest in G1 phase of a non-small cell lung cancer cell line (NSCLC-N6) treated by an original compound methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1) independently of the p53/p21 cascade.

Internationale Journal of Oncology, 23, 495-501.

Javelaud, D., Wietzerbin, J., Besançon, F. & Delattre, O.

(2000). Induction of p21(Waf1/Cip1) by TNF α requires NF- κ B activity and antagonizes apoptosis in Ewing tumor cells. *Oncogene*, 19, 61-68.

**Jeffrey, P.D., Russo, A.A., Polyak, K., Gibbs, E.,
Hurwitz, J., Massague, J. & Pavletich, N.P. (1995).**

Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature*, 376, 313-320.

Bibliographie

Jensen, P.R., Mincer, T.J. & Fenical, W. (2003). The true potential of the marine microorganism. *Current Drug Discovery*, 17-19.

Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-80.

Jeremias, I., Reinhardt, D. & Debatin, K.M. (2001). Dysregulation of apoptosis as the basis of disease [Fehlregulation von apoptose als grundlage für krankheit]. *HNO*, 49, 673-683.

Ji, J., Fang, B., Yen, N., Roth, J.A., Fong, K. & Minna, J.D. (1999). Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene overexpression. *Cancer Research*, 59, 3333-3339.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C.R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M. & Chao, M. (1986).

Bibliographie

Expression and structure of the human NGF receptor.

Cell, 47, 545-554.

Johnson, D.H., Herbst, R. & Giaccone, G. (2002).

ZD1839 ('Iressa') in combination with paclitaxel and carboplatin in chemotherapy-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): Results from a phase III clinical trial (INTACT II). *Annals of Oncology*, 13, 127-128.

Johnson, L.N. & O'Reilly, M. (1996). Control by phosphorylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 762-769.

Jones, W.P., Chin, Y.W. & Kinghorn, A.D. (2006). The role of pharmacognosy in modern medicine and pharmacy. *Current Drug Targets*, 7, 247-264.

K

Bibliographie

Kamijo, T., Weber, J.D., Sherr, C.J., Zindy, F., Roussel, M.F. & Zambetti, G. (1998). Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8292-8297.

Kanner, S., Reynolds, A., Vines, R. & Parsons, J. (1990). Monoclonal Antibodies to Individual Tyrosine-Phosphorylated Protein Substrates of Oncogene-Encoded Tyrosine Kinases. *PNAS*, 87, 3328-3332.

Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. & Green, D.R. (1998). DNA damaging agents induce expression of Fas ligand and subsequent apoptosis in T lymphocytes via the activation of NF-kappa B and AP-1. *Molecular Cell*, 1, 543-551.

Kass, G.E., Eriksson, J.E., Weis, M., Orrenius, S. & Chow, S.C. (1996). Chromatin condensation during apoptosis requires ATP. *Biochemical Journal*, 318, 749-752.

Bibliographie

Katircioglu, H., Akin, B.S. & Atici, T. (2004). Microalgal toxin(s): Characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology*, 3, 667-674.

Katsouyanni, K. & Pershagen, G. (1997). Ambient air pollution exposure and cancer. *Cancer Causes and Control*, 8, 284-291.

Kay, G.F. (1998). Xist and X chromosome inactivation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140, 71-76.

Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 74, 151-170.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, 239-257.

Bibliographie

Khuder, S.A. & Mutgi, A.B. (2001). Effect of smoking cessation on major histologic types of lung cancer. *Chest*, 120, 1577-1583.

Kim, E.S., Mauer, A.M. & Tran, H.T. (2003). A phase II study of cetuximab, an epidermal growth factor receptor (EGFR) blocking antibody, in combination with docetaxel in chemotherapy refractory/resistant patients with advanced non-small cell lung cancer: Final report. *Proceedings of the America Society of Clinical Oncology*, 22, 642.

Kim, R., Emi, M. & Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 57, 545-553.

Kim, S.K., Lee, J.S., Hong, W.K., Mao, L., Ro, J.Y., Kemp, B.L., Kwon, T.J., Fong, K.M., Sekido, Y. & Minna, J.D. (1997). Identification of three distinct tumor

Bibliographie

suppressor loci on the short arm of chromosome 9 in small cell lung cancer. *Cancer Research*, 57, 400-403.

Kimura, Y. (2005). New anticancer agents: In vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants. *In Vivo*, 19, 37-60.

King, K.L. & Cidlowski, J.A. (1995). Cell cycle and apoptosis: Common pathways to life and death. *Journal of Cell Biochemistry*, 58, 175-180.

Kiokias, S. & Gordon, M.H. (2004). Antioxidant properties of carotenoids in vitro and in vivo. *Food Reviews International*, 20, 99-121.

Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. & Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated

Bibliographie

proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO Journal*, 14, 5579-5588.

Kitson, J., Raven, T., Jiang, Y.P., Goeddel, D.V., Giles, K.M., Pun, K.T., Grinham, C.J., Brown, R. & Farrow, S.N. (1996). A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature*, 384, 372-375.

Klemke, R.L., Giannini, A.L., De Lanerolle, P., Cheresh, D.A., Cai, S. & Gallagher, P.J. (1997). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Cell Biology*, 137, 481-492.

Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Cheresh, D.A. & Vuori, K. (1998). CAS/Crk coupling serves as a 'molecular switch' for induction of cell migration. *Journal of Cell Biology*, 140, 961-972.

Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. (1997). The release of cytochrome c

Bibliographie

from mitochondria: A primary site for Bcl- 2 regulation of apoptosis. *Science*, 275, 1132-1136.

Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. (1991a).

Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase.

Science, 253, 407-414.

Knighton, D.R., Zheng, J., Ten Eyck, L.F., Xuong, N., Taylor, S.S. & Sowadski, J.M. (1991b). Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase.

Science, 253, 414-420.

Kobayashi, H., Stewart, E., Poon, R., Adamczewski, J.P., Gannon, J. & Hunt, T. (1992). Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34(cdc2) and p32(cdk2) protein kinase subunits. *Molecular Biology of the Cell*, 3, 1279-1294.

Bibliographie

Koehn, F.E. & Carter, G.T. (2005). The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 206-220.

Konishi, I., Hosokawa, M., Sashima, T., Kobayashi, H. & Miyashita, K. (2006). Halocynthiaxanthin and fucoxanthinol isolated from *Halocynthia roretzi* induce apoptosis in human leukemia, breast and colon cancer cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142, 53-59.

Kotake-Nara, E., Asai, A. & Nagao, A. (2005a). Neoxanthin and fucoxanthin induce apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, 220, 75-84.

Kotake-Nara, E., Kushiro, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K. & Nagao, A. (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *Journal of Nutrition*, 131, 3303-3306.

Bibliographie

- Kotake-Nara, E., Sugawara, T. & Nagao, A. (2005b).** Antiproliferative effect of neoxanthin and fucoxanthin on cultured cells. *Fisheries Science*, 71, 459-461.
- Krinsky, N.I. & Johnson, E.J. (2005).** Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Krozely, P. (2004).** Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: evolving role in the treatment of solid tumors. *Clinical journal of oncology nursing*, 8, 163-168.
- Kubbutat, M.H.G., Vousden, K.H. & Jones, S.N. (1997).** Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387, 299-303.
- Kuzmin, I., Gillespie, J.W., Protopopov, A., Geil, L., Dreijerink, K., Yang, Y., Vocke, C.D., Duh, F.M., Zabarovsky, E., Minna, J.D., Rhim, J.S., Emmert-Buck,

Bibliographie

M.R., Linehan, W.M. & Lerman, M.I. (2002). The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer Research*, 62, 3498-3502.

Kwon, B.S. & Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. 86, 1963-7. . *PNAS*, 86, 1963-1967.

L

Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369.

Law, S.F., Estojak, J., Golemis, E.A., Wang, B., Mysliwiec, T. & Kruh, G. (1996). Human enhancer of filamentation 1, a novel p130cas-like docking protein, associates with focal adhesion kinase and induces

Bibliographie

pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molecular and Cellular Biology, 16, 3327-3337.

Law, S.F., O'Neill, G.M., Fashena, S.J., Einarson, M.B. & Golemis, E.A. (2000). The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 5184-95.

Law, S.F., Zhang, Y.-Z., Fashena, S.J., Toby, G., Estojak, J. & Golemis, E.A. (1999). Dimerization of the docking/adaptor protein HEF1 via a carboxy-terminal helix-loop-helix domain. *Experimental Cell Research*, 252, 224-235.

Law, S.F., Zhang, Y.Z., Klein-Szanto, A.J. & Golemis, E.A. (1998). Cell cycle-regulated processing of HEF1 to multiple protein forms differentially targeted to multiple subcellular compartments. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 3540-3551.

Bibliographie

Lazebnik, Y.A., Cole, S., Cooke, C.A., Nelson, W.G. & Earnshaw, W.C. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 123, 7-22.

Lee, J.T., Strauss, W.M., Dausman, J.A. & Jaenisch, R. (1996). A 450 kb transgene displays properties of the mammalian X-inactivation center. *Cell*, 86, 83-94.

Lees, E., Faha, B., Dulic, V., Reed, S.I. & Harlow, E. (1992). Cyclin E/cdk2 and cyclin A/cdk2 kinases associate with p107 and E2F in a temporally distinct manner. *Genes and Development*, 6, 1874-1885.

Lees, E.M. & Harlow, E. (1993). Sequences within the conserved cyclin box of human cyclin A are sufficient for binding to and activation of cdc2 kinase. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 1194-1201.

Bibliographie

Leslie, W.T. & Bonomi, P.D. (2004). Novel treatments in non-small cell lung cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 18, 245-267.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88, 323-331.

Levkau, B., Ross, R., Raines, E.W., Herren, B. & Koyama, H. (1998). Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125(FAK) and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 187, 579-586.

Li, X. & Hemminki, K. (2003). Familial and second lung cancers: A nation-wide epidemiologic study from Sweden. *Lung Cancer*, 39, 255-263.

Liang, P. & Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-71.

Bibliographie

Lin, H.I., Lee, Y.J., Chen, B.F., Tsai, M.C., Lu, J.L., Chou, C.J. & Jow, G.M. (2005). Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters*, 230, 248-259.

Lindahl, T. & Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 11, 3610-3618.

Liu, M., Chen, J., Lee, S., Yaremko, B., Lipari, P., Malkowski, M., Ferrari, E., Nielsen, L., Prioli, N., Dell, J., Wang, L., Catino, J.J., Kirschmeier, P., Bishop, W.R., Taveras, A.G., Doll, R.J., Njoroge, F.G., Mallams, A.K., Remiszewski, S., Girjavallabhan, V.M., Bryant, M.S., Korfmacher, W.A., Nomeir, A.A., Lin, C.C., Sinha, D. & Syed, J. (1998). Antitumor activity of SCH 66336, an orally bioavailable tricyclic inhibitor of farnesyl protein transferase, in human tumor xenograft models and wap-ras transgenic mice. *Cancer Research*, 58, 4947-4956.

Bibliographie

Livingstone, L.R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T. & Tlsty, T.D. (1992). Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell*, 70, 923-935.

Loda, M., Cukor, B., Fiorentino, M., Tam, S.W., Pagano, M., Lavin, P., Draetta, G.F. & Milburn Jessup, J. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine*, 3, 231-234.

Loeffler, M. & Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: Certainties and incognita. *Experimental Cell Research*, 256, 19-26.

Loetscher, H., Pan, Y.C., Lahm, H.W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H. & Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 61, 351-359.

Bibliographie

Longthorne, V.L. & Williams, G.T. (1997). Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *EMBO Journal*, 16, 3805-3812.

Los, M., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. (1999). The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: Lessons from knockout mice. *Immunity*, 10, 629-639.

Luo, J., Manning, B.D. & Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: Rationale and promise. *Cancer Cell*, 4, 257-262.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., Louis, D.N., Christiani, D.C., Settleman, J. & Haber, D.A. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung

Bibliographie

Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350, 2129-2139.

M

Maarouf, M., de Kouchkovsky, Y., Brown, S., Petit, P.X. & Robert-Gero, M. (1997). In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232, 339-348.

MacCorkle, R.A., Freeman, K.W. & Spencer, D.M. (1998). Synthetic activation of caspases: Artificial death switches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 3655-3660.

Makin, G. & Dive, C. (2001). Apoptosis and cancer chemotherapy. *Trends in Cell Biology*, 11, S22-S26.

Mallett, S., Fossum, S. & Barclay, A.N. (1990). Characterization of the MRC OX40 antigen of activated

Bibliographie

CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *EMBO Journal*, 9, 1063-1068.

Manié, S.N., Astier, A., Canty, T., Avraham, H., Haghayeghi, N., Sattler, M., Salgia, R., Freedman, A.S., Beck, A.R.P., Law, S.F., Golemis, E.A., Hirai, H., Druker, B.J. & Griffin, J.D. (1997). Involvement of p130(Cas) and p105(HEF1), a novel Cas-like docking protein, in a cytoskeleton-dependent signaling pathway initiated by ligation of integrin or antigen receptor on human B cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 4230-4236.

Mann, J. (2002). Natural products in cancer chemotherapy: Past, present and future. *Nature Reviews Cancer*, 2, 143-148.

Mao, L., Lee, J.S., Kurie, J.M., Fan, Y.H., Lippman, S.M., Broxson, A., Yu, R., Khuri, F.R., Hong, W.K., Lee, J.J., Ro, J.Y., Kemp, B.L., Morice, R.C., Walsh, G.L. & Hittelman, W.N. (1997). Clonal genetic alterations in the lungs of

Bibliographie

current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 857-862.

Marchetti, P., Castedo, M., Susin, S.A., Zamzami, N., Hirsch, T., Macho, A., Haeffner, A., Hirsch, F., Kroemer, G. & Geuskens, M. (1996). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 1155-1160.

Marshall, C.J. (1994). Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature*, 367, 686.

Martinou, J.C., Desagher, S. & Antonsson, B. (2000). Cytochrome c release from mitochondria: All or nothing. *Nature Cell Biology*, 2, E41-E43.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Kroemer, G., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z.H. & Reed, J.C. (1998). The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by

Bibliographie

caspases and Bcl-2-related proteins. *Journal of Experimental Medicine*, 187, 1261-1271.

Maslyar, D.J., Jahan, T.M. & Jablons, D.M. (2004).
Mechanisms of and potential treatment strategies for metastatic disease in non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 40-50.

Matsumoto, T., Yokote, K., Tamura, K., Takemoto, M., Saito, Y., Mori, S. & Ueno, H. (1999). Platelet-derived growth factor activates p38 mitogen-activated protein kinase through a Ras-dependent pathway that is important for actin reorganization and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 13954-13960.

Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. (1992).
Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34(PSK- J3)/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, 71, 323-334.

Bibliographie

Matsushime, H., Shibuya, M., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Sherr, C.J. & Kato, J.Y. (1994). D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 2066-2076.

Mattick, J.S. & Makunin, I.V. (2005). Small regulatory RNAs in mammals. *Human Molecular Genetics*, 14.

Mayer, A.M. & Hamann, M.T. (2004). Marine pharmacology in 2000: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Mar Biotechnol* (NY), 6, 37-52.

Mayer, A.M.S. & Gustafson, K.R. (2004). Marine pharmacology in 2001-2: antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 40, 2676-2704.

Bibliographie

McCann, B. (2005). Reviewing radon risk. *Water* 21, 12-13.

McCarthy, N.J., Whyte, M.K.B., Gilbert, C.S. & Evan, G.I. (1997). Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue bak. *Journal of Cell Biology*, 136, 215-227.

McCawley, L.J. & Matrisian, L.M. (2000). Matrix metalloproteinases: Multifunctional contributors to tumor progression. *Molecular Medicine Today*, 6, 149-156.

Metting, B. & Pyne, J.W. (1986). Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, 8, 386-394.

Meyerson, M. & Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 2077-2086.

Bibliographie

Miller, J.A. & Miller, E.C. (1975). Metabolic activation and reactivity of chemical carcinogens. *Mutation research*, 33, 25-26.

Mills, J.C., Stone, N.L., Erhardt, J. & Pittman, R.N. (1998). Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *Journal of Cell Biology*, 140, 627-636.

Minegishi, M., Tachibana, K., Sato, T., Iwata, S., Nojima, Y. & Morimoto, C. (1996). Structure and function of Cas-L, a 105-kD Crk-associated substrate-related protein that is involved in beta 1 integrin-mediated signaling in lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 184, 1365-1375.

Mita, M. & Tolcher, A.W. (2005). Novel apoptosis inducing agents in cancer therapy. *Current Problems in Cancer*, 29, 8-32.

Bibliographie

Mitsudomi, T., Oie, H.K., Mulshine, J.L., Phelps, R., Viallet, J., Minna, J.D., Gazdar, A.F., Pass, H. & Steinberg, S.M. (1991). ras gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer Research*, 51, 4999-5002.

Mitsudomi, T., Steinberg, S.M., Nau, M.M., Carbone, D., D'Amico, D., Bodner, S., Oie, H.K., Linnoila, R.I., Mulshine, J.L., Minna, J.D. & Gazdar, A.F. (1992). P53 gene mutations in non-small-cell lung cancer cell lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene*, 7, 171-180.

Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-299.

Bibliographie

- Monia, B.P., Holmlund, J. & Dorr, F.A. (2000).**
Antisense approaches for the treatment of cancer. *Cancer Investigation*, 18, 635-650.
- Moreau, D., Jacquot, C., Tsita, P., Chinou, I., Tomasoni, C., Juge, M., Antoniadou-Vyza, E. & Roussakis, C. (2006 (in preparation)).** Innovative drug inductor of new molecular target, with antitumor activity against Non Small Cell Lung Cancer. *PNAS*.
- Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R., Le Guedes, R., Cadoret, J.-P., Muller-Feuga, A., Kontiza, I., Vagias, C., Roussis, V. & Roussakis, C. (2006). Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 97-103.
- Mori, S., Ito, G., Usami, N., Shimokata, K., Sekido, Y., Yoshioka, H., Ueda, Y., Kodama, Y., Takahashi, M. &**

Bibliographie

Fong, K.M. (2004). p53 Apoptotic Pathway Molecules Are Frequently and Simultaneously Altered in Nonsmall Cell Lung Carcinoma. *Cancer*, 100, 1673-1682.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Mountain, C.F. (1997). Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest*, 111, 1710-1717.

Muller-Feuga, A., Le Gue?des, R. & Le De?an, L. (2004). Cell weight kinetics simulation in chemostat and batch culture of the rhodophyte *Porphyridium cruentum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 88, 759-766.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.

Bibliographie

Murphy, A.L. (1999). Apoptin: Nuclear switch triggers cancer cell death. *Gene Therapy*, 6, 713-714.

N

Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-1456.

Nagle, D.G., Zhou, Y.D., Mora, F.D., Mohammed, K.A. & Kim, Y.P. (2004). Mechanism targeted discovery of antitumor marine natural products. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1725-1756.

Nakamoto, T., Sakai, R., Honda, H., Ogawa, S., Ueno, H., Suzuki, T., Yazaki, Y., Hirai, H. & Aizawa, S.-I. (1997). Requirements for localization of p130(cas) to

Bibliographie

focal adhesions. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 3884-3897.

Nemunaitis, J., Swisher, S.G., Timmons, T., Connors, D., Mack, M., Doerksen, L., Weill, D., Wait, J., Lawrence, D.D., Kemp, B.L., Fossella, F., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.J., Lee, J.S., Nguyen, D.M., Nesbitt, J.C., Perez-Soler, R., Pisters, K.M.W., Putnam, J.B., Richli, W.R., Shin, D.M., Walsh, G.L. & Roth, J. (2000). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 609-622.

Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, 17, 215-234.

Newman, D.J., Cragg, G.M. & Snader, K.M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the

Bibliographie

period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.

Newton, K., Harris, A.W., Bath, M.L., Smith, K.G.C. & Strasser, A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances deletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T lymphocytes. *EMBO Journal*, 17, 706-718.

Nguyen, D.M. & Schrump, D.S. (2004). Growth factor receptors as targets for lung cancer therapy. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 16, 3-12.

Nguyen, D.M., Wiehle, S.A., Koch, P.E., Branch, C., Yen, N., Roth, J.A. & Cristiano, R.J. (1997). Delivery of the p53 tumor suppressor gene into lung cancer cells by an adenovirus/DNA complex. *Cancer Gene Therapy*, 4, 191-198.

Bibliographie

Nicholson, D.W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature*, 407, 810-816.

Nishino, H., Tokuda, H., Satomi, Y., Masuda, M., Onozuka, M., Yamaguchi, S., Takayasu, J., Murakoshi, M., Tsuruta, J., Okuda, M., Khachik, F., Narisawa, T., Takasuka, N. & Yano, M. (2000). Cancer prevention by natural carotenoids. *Biofactors*, 13, 89-94.

Noh, S.J., Guan, K.L., Li, Y. & Xiong, Y. (1999). Identification of functional elements of p18(INK4C) essential for binding and inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 4 and CDK6. *Cancer Research*, 59, 558-564.

Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y. & Hirai, H. (1995). Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p130(Cas), a Src homology 3-containing molecule having

multiple Src homology 2-binding motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 15398-15402.

O

O'Dwyer, P.J., Stevenson, J.P., Gallagher, M., Cassella, A., Vasilevskaya, I., Yao, K.S., Monia, B.P., Holmlund, J. & Dorr, F.A. (1999). c-raf-1 Depletion and tumor responses in patients treated with the c- raf-1 antisense oligodeoxynucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A). *Clinical Cancer Research*, 5, 3977-3982.

O'Neill, G.M., Fashena, S.J. & Golemis, E.A. (2000). Integrin signalling: a new Cas(t) of characters enters the stage. *Trends Cell Biology*, 10, 111-9.

O'Neill, G.M. & Golemis, E.A. (2001). Proteolysis of the docking protein HEF1 and implications for focal adhesion dynamics. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 5094-5108.

Bibliographie

Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 364, 806-809.

Ogawa, S., Toyoshima, H., Kozutsumi, H., Hagiwara, K., Hirano, N., Mano, H., Yazaki, Y., Hirai, H., Sakai, R. & Tanaka, T. (1994). The C-terminal SH3 domain of the mouse c-Crk protein negatively regulates tyrosine-phosphorylation of Crk associated p130 in rat 3Y1 cells. *Oncogene*, 9, 1669-1678.

Ohashi, Y., Iwata, S., Kamiguchi, K. & Morimoto, C. (1999). Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrate lymphocyte-type is a critical element in TCR- and integrin-induced T lymphocyte migration. *Journal of Immunology*, 163, 3727-3734.

Ohba, T., Ishino, M., Aoto, H. & Sasaki, T. (1998). Dot far-western blot analysis of relative binding affinities of

Bibliographie

the Src homology 3 domains of Efs and its related proteins. *Anal of Biochemistry*, 262, 185-92.

Ohi, R. & Gould, K.L. (1999). Regulating the onset of mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 267-273.

Okami, K., Wu, L., Cairns, P., Evron, E., Halachmi, N., Reed, A.L., Koch, W.M., Sidransky, D., Jen, J., Riggins, G., Kern, S.E., Goggins, M., Hilgers, W. & Ahrendt, S.A. (1998). Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Research*, 58, 509-511.

Okamoto, A., Hussain, S.P., Hagiwara, K., Spillare, E.A., Rusin, M.R., Demetrick, D.J., Serrano, M., Hannon, G.J., Shiseki, M., Zariwala, M., Xiong, Y., Beach, D.H., Yokota, J. & Harris, C.C. (1995). Mutations in the p16(INK4)/MTS1/CDKN2, p15(INK4B)/MTS2, and p18 genes in primary and metastatic lung cancer. *Cancer Research*, 55, 1448-1451.

Bibliographie

Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Giancotti, F.G. & Birge, R.B. (1999). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *Journal of Cell Biology*, 145, 1461-1469.

Okuzumi, J., Nishino, H., Murakoshi, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., Yamane, T., Fujita, Y. & Takahashi, T. (1990). Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Letters*, 55, 75-81.

Olie, R.A., Simões-Wust, A.P., Leech, S.H., Stahel, R.A., Zangemeister-Wittke, U., Baumann, B. & Fabbro, D. (2000). A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research*, 60, 2805-2809.

Bibliographie

Ortiz-Vega, S., Khokhlatchev, A., Nedwidek, M., Zhang, X.F., Dammann, R., Pfeifer, G.P. & Avruch, J. (2002). The putative tumor suppressor RASSF1A homodimerizes and heterodimerizes with the Ras-GTP binding protein Nore1. *Oncogene*, 21, 1381-1390.

Otterson, G.A., Khleif, S.N., Chen, W., Coxon, A.B. & Kaye, F.J. (1995). CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16(INK4) protein induction by 5-aza 2'deoxycytidine. *Oncogene*, 11, 1211-1216.

Otterson, G.A., Kratzke, R.A., Coxon, A., Kim, Y.W. & Kaye, F.J. (1994). Absence of p16(INK4) protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB. *Oncogene*, 9, 3375-3378.

P

Bibliographie

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Herman, P., Boggon, T.J., Naoki, K., Eck, M.J., Sellers, W.R., Johnson, B.E., Meyerson, M., Gabriel, S., Kaye, F.J., Lindeman, N., Sasaki, H. & Fujii, Y. (2004). EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304, 1497-1500.

Painter, R.B. & Young, B.R. (1980). Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: A new explanation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 7315-7317.

Pan, G., Bauer, J.H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B.B., Ni, J. & Dixit, V.M. (1998). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Letters*, 431, 351-356.

Parada, L.F. & Weinberg, R.A. (1983). Presence of a kirsten murine sarcoma virus oncogene in cells

Bibliographie

transformed by 3-methylcholanthrene. *Molecular Cell Biology*, 3, 2298-2301.

Patel, T., Gores, G.J. & Kaufmann, S.H. (1996). The role of proteases during apoptosis. *FASEB Journal*, 10, 587-597.

Paterson, I. & Anderson, E.A. (2005). The renaissance of natural products as drug candidates. *Science*, 310, 451-453.

Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H. (1997). When Checkpoints Fail. *Cell*, 88, 315-321.

Pershagen, G., Akerblom, G., Axelson, O., Clavensjö, B., Damber, L., Desai, G., Enflo, A., Lagarde, F., Mellander, H., Svartengren, M. & Swedjemark, G.A. (1994). Residential radon exposure and lung cancer in Sweden. *New England Journal of Medicine*, 330, 159-164.

Bibliographie

Petch, L.A., Bockholt, S.M., Bouton, A., Parsons, J.T. & Burridge, K. (1995). Adhesion-induced tyrosine phosphorylation of the p130 SRC substrate. *Journal of Cell Science*, 108, 1371-1379.

Peter, M.E. (1999). Apoptosis signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 11, 277-285.

Petersen, O.W., Ronnov-Jessen, L., Weaver, V.M. & Bissell, M.J. (1998). Differentiation and cancer in the mammary gland: shedding light on an old dichotomy. *Advance in Cancer Research*, 75, 135-61.

Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E. & Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: Combination of national statistics with two case-control studies. *British Medical Journal*, 321, 323-329.

Bibliographie

Petros, W.P. & Evans, W.E. (2004). Pharmacogenomics in cancer therapy: is host genome variability important? *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 457-464.

Pettmann, B. & Henderson, C.E. (1998). Neuronal cell death. *Neuron*, 20, 633-647.

Pezzella, F., Turley, H., Kuzu, I., Tungekar, M.F., Dunnill, M.S., Pierce, C.B., Harris, A., Gatter, K.C. & Mason, D.Y. (1993). bcl-2 Protein in non-small-cell lung carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 329, 690-694.

Pfeffer, S., Zavolan, M., Graßer, F.A., Chien, H., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. & Tuschl, T. (2004). Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science*, 304, 734-736.

Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S. & Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53

Bibliographie

mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21, 7435-7451.

Pietersen, A. & Noteborn, M.H.M. (2000). Apoptin®. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 465, 153-161.

Pietersen, A.M., Van Der Eb, M.M., Rademaker, H.J., Van Den Wollenberg, D.J.M., Rabelink, M.J.W.E., Van Ormondt, H., Van Der Eb, A.J., Hoebe, R.C., Noteborn, M.H.M., Masman, D., Kuppen, P.J.K., Van Dierendonck, J.H. & Van De Velde, C.J.H. (1999). Specific tumor-cell killing with adenovirus vectors containing the apoptin gene. *Gene Therapy*, 6, 882-892.

Pines, J. & Hunter, T. (1990). Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346, 760-763.

Bibliographie

Polte, T. & Hanks, S. (1995). Interaction Between Focal Adhesion Kinase and Crk-Associated Tyrosine Kinase Substrate p130Cas. *PNAS*, 92, 10678-10682.

Polyak, K., Kato, J.Y., Solomon, M.J., Sherr, C.J., Massague, J., Roberts, J.M. & Koff, A. (1994). p27(Kip1), a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes and Development*, 8, 9-22.

Ponce-Castaneda, M.V., Lee, M.H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Montgomery, K., Mathew, S., Krauter, K., Sheinfeld, J., Massague, J. & Cordon-Cardo, C. (1995). p27(Kip1): Chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Research*, 55, 1211-1214.

Proksch, P., Edrada, R.A. & Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological

implications. *Applied Microbiology Biotechnology*, 59, 125-134.

R

Rachwal, W.J., Bongiorno, P.F., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Ethier, S.P. & Beer, D.G. (1995). Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *British Journal of Cancer*, 72, 56-64.

Ranson, M. (2004). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *British Journal of Cancer*, 90, 2250-2255.

Rastan, S. (1994). X chromosome inactivation and the Xist gene. *Current Opinion in Genetics & Development*, 4, 292-297.

Bibliographie

Ratschiller, D., Heighway, J., Gugger, M., Kappeler, A., Pirnia, F., Schmid, R.A., Borner, M.M. & Betticher, D.C. (2003). Cyclin D1 overexpression in bronchial epithelia of patients with lung cancer is associated with smoking and predicts survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21, 2085-2093.

Reed, J.C. (2001). Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends in Molecular Medicine*, 7, 314-319.

Reissmann, P.T., Koga, H., Takahashi, R., Figlin, R.A., Holmes, E.C., Piantadosi, S., Cordon-Cardo, C. & Slamon, D.J. (1993). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 8, 1913-1919.

Rock, C.L. (1997). Carotenoids: Biology and treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 75, 185-197.

Bibliographie

Rodenhuis, S. & Slebos, R.J.C. (1990). The ras oncogenes in human lung cancer. *American Review of Respiratory Disease*, 142.

Rosell, R., Balaña, C., Felip, E. & Garcia-Campelo, R. (2004a). The biology of non-small-cell lung cancer: Identifying new targets for rational therapy. *Lung Cancer*, 46, 135-148.

Rosell, R., Felip, E., Garcia-Campelo, R. & Balana, C. (2004b). The biology of non-small-cell lung cancer: identifying new targets for rational therapy. *Lung Cancer*, 46, 135-148.

Ross, J.S., Schenkein, D.P., Pietrusko, R., Rolfe, M., Linette, G.P., Stec, J., Stagliano, N.E., Ginsburg, G.S., Symmans, W.F., Puztai, L. & Hortobagyi, G.N. (2004). Targeted therapies for cancer 2004. *American Journal of Clinical Pathology*, 122, 598-609.

Bibliographie

Roth, J.A., Grammer, S.F., Swisher, S.G., Nemunaitis, J., Merritt, J. & Meyn R.E, Jr. (2000). Gene replacement strategies for treating non-small cell lung cancer.

Seminars in Radiation Oncology, 10, 333-342.

Rothe, M., Pan, M.G., Henzel, W.J., Ayres, T.M. & Goeddel, D.V. (1995). The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell*, 83, 1243-1252.

Roussakis, C., Gratas, C., Audouin, A.F., Boterff, J.L., Dabouis, C., Andre, M.J., Moyon, E., Vo, N.H., Pradal, G. & Verbist, J.F. (1991). Study of in vitro drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLC-N6).

Anticancer research, 11, 2239-2244.

Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C. (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins

Bibliographie

are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO Journal*, 16, 6914-6925.

Ruano-Ravina, A., Figueiras, A., Freire-Garabal, M. & Barros-Dios, J.M. (2006). Antioxidant vitamins and risk of lung cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 12, 599-613.

Rusch, V., Baselga, J., Cordon-Cardo, C., Orazem, J., Zaman, M., Hoda, S., McIntosh, J., Kurie, J. & Dmitrovsky, E. (1993). Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Research*, 53, 2379-2385.

Rusch, V., Klimstra, D., Linkov, I. & Dmitrovsky, E. (1995). Aberrant expression of p53 or the epidermal growth factor receptor is frequent in early bronchial neoplasia, and coexpression precedes squamous cell carcinoma development. *Cancer Research*, 55, 1365-1372.

Bibliographie

Russell, L.B. & Montgomery, C.S. (1970). Comparative studies on X-autosome translocations in the mouse. II.

Inactivation of autosomal loci, segregation, and mapping of autosomal breakpoints in five T (X;1) S.

Genetics, 64, 281-312.

Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Pavletich, N.P. & Massagué, J. (1996). Crystal structure of the p27(Kip1) cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382, 325-331.

S

Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. & Hirai, H. (1994). A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *EMBO Journal*, 13, 3748-3756.

Bibliographie

Sakakibara, A. & Hattori, S. (2000). Chat, a Cas/HEF1-associated adaptor protein that integrates multiple signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 6404-6410.

Samuelsson, G. (2004). *Drugs of Natural Origin: a textbook of pharmacognosy*. 5th Swedish Pharmaceutical Press: Stockolm.

Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. & Elledge, S.J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: Linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, 277, 1497-1501.

Sandler, A.B., Johnson, D.H. & Herbst, R.S. (2004). Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 10.

Sanlioglu, A.D., Aydin, C., Bozcuk, H., Terzioglu, E. & Sanlioglu, S. (2004). Fundamental principals of tumor necrosis factor-alpha gene therapy approach and implications for patients with lung carcinoma. *Lung Cancer*, 44, 199-211.

Santella, R.M., Gammon, M., Terry, M., Senie, R., Shen, J., Kennedy, D., Agrawal, M., Faraglia, B. & Zhang, F. (2005). DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 592.

Sard, L., Accornero, P., Tornielli, S., Delia, D., Bunone, G., Campiglio, M., Colombo, M.P., Gramegna, M., Pierotti, M.A., Sozzi, G. & Croce, C.M. (1999). The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8489-8492.

Bibliographie

Sasaki, H., Sheng, Y.L., Kotsuji, F. & Tsang, B.K. (2000).

Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 60, 5659-5666.

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P.,

Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B.,

Fesik, S.W., Chang, B.S., Minn, A.J. & Thompson, C.B.

(1997). Structure of Bcl-x(L)-Bak peptide complex:

Recognition between regulators of apoptosis. *Science*, 275, 983-986.

Savitsky, K., Bau-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y.,

Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S.,

Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Havnik, R.,

Patanjali, S.R., Simmons, A., Clines, G.A., Sartiel, A. &

Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268, 1749-1753.

Bibliographie

Scanlan, M.J., Chen, Y.T., Williamson, B., Gure, A.O., Stockert, E., Gordan, J.D., Tu?reci, O., Sahin, U., Pfrendschuh, M. & Old, L.J. (1998). Characterization of human colon cancer antigens recognized by autologous antibodies. *International Journal of Cancer*, 76, 652-658.

Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R. & Raab, H. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, 61, 361-370.

Schauer, I.E., Siriwardana, S., Langan, T.A. & Sclafani, R.A. (1994). Cyclin D1 overexpression vs. retinoblastoma inactivation: Implications for growth control evasion in non-small cell and small cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7827-7831.

Bibliographie

Schlaepfer, D.D. & Hunter, T. (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs. *Trends Cell Biology*, 8, 151-7.

Schoenwaelder, S.M. & Burridge, K. (1999). Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology*, 11, 274-286.

Schwartsmann, G., da Rocha, A.B., Berlinck, R.G.S. & Jimeno, J. (2001). Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The Lancet Oncology*, 2, 221-225.

Schwartz, M.A. (1997). Integrins, oncogenes, and anchorage independence. *Journal of Cell Biology*, 139, 575-578.

Sebastian, B., Kakizuka, A. & Hunter, T. (1993). Cdc25M2 activation of cyclin-dependent kinases by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15.

Bibliographie

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90, 3521-3524.

Sen, S., Sharma, H. & Singh, N. (2005). Curcumin enhances Vinorelbine mediated apoptosis in NSCLC cells by the mitochondrial pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1245-1252.

Servel, M.-O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L. & De Roeck-Holtzhauer, Y. (1994). Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry*, 36, 691-693.

Seto, M., Yamamoto, K., Iida, S., Akao, Y., Utsumi, K.R., Kubonishi, I., Miyoshi, I., Ohtsuki, T., Yawata, Y., Namba, M., Motokura, T., Arnold, A., Takahashi, T. & Ueda, R. (1992). Gene rearrangement and overexpression of PRAD1 in lymphoid malignancy with t(11;14)(q13;q32) translocation. *Oncogene*, 7, 1401-1406.

Shariat, S.F., Desai, S., Song, W., Khan, T., Zhao, J., Nguyen, C., Foster, B.A., Greenberg, N., Spencer, D.M.

Bibliographie

& Slawin, K.M. (2001). Adenovirus-mediated transfer of inducible caspases: A novel "Death Switch" gene therapeutic approach to prostate cancer. *Cancer Research*, 61, 2562-2571.

Sharma, P., Sharma, M., Amin, N.D., Albers, R.W. & Pant, H.C. (1999). Regulation of cyclin-dependent kinase 5 catalytic activity by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 11156-11160.

Shepherd, F.A., Bezjak, A., Pereira, J.R., Ciuleanu, T., Eng, H.T., Hirsh, V., Thongprasert, S., Campos, D., Maoleekoonpiroj, S., Smylie, M., Martins, R., Van Kooten, M., Dediu, M., Findlay, B., Tu, D., Johnston, D., Seymour, L., Clark, G. & Santabárbara, P. (2005). Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 353, 123-132.

Bibliographie

Sherr, C.J. (1996). Cancer Cell Cycles. *Science*, 274, 1672-1677.

Sherr, C.J. & Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes and Development*, 9, 1149-1163.

Sherr, C.J. & Weber, J.D. (2000). The ARF/p53 pathway. *Current Opinion in Genetics and Development*, 10, 94-99.

Shijubo, N., Kojima, H., Nagata, M., Ohchi, T., Suzuki, A., Abe, S. & Sato, N. (2003). Tumor angiogenesis of non-small cell lung cancer. *Microsc Res Tech*, 60, 186-98.

Shimizu, Y. (1996). Microalgal metabolites: A new perspective. *Annual Review of Microbiology*, 50, 431-465.

Shimizu, Y. (2000). Microalgae as a drug source. *Drugs from the Sea*, 30-45.

Bibliographie

Shimizu, Y. (2003). Microalgal metabolites. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 236-243.

Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R. & White, M.A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molecular and Cellular Biology*, 22, 4309-4318.

Siavoshian, S., Böesh, S., Riou, D., Dabouis, G., More, M.T., Pondaven, P. & Roussakis, C. (1998). Cloning of a human cancer cell line (NSCLC-N6) and comparative study of these clones *in vitro*. *Anticancer Research*, 18, 193-200.

Siliciano, J.D., Canman, C.E., Kastan, M.B., Taya, Y., Sakaguchi, K. & Appella, E. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes and Development*, 11, 3471-3481.

Bibliographie

Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. & Gerwick, W.H. (2005). Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 333-342.

Singh, S., Kate, B.N. & Banecjee, U.C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73-95.

Siprashvili, Z., McCue, P., Eryomin, V., Croce, C.M., Huebner, K., Sozzi, G., Sard, L., Tagliabue, E., Greco, A., Fusetti, L., Pierotti, M.A., Barnes, L.D., Robinson, A.K. & Schwartz, G. (1997). Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 13771-13776.

Skulberg, O.M. (2000). Microalgae as a source of bioactive molecules - experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*, 12, 341-348.

Bibliographie

Slattery, M.L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K.N., Schaeffer, D. & Potter, J.D. (2000). Carotenoids and colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 575-582.

Sleutels, F., Zwart, R. & Barlow, D.P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, 415, 810-813.

Slingerland, J.M., Hengst, L., Reed, S.I., Pan, C.H., Alexander, D. & Stampfer, M.R. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 3683-3694.

Smith, C.A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M.P., Jerzy, R., Dower, S.K., Cosman, D. & Goodwin, R.G. (1990). A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science*, 248, 1019-1023.

Bibliographie

Smith, K.G., Strasser, A. & Vaux, D.L. (1996). CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/ APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO Journal*, 15, 5167-5176.

Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1995). Biometry : the principles and practice of statistics in biological research. Freeman W.H. and compagny: New York.

Soria, J.C., Lee, H.Y., Lee, J.I., Wang, L., Issa, J.P., Kemp, B.L., Liu, D.D., Kurie, J.M., Mao, L. & Khuri, F.R. (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical Cancer Research*, 8, 1178-1184.

Sozzi, G. (2001). Molecular biology of lung cancer. *European Journal of Cancer*, 37, 63-73.

Sozzi, G., Miozzo, M., Donghi, R., Pilotti, S., Cariani, C.T., Pastorino, U., Della Porta, G. & Pierotti, M.A.

Bibliographie

(1992). Deletions of 17p and p53 mutations in preneoplastic lesions of the lung. *Cancer Research*, 52, 6079-6082.

Sozzi, G., Moiraghi, L., Tagliabue, E., Ghirelli, C., Tornielli, S., Sard, L., Pierotti, M.A., Pilotti, S., Pastorino, U., Pezzella, F., Huebner, K. & Croce, C.M. (1998). Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Research*, 58, 5032-5037.

Sozzi, G., Tornielli, S., Sard, L., Minoletti, F., Pierotti, M.A., Tagliabue, E., Pilotti, S., Pastorino, U., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., Pezzella, F., Veronese, M.L., Huebner, K. & Croce, C.M. (1997). Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Research*, 57, 5207-5212.

Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C.M., Litwack, G., Tomaselli, K.J., Armstrong, R.C. & Alnemri,

Bibliographie

E.S. (1997). FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis.

Journal of Biological Chemistry, 272, 18542-18545.

Stahl, W. & Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.

Stamenkovic, I., Clark, E.A. & Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO Journal*, 8, 1403-1410.

Steenland, K., Loomis, D., Shy, C. & Simonsen, N. (1996). Review of occupational lung carcinogens. *American Journal of Industrial Medicine*, 29, 474-490.

Stewart, Z.A., Mays, D. & Pietenpol, J.A. (1999). Defective G1-S cell cycle checkpoint function sensitizes cells to microtubule inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Research*, 59, 3831-3837.

Bibliographie

Sugio, K., Kishimoto, Y., Virmani, A.K., Hung, J.Y. & Gazdar, A.F. (1994). K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Research*, 54, 5811-5815.

Sun, H., Li, D.M., Zhang, H., Gavrilova, N., Lesche, R., Liliental, J., Gao, J., Wu, H., Mueller, B. & Liu, X. (1999). PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 6199-6204.

Sundaresan, V., Ganly, S.P., Hasleton, P., Rudd, R., Sinha, G., Bleehen, N.M. & Rabbitts, P. (1992). p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene*, 7, 1989-1997.

Bibliographie

Swisher, S.G., Roth, J.A., Gu, J., Correa, A.M., Dolormente, M., Francisco, R., Putnam Jr, J.B., Sarabia, A.J., Smythe, W.R., Vaporciyan, A.A., Walsh, G.L., Yin, M., Komaki, R., Liao, Z., Stevens, C., Hicks, M., Ahrar, K., Morello, F., Munden, R., Shelton, T., Ro, J.Y., El-Naggar, A.K., Kemp, B., Hong, W.K., Fossella, F., Glisson, B., Herbst, R., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Morice, R., Papadimitrakopoulou, V., Pisters, K.M.W., Shin, D.M., Huaranga, A., McDonnell, T.J., Merritt, J.A., Lee, J.J., Atkinson, N.E., Dreiling, L. & Grammer, S. (2003). Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy.

Clinical Cancer Research, 9, 93-101.

Swisher, S.G., Roth, J.A., Putnam Jr, J.B., Walsh, G.L., Lawrence, D.D., Carrasco, C.H., Richli, W.R., Waugh, M.K.A., Fossella, F., Glisson, B.S., Hong, W.K., Khuri, F.R., Kurie, J.M., Lee, J.S., Perez-Soler, R., Pisters, K.M.W., Shin, D.M., Lee, J.J., Kemp, B.L., El-Naggar,

Bibliographie

A.K., Nemunaitis, J., Connors, D.G., Merritt, J.A.,
Nguyen, D.M., Schrump, D.S., Nesbitt, J.C., Mack, M.,
Savin, M., Shulkin, A., Wait, J. & Weill, D. (1999).

Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced
non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer
Institute*, 91, 763-771.

T

**Tachibana, K., Fujitani, H., Ohashi, Y., Kamiguchi, K.,
Iwata, S., Morimoto, C., Urano, T. & Hirai, H. (1997).**
Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates
by focal adhesion kinase. A putative mechanism for the
integrin-mediated tyrosine phosphorylation of Crk-
associated substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 272,
29083-29090.

Takagi, N. (1996). Inactivation of X-chromosome and
Xist gene. *Tanpakushitsu kakusan koso. Protein, nucleic acid,
enzyme*, 41, 1391-1395.

Bibliographie

Takahashi, A. & Earnshaw, W.C. (1996). ICE-related proteases in apoptosis. *Current Opinion in Genetics and Development*, 6, 50-55.

Takahashi, T., Nau, M.M., Chiba, I., Birrer, M.J., Rosenberg, R.K., Vinocour, M., Levitt, M., Pass, H., Gazdar, A.D. & Minna, J.D. (1989). p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*, 246, 491-494.

Tapiero, H., Townsend, D.M. & Tew, K.D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, 100-110.

Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. & Goeddel, D.V. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 845-853.

Bibliographie

Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.

Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. *Science*, 281, 1312-1316.

Toloza, E.M. (2005). Gene therapy for lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 17, 205-212.

Toloza, E.M. & D'Amico, T.A. (2005). Targeted therapy for non-small cell lung cancer. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 17, 199-204.

Toyoshima, H. & Hunter, T. (1994). p27, A novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78, 67-74.

Tracey, K.J. & Cerami, A. (1990). Metabolic responses to cachectin/TNF. A brief review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 587, 325-331.

Bibliographie

Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clinics in Chest Medicine*, 23, 65-81.

Tringali, C. (1997). Bioactive metabolites from marine algae: Recent results. *Current Organic Chemistry*. Nov, 1, 375-394.

Tsai, L.H., Lees, E., Faha, B., Harlow, E. & Riabowol, K. (1993). The cdk2 kinase is required for the G1-to-S transition in mammalian cells. *Oncogene*, 8, 1593-1602.

Tsubata, T., Wu, J. & Honjo, T. (1993). B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature*, 364, 645-648.

Tulp, M. & Bohlin, L. (2004). Unconventional natural sources for future drug discovery. *Drug Discovery Today*, 9, 450-458.

v

Bibliographie

Van Dolah, F.M. & Ramsdell, J.S. (2001). Review and assessment of in vitro detection methods for algal toxins.

Journal of AOAC International, 84, 1617-1625.

Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K.,

Schumacker, P.T. & Thompson, C.B. (1997). Bcl-xL

regulates the membrane potential and volume

homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91, 627-637.

Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L. & Reiffers, J. (2001). Mecanismes moleculaires controlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications

en cancerologie: Molecular mechanisms controlling the cell cycle: main considerations and implications in

oncology. *Cancer/Radiotherapie*, 5, 109-129.

Vindelov, L.L. (1977). Flow microfluorimetric analysis of

nuclear DNA in cell forms solids tumors and cell

suspensions. A new method for rapid isolation and

Bibliographie

staining nuclear. *Virchows Archives of Biological Cell Pathology*, 24, 227-242.

Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. & Garland, C.D. (1989). Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 128, 219-240.

Vos, M.D., Ellis, C.A., Bell, A., Birrer, M.J. & Clark, G.J. (2000). Ras uses the novel tumor suppressor RASSF1 as an effector to mediate apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35669-35672.

Vos, M.D., Martinez, A., Ellis, C.A., Vallecorsa, T. & Clark, G.J. (2003). The pro-apoptotic RAS effector Nore1 may serve as a RAS-regulated tumor suppressor in the lung. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21938-21943.

Vu, T.H. & Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: Effectors of development and normal physiology. *Genes and Development*, 14, 2123-2133.

Bibliographie

Vuori, K. & Ruoslahti, E. (1995). Tyrosine phosphorylation of p130(Cas) and cortactin accompanies integrin- mediated cell adhesion to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 22259-22262.

W

Wang, S.S., Esplin, E.D., Li, J.L., Huang, L., Evans, G.A., Gazdar, A. & Minna, J. (1998). Alterations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science*, 282, 284-287.

Wanzel, M., Herold, S. & Eilers, M. (2003). Transcriptional repression by Myc. *Trends in Cell Biology*, 13, 146-150.

Weber, J.D., Sherr, C.J., Roussel, M.F., Taylor, L.J. & Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nature Cell Biology*, 1, 20-26.

Bibliographie

Wen, L.-P., Fahrni, J.A., Troie, S., Rosen, G.D., Guan, J.-L. & Orth, K. (1997). Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 26056-26061.

Weng, L.P., Wang, X. & Yu, Q. (1999). Transmembrane tyrosine phosphatase LAR induces apoptosis by dephosphorylating and destabilizing p130(Cas). *Genes to Cells*, 4, 185-196.

Winton, T., Johnston, M., Butts, C., Cormier, Y., Goss, G., Inculet, R., Bethune, D., Ayoub, J., Ding, K., Seymour, L., Graham, B., Tsao, M.S., Shepherd, F., Livingston, R., Vallieres, E., Gandara, D., Johnson, D., Fry, W., Kesler, K., Rigas, J. & Demmy, T. (2005). Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 352, 2589-2597.

Bibliographie

Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H. & Loeb, L.A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 14, 473-486.

Woo, R.A., McLure, K.G., Lee, P.W.K., Lees-Miller, S.P. & Rancourt, D.E. (1998). DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*, 394, 700-704.

Wu, J.C.Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. & Shi, Y. (2001). Crystal Structure of a Caspase Zymogen: Mechanisms of Activation and Substrate Binding. *Cell*, 107, 399-407.

Wutz, A. (2003). Xist RNA associates with chromatin and causes gene silencing. *Noncoding RNAs: Molecular Biology and Molecular Medicine*, 50-66.

Wyllie, A.H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-556.

Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D.
(1984). Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *Journal of Pathology*, 142, 67-77.

X

Xiang, J., Chao, D.T. & Korsmeyer, S.J. (1996). BAX-induced cell death may not require interleukin 1?-converting enzyme-like proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14559-14563.

Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366, 701-704.

Xu, H.J., Hu, S.X., Cagle, P.T., Moore, G.E. & Benedict, W.F. (1991). Absence of retinoblastoma protein

Bibliographie

expression in primary non-small cell lung carcinomas.

Cancer Research, 51, 2735-2739.

Xu, H.J., Zhou, Y., Perng, G.S., Benedict, W.F., Hu, S.X., Seigne, J., Mixon, M., Zhang, C. & Li, J. (1996a).

Enhanced tumor suppressor gene therapy via replication-deficient adenovirus vectors expressing an N-terminal truncated retinoblastoma protein. *Cancer Research*, 56, 2245-2249.

Xu, L.-H., Owens, L.V., Sturge, G.C., Yang, X., Craven, R.J., Cance, W.G. & Liu, E.T. (1996b). Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth and Differentiation*, 7, 413-418.

Y

Yamaguchi, T., Matsuda, K., Sagiya, Y., Iwadate, M., Fujino, M.A., Nakamura, Y. & Arakawa, H. (2001).

Bibliographie

p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Research*, 61, 8256-8262.

Yamakita, Y., Totsukawa, G., Yamashiro, S., Matsumura, F., Fry, D., Zhang, X. & Hanks, S.K. (1999). Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-SRC complex during mitosis: Role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK. *Journal of Cell Biology*, 144, 315-324.

Yang, J., Liu, X., Kim, C.N., Cai, J., Jones, D.P., Wang, X., Bhalla, K., Ibrado, A.M. & Peng, T.I. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*, 275, 1129-1132.

Yashima, K., Wistuba, I.I., Gazdar, A.F., Piatyszek, M.A., Shay, J.W., Rogers, T., Milchgrub, S., Litzky, L.A., Kaiser, L., Lam, S. & Srivastava, S. (1997). Telomerase expression in respiratory epithelium during the

Bibliographie

multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Research*, 57, 2373-2377.

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, 21, 497-503.

Yokota, J., Mori, N., Akiyama, T., Shimosato, Y., Sugimura, T. & Terada, M. (1989). Multiple genetic alterations in small-cell lung carcinoma. *Princess Takamatsu symposia*, 20, 43-48.

Yuen, A.R. & Sikic, B.I. (2000). Clinical studies of antisense therapy in cancer. 5.

Z

Zamzami, N. & Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2, 67-71.

Bibliographie

Zamzami, N., Susin, S.A., Marchetti, P., Hirsch, T., Castedo, M., Kroemer, G. & Gómez-Monterrey, I. (1996). Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, 183, 1533-1544.

Zeigler, M.E., Chi, Y., Schmidt, T. & Varani, J. (1999). Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 180, 271-284.

Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N.H. & Winoto, A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*, 392, 296-300.

Zhang, Z., Nakamura, M., Taniguchi, E., Shan, L., Yokoi, T. & Kakudo, K. (1996). Late occurrence of K-ras gene mutations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the lung: analysis in sputum. *Analytical and*

Bibliographie

quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology, 18, 501-502.

Zhuang, S.M., Shvarts, A., Jochemsen, A.G., Van Oorschot, A.A.A.M., Van Der Eb, A.J. & Noteborn, M.H.M. (1995). Differential sensitivity to Ad5 E1B-21kD and Bcl-2 proteins of apoptin-induced versus p53-induced apoptosis. *Carcinogenesis*, 16, 2939-2944.

Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. (1999). An APAf-1 cytochrome C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 11549-11556.

Annexes

Annexe 1

Séquence de l'ARN messager du gène HEF1, mise en évidence de l'alternance des différents exons.

Référence GenBank : L43821, Homo sapiens enhancer of filamentation (HEF1) mRNA.

```
1 tgaattcgtg agagacttga gggaggcgcgt gcgactgaca agcggctctg cccgggacct
61 tctcgctttc atctagcgct gcactcaatg gaggggcggg caccgcagtg cttaatgctg
121 tcttaactag tgtaggaaaa cggctcaacc caccgctgcc gaaatgaagt ataagaatct
181 tatggcaagg gccttatatg acaatgtccc agagtgtgcc gaggaactgg cctttcgcaa
241 gggagacatc ctgaccgtca tagagcagaa cacaggggga ctggaaggat ggtggctgtg
301 ctcgttacac ggtcggcaag gcattgtccc aggcaaccgg gtgaagcttc tgattggtcc
361 catgcaggag actgcctcca gtcacgagca gcctgcctct ggactgatgc agcagacctt
421 tggccaacag aagctctatc aagtgcctcc cccacaggct gctccccgag acaccatcta
481 ccaagtgcc a cttcctacc aaaatcaggg aatttacc aa gtccccactg gccacggcac
541 ccaagaacaa gaggtatata aggtgccacc atcagtgcag agaagcattg ggggaaccag
601 tgggccccac gtgggtaaaa aggtgataac ccccgtagag acaggccatg gctacgtata
661 cgagtaccca tccagatacc aaaaggatgt ctatgatata cctccttctc ataccactca
721 aggggtatac gacatccctc cctcatcagc aaaaggccct gtgttttcag ttccagtggg
781 agagataaaa cctcaagggg tgtatgacat cccgcctaca aaaggggat atgcccattcc
841 gccctctgct tgccgggatg aagcagggct tagggaaaaa gactatgact tccccctcc
901 catgagacaa gctggaaggc cggacctcag accggagggg gtttatgaca ttccccaac
961 ctgcaccaag ccagcaggga aggaccttca tgtaaaatac aactgtgaca ttccaggagc
1021 tgcagaaccg gtggctcgaa ggcaccagag cctgtccccg aatcacccac ccccgcaact
1081 cggagactca gtgggctctc agaacgacgc atatgatgtc ccccgaggcg ttcagtctct
1141 tgagccacca gcagaaacca gtgagaaagc aaacccccag gaaagggatg gtgtttatga
1201 tgtccctctg cataaccgcg cagatgctaa aggctctcgg gacttgggtg atgggatcaa
1261 ccgattgtct ttctccagta caggcagcac ccggagtaac atgtccacgt cttccacctc
1321 ctccaaggag tctcactgtt cagcctcccc agctcaggac aaaaggctct tcttgatcc
1381 agacacagct attgagagac ttcagcggct ccagcaggcc cttgagatgg gtgtctccag
1441 cctaattggc ctggctacta ccgactggcg gtgttacgga tatatggaaa gacacatcaa
1501 tgaaatacgc acagcagtgg acaagggtga gctgttctct aaggagtacc tccactttgt
1561 caaggagct gttgcaaatg ctgcctgcct cccggaactc atcctccaca acaagatgaa
1621 gcgggagctg caacgagtcg aagactccca ccagatcctg agtcaaacca gccatgactt
1681 aaatgagtgc agctgggtccc tgaatatctt ggccatcaac aagccccaga acaagtgtga
1741 cgatctggac cggtttgtga tgggtggcaa gacggtgccc gatgacgcca agcagctcac
1801 cacaaccatc aacaccaacg cagaggccct cttcagaccc ggccctggca gcttgcattc
1861 gaagaatggg ccggagagca tcatgaactc aacggagtac ccacacggtg gctcccaggg
1921 acagctgctg catcctgggt accacaaggc ccaggccac aacaaggcac tgccccagg
1981 cctgagcaag gagcaggccc ctgactgtag cagcagtgat ggttctgaga ggagctggat
2041 ggatgactac gattacgtcc acctacagg taaggaggag tttgagaggc aacagaaaga
2101 gctattggaa aaagagaata tcatgaaaca gaacaagatg cagctggaac atcatcagct
2161 gagccagttc cagctgttgg aacaagagat tacaaagccc gtggagaatg acatctcgaa
2221 gtggaagccc tctcagagcc taccaccac aaacagtggc gtgagtgtc aggatcgga
2281 gttgctgtgc ttctactatg accaatgtga gacccatttc atttcccttc tcaacgccat
2341 tgacgcactc ttcagttgtg tcagctcagc ccagcccccg cgaatcttcg tggcacacag
2401 caagtttgtc atcctcagtg cacacaaact ggtgttcatt ggagacacgc tgacacggca
2461 ggtgactgcc caggacattc gcaacaaagt catgaactcc agcaaccagc tctgcgagca
2521 gctcaagact atagtcattg caaccaagat ggccgccttc cattaccca gaccacggc
2581 cctgcaggaa atggtgcacc aagtgcagaa cctttctaga aatgcccagc tgttcaagcg
```

Annexes

```
2641 ctcttttgctg gagatggcaa cgttctgaga agaaaaaaaa gaggaagggg actgcggttaa
2701 cggttactaa ggaaaactgg aaatactgtc tggtttttgt aaatggtatc tattttttgta
2761 gataatttta tataaaaatg aaatatTTTA acatTTTatg ggTcagacaa ctttcagaaa
2821 ttcagggagc tggagagggg aatctTTTT tccccctga gtgttcttat gtatacacag
2881 aagtatctga gacataaact gtacagaaaa cttgtccacg tccttttgta tgcccatgta
2941 ttcattgtttt tgtttgtaga tgtttgTctg atgcatttca ttaaaaaaaaa aaccatgaat
3001 tacgaagcac cttagtaagc accttctaTt gctgcatttt ttttgTtgTt gttaaaaaaca
3061 tccagctggT tataatattg ttctccacgt ccttgTgatg attctgagcc tggcactggg
3121 aatctgggaa gcatagttta tttgcaagtG ttcaccttcc aaatcatgag gcatagcatg
3181 acttattctt gttttgaaaa ctcttttcaa aactgaccat cttaaacaca tgatggccaa
3241 gtgccacaaa gccctcttgc ggagacattt acgaatatat atgtggatcc aagtctcgat
3301 agttaggcgt tggagggag agagaccaga gagtttagag gccaggacca cagttaggat
3361 tgggttgTtt caatactgag agacagctac aataaaagga gagcaattgc ctccctgggg
3421 ctgttcaatc ttctgcattt gtgagtggTt cagtcatgag gttttccaaa agatgttttt
3481 agagttgtaa aaaccatatt tgcagcaaag atttaciaag gcgtatcaga ctatgattgt
3541 tcacaaaaat aggggaatgg tttgatccgc cagttgcaag tagaggcctt totgactctt
3601 aatattcact ttggtgctac taccoccat acctgaggaa ctggccaggt ccttgatcat
3661 ggaactatag agctaccaga catatcctgc tctctaaggg aatttattgc tatcttgcac
3721 cttcttttaa actcaaaaaa catatgcaga cctgacactc aagagtggct agctacacag
```

3781 agtccatcta attttgcaa ctccccccc cgaattc

Annexe 2

Séquence de l'ARN B2. Référence GenBank : AY166681, Homo sapiens non-small cell lung carcinoma noncoding RNA, partial sequence.

```

1 gaggttgcag tgagctgaga tcacgccatt gcactccagc ctgggcaaca agagcaaaac
61 tctgtctcaa aaaaaaaaaa aagtaggatg taactccagt aacatttgaa gagtgccaaag
121 gagtcctctc tttaaagggg tcctacagta tatcagtttt ttgaagcaaa gaagccttta
181 gcaatgccac aatcgctctc gatttatattg attaatTTTT gtaatacttg gttttcttaa
241 agcatggcac acttaaacca gttatattatt ggaatagttt ttgttttcaa agtcactacc
301 aattgaatgt gcagccttca ctggtgtcat taccatgc ttccgtctca ttttgcaaga
361 tagtgttaga actaaagtgg ggggtgacccc aaggcgcctt gagccttggc tccatgttag
421 ggatcccata gaggtactac cacctgatcc tctccacagc ctctgagagt gcacctcaca
481 gcatttgctg ttcagaggag ggaactgagg tctgagaagg aaattcactt gctgaagtta
541 acttgctgcc tccagtgaga ggcaggattg atatttgagc ccacgtctgt ctgactccaa
601 tgctaataatg ttttacatcc cggctgaagg atgatattgc caagccctta aagaagaagg
661 catatttgga cacctcatta gcaatttggg cgctaaatca taccctgttg gccaggaaga
721 attaaagttg ctgcccaggg ctcccacctc aggtccaggg agtagcctca atactgaggg
781 aatctgaatt aaggagcttg gaagttcccc ccacctagct gtagtgggca gtttcagagt
841 gggctgatcc aggagtctg accaggctcag tagggtgatg tctagactcc agtaccactg
901 agaatgttgc tatgttggct ttctctgcca cacagaaaag tcttttcttt ccttttcttt
961 tcttttcttt tttctttttt tttttttttt ttgagacgga ccctccctct gttgaccagg
1021 ctggagtgcg gtggcacaat ctoggctcac cacaacctcc gcctcctggg ttcaagtgat
1081 tctcctgcct tagcctcccg agtagctggg actatgggtg cgcactacca tgcctggcta
1141 atttttgtat ttttagtaga gacaaagttt cactacgttg gcaaggctgg tctcaaaactc
1201 ctgacctcgt gatctgccc cctcggcctc ccaaagtgtt gggattatag gcgtgagcca
1261 ccacgcctgg cctaagactg tctttccaaa tgacttcaaa ttccttcaaa tgggtaactt
1321 catttaacca ggtgggggca cctcccaaaa cacaagttac ccagctttca agttgtggct
1381 ctcatataag gaagtaactt tctttgagag tatttacttg tgaaattata aaagtagtaa
1441 atttctggaa aatgtctaac atgtattgct agcgtaggcc gcagggcatt gagaaacgta
1501 taccgtgcga ctgctggccc agctaaccac gggctctcct cacttctttg tcattaatag
1561 cctgagtaac taactccact ttagttccct caactgtgaa atggcaagtg atgctagatt
1621 atctctaata atctttgcta aaattttatg atccagatat ccttatctga tcttttctca
1681 gaatcacttt aacagtttta taaaaacggc ctgacatcaa gagttttttt ttttttaaa
1741 aaaagatact caagcattga ttataaattt caacttgacc cttaagtttt tgcaaatctt
1801 tcctactctt ccttttaggat ccagccacc atcccatcca gaaccacagt gccctttgga
1861 agacagagct atgccaaaag acagcaggag caggcaggga cacaaggagg cagggactgg
1921 agtgtgctga gccagtgaga atcagtgttt gacagacctg ggtcctgtac ccaaaaaaac
1981 ttccagagtt ccccatlaag gagcactctc atccctgttt tgttaccaag agctaagaaa
2041 gcacttcate ctggaactca ttgttttctg cccattttcc cctatgtaat cctcttggat
2101 tttgcagacg ttttaggcct gttgtctctg gacacgacaa ccaccttcag agctggcacc
2161 gagttctgcc ttgtgagtgg tttgccccat cagccactgc atccctctct ccaactaaac
2221 ctgagcgttc tcctctttag gaagaaatga taccaatcgg catttggttc ccaaaattct
2281 catctctcac ctctctttca cagtcccttt ccccttaggg cagtctgttg gcatctctct
2341 aaaatccatt tcccaatcta gatgtagcgc tcagagtcct gttgaattta tttggacatc
2401 aaaagagcca caatacttgt gcttttttat agttttcttt caaagaacat ttcagtccat
2461 gagacagaaa aaaaatggct ttgctgtatc caactgttca caggcttgta tttggcattg
2521 ttctgagaaa gacctcaacc actcgtgaaa ccagacgtc atttcccgtc gtgttctttc
2581 atgttaaatg cttctagctg ctogctgggtg cttggtcact ctataactaa atattgcttt

```

Annexes

```

2641 agcactggct acacaaagag cttcctgaaa gcagcagggg ggacatgcta ggggcttaac
2701 aataggggca ctgtttccat tgagcgggtt tgctgcccaa cgctgtgtca aatgaaagtg
2761 acccaggagc accactgtct cacttctgag cttccacttg tgactttttc ctactggggg
2821 aaagaagctg gctgtgattt agatgtggct agcaaaaggt ttagttcttg cataaaatca
2881 ggcatcagaa cgactttgaa agaaagtaat tcaccttcaa aaatacatgg ggaaaaaact
2941 tcatgagcac cagagaagca tttggaagag ttaaccttgg acatggctta cgagggtgta
3001 tttttaaggc cagactcagt tttcattata ttgttgctat gcaagtaa ataatgagctc
3061 actgctacac ccaagctggg cagaatgaat ttacagagaa ttaataaatc cagggtaggc
3121 aacatgtggc ttttcttctg gtcatagaga agcaactagt actcttggtt ttaagcagg
3181 caaacctctg tagctttaca gtttctgaaa attggatccc agttcta atg ggcaggcagt
3241 gataatggta atgtttcttt tcctaagggtt ttctttaaag ggaagggatc aaatagttca
3301 ttttaagaca agaggttatt ataaagtcta ataaatactg tggtagctct gtta atgctt
3361 ttcaagggca ttttaagtga agaagccctt tccaacaggc agttttggaa agctaaacac
3421 tcttgttaat tcatgaaacg caaagagaga taatataaat aaatcagggg ctggggagga
3481 attagagata gacaggaagc agtcaaattt tacttcccac atatgccaag aaaagtgcaa
3541 atacatggct gttacttagt aaaacctact tttaaattca gagaatcgta ggtactatga
3601 atgggtgagg tataaatctg taatcattac agcacgggga cactttttaa cttctcatca
3661 attaccatt gttatttctt gagcacatcc tgggttacct agctcctgac taggcattag
3721 ggaaggacac aagaagctga ctccacacat tagtactcta ctaaattcat gggtaaactc
3781 cactgggtcaa taatcaagtc actatctcta tattggaggc aaaggattgc acaattcagg
3841 ctatttgtaa tgttgctttg gattgtagag acttagactc agaggaatca cgggacatag
3901 aatctagaac aggtctgtgt cccatcattc tcttaaaaga aaacctttca agtaatat
3961 cttattatct tttaaaatct tgttaaaatg acaaaatata tatatatatt taatttttaa
4021 aattttgatg catacaaaga tagacataga tagatagata atgtagaagt ataaataata
4081 ataagtcact agagcatgac taactagtga agttaccag tctcctctcc atcccctctc
4141 tctgtctccc atccactcta cccaactctt cctttcaaag agtaggattt ttctgcttcg
4201 tttttttact gctttgttct tacttagggg tgctggaagc acatggaagg agggaaagtag
4261 tcaaaacaag acagtgttgt gaggggagag atgagaagtc atgataagta ggtgggtggg
4321 tgaccacag ggctggcatc agaaggaaac atagcaaaac atgatggata tgaggcttgc
4381 tgtggggagg gggattggcc tttgtgagtg gcagccgtct gctcccttcc cgcttccctt
4441 agtgtcccat tgagctagca gcatgcagct gagaagttga agttctgacc acatggcctc
4501 tgctgccgct gctctgcccc atcccaggca cctagccagc tctgcattaa ggaggtgaag
4561 tggatgcccc aggaaagaag tgccccaaag gagacttgct gagacctga acaagtga
4621 caatgtgagc agaacttgtc ttgacagaaa atgctttgtc tctaggtgtt ccagagagat
4681 gggcaagtgt cctatttctt agtgagagcc tctaaacaaa ccagcttggt aacctccact
4741 gaaaagatct catctgatga gcattttaat aaagtgtcct gagtttgagg gcttgccgtc
4801 tttctcttgg ataaatatct tcatctccta gacttgga aacacatttt ctctgggggt
4861 ttccatttgg cgtgtcttga gctgctctgg tgataaccgt aataatgcca atactgatac
4921 gaacagcaga aaacagtaac cccaagaact ctacagatga tcatcaagga ccactgtctc
4981 ttaccatttg ctgctttggg ttgaaattct cactgcctcg tagatctcat tttgagcact
5041 atacattcct aaagattgat ttctttctat ctgacttaaa tttaggaatg attaaatctt
5101 catttctccc atgatttgat cctaaaacat tttgaaagga aacagccttg agatctgtga
5161 ttactaagac atacataaca ttcttatcac attagaaagc aagaattgac tgttgcttgt
5221 cttgttctcg ttgtcttgtc coctgaattc ctgtttatct ttgattgtat gtgggacatt
5281 gtattttcag tacatttgtg gaaataatgt gaagcctata aagatgttct ctgcctccag
5341 agagaatttt gtttccttct gccagcctca taggcaagca tacatctgat tccatgcttt
5401 gagctgttct ggcaaccctg atgtcttcag cctgtgcaag ggtgggttta cttccagtta
5461 atccttattt tggatacagt ccttaggggt ccaacccaaa gtcgggggtg gtttggggtc
5521 cctgccttgg tgagccctat agtccaatgt tcccccttac ccaaagaagc tgtagaaaac
5581 ccagcacagc ctcccaggca ccagtttcag atcagcaaaa aatagcaaat gccccaggc
5641 ttgaaaagca atctcacctc tattaactct tctccaaag tttgacctag taattcttta
5701 ttatccttga actcttgaca ctattaagaa gatcttttct gctgggcgca gtgggtcacg
5761 cctgtaatcc cagcactttc ggaggccgag gcgggcggat cacgaggtca ggagatcgag
5821 atcgctctgg ctaacacggg aaaaccccgct ctctactaaa aatacaaaaa attagctggg
5881 cacgggtggc ggcgagtggt gcgggtgcct gtagtcccag ctactcgga ggctgaggca
5941 ggagaatggc gtgaactcag gaggcggagc ttgcggtgag ccgagatctc accactgcac

```

Annexes

```

6001 tccagcctgg gcgacagagt aagactctgt ctcaaaaaaa aaaaaaa aaaaaaa
6061 aaaaaaa aaaaagatctt tcctagcttt tcttcatttt ttaagtgtg cttcagcaag
6121 atggttaatc tcaattacct agtccatgat ttctggaagt caaagtcaaa aggtaaaaatc
6181 tatatagcct aggtgacaat tacaataaca ataacaatag ctaaggctta ttatggcttt
6241 atgccaggta ctttatgcac ttgatctcat ttaatactca tatagcctat gagggaagta
6301 taattttccat ttacctatg agaaaacagg cttagaatgg aacctttgtt ctcatagctt
6361 gtgagtggta gaaccgggat ttagatccag ctctgcctga gtccagcttc tgtttgtcaa
6421 ttacttccct cttcagacct aattcttcca ataagcaaca gaaaaagacc cagtggggcc
6481 atggcctctg gcacacagct tctcataaac gagcctatca cacatcccca gaactaaagc
6541 aatcgtatgt tccttctgat gttgaggtaa aaagcagggt ttgttttggg ttcctttttc
6601 caaaacactc ccccatatgt ttctggcttg tggttaagaa gaaccaggt gttcatgtca
6661 catacgagct caactgggga aaaggaaacc atccagcagc cctccttgcc tgccaatagt
6721 ggcttcaccc aacttggggg gcattcttct acagtttctg atttctcaac ttcacctaac
6781 attccttgc cttcttggat cctctctctg cccaacacta ccatgcatgg ctgatagggc
6841 actgttctgc cccatatccc atgggttcta cttaacccag agctggctta cctggaaacc
6901 aagcttattc tgtagtggca gacctcacgc catcttgctt aatagccttc agttttcctt
6961 tagttgatta atgtatcact caatagatta tgcaagacct actctgctag gcaactgtact
7021 aggcctctg gtttatattt aaatgaagag ggaatgatct ctgactttta aatgctggaa
7081 gaagagatga gatgcatcaa gaccgtcaaa ccacaagtga taagtgtgtg cagagatgtg
7141 tggatcactg gctcaggagg ttccaaggat agagacatat tatctgtttg ggaagggctt
7201 ggtgggggaa aggcattcag ccgggccttg aaaatcaatt aaagtttgaa tatgaggaaa
7261 gaaagaagag catctcagac aaggacatgg catggatgaa ggcacagagg tatgggcgtg
7321 cagggcatct gtggaaatgg acagctcagt tctcgccgag ggagggagtt ggtgcagagc
7381 ctgggggccc tgccttcaga agatttccaa gaggaaggag ggcaaaaata cacagatgaa
7441 ggcaaagact ggcagcccg aggccaaaga cgcgttagt ttggccaaga cactgttttt
7501 aaaatttaag tcaattttga aaaccagggt tcacataaaa ttccaaatct ctggcttctg
7561 aaaacgtgaa agatctggca acacagggcg caatgtcttc cctctttcgg tagaaggagt
7621 tctgtctccc cggcaccaa gcctggcttg tttcttccct acaccctgct tgctcgggcc
7681 gtgagcatct gagtatagga cccttgctct gctatgggta ccagctcagg gaacacagat
7741 gcagaaacat cagaaagagt cccaagggcc tctcatccaa cttgctgact gtcatcatgc
7801 tggttctcag acctccctat ctctctctgc tatccaaaca cagaccctcc tctttaaaat
7861 ttcagcatat atggctttca aaattatgag gcatgaaagt gtcaaaagca tctccagaaa
7921 ctcatgccgc caggatctga gactcaaaac agtgtggatc aaacaccatc aaagtgtggg
7981 gtggggcaat tcgagtttgt ttcttgggtt ttatgtaagc agattaatta gagaactaac
8041 ataacgccag tctttgggct tttgatccta tctgccagg acccagactt ggagatgtat
8101 taaatggatt cttccttttc taaatggaag aatctgccct tctcggtctc atagctcttc
8161 tcaaagtctc tgtcttggac cctcccggtt gttactgaga atggtatact aacatctgag
8221 aaaggttggg ttctctctag ggacagaaaa tccacatatg gaaagtgcaa atcctgtgcc
8281 gggtaatcac gaaagcagtt gcagtagcat tggatcatag agccccagga gacctcacia
8341 ttcagcccc ttcttggcaa cactaatgaa ttaagaggtc agtttggtaa ttccaaaggc
8401 taagcctttg taactataaa taaatgcaca gaatgaaagg aatgtagaaa aaaaaaaag
8461 caaacagagg gggaaaggaa atgaaaaacc tgacttgatt tcattgagaa aattagttta
8521 aaaatgtcct ttgtgtagca attcctttta tgccctaccg aacaaatgcc taggagaatt
8581 cttccaaact tgaggtcccc ttaaccagac cttggtgtgc gtcttcagct gaaattcagc
8641 agttctggga ggtggaatga ggagagatcg ttggaagggt tttgtgtact tatgtcacgc
8701 agcaagaaaa agccttaatg aaccacaaaa ctggagactt tgtaagggtac agctcagtca
8761 gcacttttcc tccgaggaga ggacacacaa ttggcatgaa agtgacccaa gcaacagggtc
8821 gaggcagaga atgtccaaaa gtagaagact tcgagctccc tgatcttcca cacgtcacia
8881 tgcggattgc tgcactggac ttggcattta aatgggacca gcattttgca tcttgggtccc
8941 atttaaatgc catttgtgga ccaacgtgaa ttagatggta atgtcaggaa ggctggaatc
9001 ggtggtggcg ggcggggggg gctgtattcg gttggcggtt cccccgtg gttttcacca
9061 tctgtttctt tgaatgcata acaagggaaa atgactgggt tgggaatgcag agttttaaaa
9121 aaccagaaga ccacaggcat cctctaaatg agaaagagag agcaagttgg ggttctgtga
9181 catttgtcag gaagtgaat gttaaatacc gggaagcatt agcgctttct gccagggaag
9241 atccacaaag gcaaggaaac acttttagcg tgaaacctgc ttctttttct gaggtcgtgc
9301 tatgtgttta tatgtcacct agtgctattt tcagacacca acgccacca ctctagctcc

```

Annexes

```

9361 caatccccctt ctggggttttt tgtttgtttg tttgttttgt tttgttttga gacagagtct
9421 ctctctgtca cccaggctgg agtgcagtgg aacgatcttg gctcactgca agctcctcct
9481 cccaggttca cgccattctc ctgcctcagc ctcccaagta gctgggacta caggcgccca
9541 ccaccacacc tggctaattt tgtgtatttt tagtagagat ggggtttcac tgtgttagcc
9601 aggatgggtct cgatctcctg acctcgtgat ccgcgatcct tgccctccca aagcgctggg
9661 attacaagcg tgagccacca cgcccagcct gtttgtttga ttgtttgttt gttttttgag
9721 acggagtttc actctttttg cctaggctgg agtgcagtgg caagatctca gccactgca
9781 acctccgcct ctccaattca agtgattctc ctgcctcagc ctcccagta gctgggatta
9841 caggcacatg tcaccacacc cggctaattt tatattttta gtaaagacgg agtttcacca
9901 tgttggccag gctggtctcc aactcctgac cttaggtgat tctccgcct tggcctccca
9961 aagtgcaggg attacaggca tgagccactg cgcccagcat gcccgcttct gttttttaaa
10021 cgaaagatga acagttaagc tggacttagc cttaggtttt cattagcatt attgctaagt
10081 tggcaacctt ggataaaatc cactcttgga aacttttaag ctgaacaaaa gctgcactat
10141 gagcaggtgc tatgataaag ccaagacagc gctctaagta gaggggctga tgaaatagac
10201 taaggggaga tcttcatttc tctcctggac aatagcgagt aaaaaaaaaa aaacaatcat
10261 ataagggcat taggaacaca ttgtgttttt ctttagcaaa gggcatcctg ctttgaaaag
10321 gaaggtttgc tatgcacaat acagtggcca ttctataaag tggttccgta tgcctcatgc
10381 caacagacct caaagcaata ggttctcttt ttaaacccaa gacagtggag agacttgatg
10441 gaaattttga gtgcatacta atctctttta ctctgttgca agaaacaatc agttgtaagc
10501 actagggatt aaaagccaaa ttgaactcag gcattttgag agcgctggg gagaaggcat
10561 tgggtgcatth ggctgagttc caccattttc agcataagat ggacgtggag catttttcac
10621 atagtctctg aggcagcctg acgccagagt ttctacttca gagaaaggat aaaagttgac
10681 ggtttcttag ggaacaacca actcttctct atttgcaatg tctgttctcc tcaaagatgt
10741 cgtgggcaac gcttgagatg ggcactcaat gactcaaagg gtggggggtta ggcagaaaca
10801 agaccctggg catttagaag cccttgagcg attacatata ttcaaaatg agttaagttc
10861 aaataattht ttgctggtgc ttagcacacc aatgaagtat gtagatatga aaacaggagg
10921 ctgctaggta agattcattt tattggcact ggttccagat gccagcatcg tgatgaacgc
10981 tatttgactt ctgatatccc ttgacgtagg tactgttggg gatgttttct ttctgtgtg
11041 aatgggaaa atgattagag accagaggtc aggagacctg aattctgttc ctggtgcctc
11101 cctgactcag tattttgttt gtttgatacg ttagaatgaa agctcccaga ggtttctaag
11161 gacagcacag tttgagcatt ggctttgtta agtactctg gtgacctgtg gaattacagt
11221 tataatcatc ataataatgt ccaatgaaga ggcatactga ggaaggcatg agaggaattt
11281 taagtggcta aactctattt gcattattca ttttacaat agtttcagag ccttaaagca
11341 aatttcagta tgcggtactt tagatgcaaa atgctcctct aggactttca taagtacac
11401 acaagtatcc cttaaagtat atttcagaaa tatgcttgca gtgcatcaac tctatctgat
11461 gaactttgag atgatcacia ttaagggtga tagagatatt ttagggattt tttttctcat
11521 tgggattcaa gagggattta aaagtttact aacctgggac agatgcagtg gctcacacct
11581 gtaatccctg cacttttggg ggctgaggtg ggtggatcac ctgaggtcag gagtttgaga
11641 ccagccaaca tgatgaaacc ctgtctctac taaaaataca aaaaattagc tgggcatggt
11701 ggcgtgcacc tgtaatctca actactcagg aggctgaggc aggaaaatca cttgaacccg
11761 ggaggcagag gttgctgtaa gctgagattg tgccactgta ctccagcctg gggagcaaga
11821 gcaaaactcc atttcaaaaa aaaaaaaaaa agtttactaa cgtggtgtct acttgtctcc
11881 ttctgttat gtcttctttc tttgggttct ttctatcttt ttatgaggga gagttgaggg
11941 atgagtgtct agttaggagg caaggagatt caaggactca ggcttggaaa ttacacctc
12001 tgtgccttct ctcccacagg tgataacccc cgtgaggaca ggccatggct acgtatacga
12061 gtacccatcc agataccaaa aggacgtcta tgatatccct ctttctcata ccaactcaag
12121 ggtgcgtacc agaacatggt cacaagagga gaagcgcttc taagggtagc attccttcag
12181 ggctgtagag aaaaggaggt tcacaaatta tgcattaata tatgtcatat gaagctttgt
12241 ttaggttgct taccagtag ccacttttag caatgctatt taaattatgt tttctggatt
12301 tgctttatca ggaaatccta gtaatttcac caagagagct tatgttcttc tacaattttg
12361 cttcagaaag tagatttttc tttttttttt tttttttttt taagacagaa tctcactttg
12421 ttgccaggc tggagtgcag tggctctatc tcagctcact gcaacctcca cctccaggc
12481 tcaagcaact ctctgcccc tgctcagct tcccaagtag ctgggactac aggcacacac
12541 accaccatac ctgactaatt tttgtatttt gtagggacag gcttttgcca tgggtggccag
12601 gctggttttg aactcctaac tgcaagtggg ctgccacct cgccctcca aagtgtggg
12661 attacaggtg tgagccacgg ccccagctg gaaagtagaa aatttaaaact acactttaaa

```

Annexes

```
12721 gtacagacag cgtagatatt tcacataaga tctttttttt tttttttttt tttttttttg
12781 agacagagtc ttgttctgtc accaggctgg gagtgcagtg gcacgatctc agctcactgc
12841 aacctctgcc tcccggttc aggcgattct cctgtctcag cctcccaagt agctgggact
12901 acaggtgtgc accaccacac ccagctaatt tttgtatttt tagtagagat ggggttttac
12961 catgttggcc aggatggtct cgatttcttg acctgtgat ctgcccacct cagcctcca
13021 aagtgctggg attacaggcg tgagccaccg tgcttgcca aaatcatttt tatattaaat
13081 gtaagttaaa aaccataaaa tgtattaaaa aaaaaggcaa taaatctggt ataacatgga
13141 gcactgcaa agatcaagct tgtacataac ctggtaaata aatccataat taagtgctta
13201 ggagcataaa aaatgaccaa gtataagaca tttccattct gggtaactca c
```

Annexes

Annexe 3

Fiche descriptive de l'anticorps contrôle anti-Actin.

Annexes

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Actin (C-2): sc-8432



SANTA CRUZ
BIOTECHNOLOGY
The Power to Question

BACKGROUND

All eukaryotic cells express actin, which often constitutes as much as 50% of total cellular protein. Actin filaments can form both stable and labile structures and are crucial components of microvilli and the contractile apparatus of muscle cells. While lower eukaryotes, such as yeast, have only one actin gene, higher eukaryotes have several isoforms encoded by a family of genes. At least six types of actin are present in mammalian tissues and fall into three classes. Alpha actin expression is limited to various types of muscle, whereas beta and gamma are the principle constituents of filaments in other tissues. Members of the small GTPase family regulate the organization of the actin cytoskeleton. Rho controls the assembly of actin stress fibers and focal adhesion, Rac regulates actin filament accumulation at the plasma membrane and Cdc42 stimulates formation of filopodia.

REFERENCES

1. Doolittle, R.F. 1995. The origins and evolution of eukaryotic proteins. *Phil. Trans. Royal Soc. London Biol. Sci.* 349: 235-240.
2. Maccioni, R.B., et al. 1995. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol. Rev.* 75: 835-864.
3. Schutt, C.E., et al. 1995. A discourse on modeling F-actin. *J. Struct. Biol.* 115: 186-198.

SOURCE

Actin (C-2) is a mouse monoclonal antibody epitope mapping at the C-terminus of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG₁ in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

Available as PE conjugate for flow cytometry, sc-8432 PE, 100 tests.

Available as agarose conjugate for immunoprecipitation, sc-8432 AC, 500 µg/0.25 ml agarose in 1 ml.

Available as HRP conjugate for Western blotting, sc-8432 HRP, 200 µg/1 ml.

Available as fluorescein (sc-8432 FITC) or rhodamine (sc-8432 TRITC) conjugates for immunofluorescence, 200 µg/1 ml.

APPLICATIONS:

Actin (C-2) is recommended for detection of a broad range of Actin isoforms of mouse, rat, human and *Xenopus* origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)], immunofluorescence and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and flow cytometry (1 µg per 1 x 10⁶ cells).

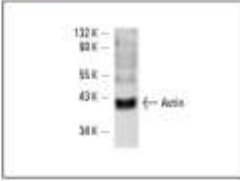
Suitable for use as control antibody for Actin siRNA (h): sc-29191 and Actin siRNA (m): sc-29192.

Positive Controls: C32 whole cell lysate: sc-2205, BC3H1 cell lysate: sc-2299 or Sol8 cell lysate: sc-2249.

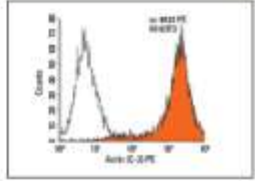
STORAGE

Store at 4° C, ****DO NOT FREEZE****. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

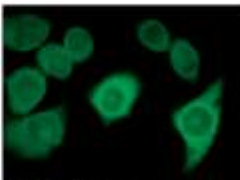
DATA



Actin (C-2): sc-8432. Western blot analysis of Actin expression in C32 whole cell lysate.



Actin (C-2) PE: sc-8432 PE. Intracellular FCM analysis of fixed and permeabilized NIH3T3 cells. Black line histogram represents the isotype control, normal mouse IgG₁: sc-2895.



Actin (C-2): sc-8432. Immunofluorescence staining of methanol-fixed HeLa cells showing cytoskeletal localization.



Actin (C-2): sc-8432. Immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded human prostate carcinoma tissue showing cytoskeletal localization.

SELECT PRODUCT CITATIONS

1. Xiao, G., et al. 2001. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J.* 20: 6805-6815.
2. Perskvist, N., et al. 2002. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-x_L via an oxygen-dependent pathway. *J. Immunol.* 168: 6358-6365.
3. Castro-Alcaraz, S., et al. 2002. NF-kappa B regulation in human neutrophils by nuclear I kappa B alpha: correlation to apoptosis. *J. Immunol.* 169: 3947-3953.
4. Crone, S.A., et al. 2003. Colonic epithelial expression of ErbB2 is required for postnatal maintenance of the enteric nervous system. *Neuron* 37: 29-40.
5. Romanelli, R.G., et al. 2004. Expression and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor in human olfactory GnRH-secreting neurons: an autocrine GnRH loop underlies neuronal migration. *J. Biol. Chem.* 279: 117-126.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

- 251 -

Annexes

Annexe 4

Fiche descriptive de l'anticorps anti-HEF1 partie N-terminale

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Cas-L (2G9): sc-33659



The Power is Question

BACKGROUND

Cas family proteins are adhesion docking molecules that mediate protein-protein interactions and contribute to a number of signal transduction pathways. Cas-L (also designated human enhancer of filamentation (HEF1) and neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9), participates in integrin and growth factor signaling pathways that regulate growth, motility and apoptosis. Cas-L consists of two isoforms, p105 and p115. The larger molecular weight form is a result of Ser/Thr phosphorylation. Cas-L phosphorylation is dependent on cell adhesion and Src kinase activity. Cas-L acts as a downstream effector of FAK in the invasive behavior of glioblastoma cells. TGFβ1 regulates Cas-L gene expression and influences phosphorylation. Adhesion-dependent Actin organization regulates proteasomal turnover of Cas-L through the activity of PP2A. Tyrosine phosphorylated Cas-L can bind FAK in dendrite and soma of neurons after ischemia. Cas-L can promote neurite outgrowth of PC-12 cells.

REFERENCES

1. Law, S.F., et al. 2000. The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5184-5195.
2. Liu, X., et al. 2000. A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *EMBO J.* 19: 6759-6769.
3. Zheng, M., et al. 2002. Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF-β 1 and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 277: 39599-39608.
4. Iwata, S., et al. 2005. HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene* 24: 1262-1271.
5. Pugacheva, E.N., et al. 2005. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* 7: 937-946.
6. Sasaki, T., et al. 2005. Nedd9 protein, a Cas-L homolog, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke* 36: 2457-2462.
7. Natarajan, M., et al. 2005. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*. Published ahead of print.
8. Zheng, M., et al. 2006. Cell adhesion regulates Ser/Thr phosphorylation and proteasomal degradation of HEF1. *J. Cell. Sci.* 119: 96-103.
9. Dadke, D., et al. 2006. Deregulation of HEF1 impairs M-phase progression by disrupting the RhoA activation cycle. *Mol. Biol. Cell.* Published ahead of print.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: NEDD9 (human) mapping to 6p25-p24; Nedd9 (mouse) mapping to 13 A4.

SOURCE

Cas-L (2G9) is a mouse monoclonal antibody raised against amino acids 82-398 of Cas-L of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 µg IgG1 in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

APPLICATIONS

Cas-L (2G9) is recommended for detection of Cas-L of human origin by Western Blotting (starting dilution 1:100, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 µg per 100-500 µg of total protein (1 ml of cell lysate)] and immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

Suitable for use as control antibody for Cas-L siRNA (h): sc-40794.

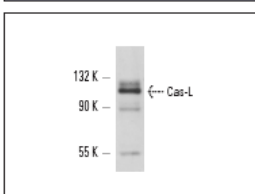
Molecular Weight of Cas-L: 105 kDa.

Positive Controls: MCF7 whole cell lysate: sc-2206, HeLa whole cell lysate: sc-2200 or CTLL-2 cell lysate: sc-2242.

RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005 (dilution range: 1:2000-1:32,000) or Cruz Marker™ compatible goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2031 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use goat anti-mouse IgG-FITC: sc-2010 (dilution range: 1:100-1:400) or goat anti-mouse IgG-TR: sc-2781 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941.

DATA



Cas-L (2G9): sc-33659. Western blot analysis of Cas-L expression in CTLL-2 whole cell lysate.

STORAGE

Store at 4° C. **DO NOT FREEZE**. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

Annexes

Annexe 5

Fiche descriptive de l'anticorps anti-HEF1 partie C-terminale

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

Cas-L (H-70): sc-25503



The Power to Question

BACKGROUND

Cas family proteins are adhesion docking molecules that mediate protein-protein interactions and contribute to a number of signal transduction pathways. Cas-L (also designated human enhancer of filamentation (HEF1) and neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9), participates in integrin and growth factor signaling pathways that regulate growth, motility and apoptosis. Cas-L consists of two isoforms, p105 and p115. The larger molecular weight form is a result of Ser/Thr phosphorylation. Cas-L phosphorylation is dependent on cell adhesion and Src kinase activity. Cas-L acts as a downstream effector of FAK in the invasive behavior of glioblastoma cells. TGF β 1 regulates Cas-L gene expression and influences phosphorylation. Adhesion-dependent Actin organization regulates proteasomal turnover of Cas-L through the activity of PP2A. Tyrosine phosphorylated Cas-L can bind FAK in dendrite and soma of neurons after ischemia. Cas-L can promote neurite outgrowth of PC-12 cells.

REFERENCES

1. Law, S.F., et al. 2000. The docking protein HEF1 is an apoptotic mediator at focal adhesion sites. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5184-5195.
2. Liu, X., et al. 2000. A novel ability of Smad3 to regulate proteasomal degradation of a Cas family member HEF1. *Embo. J.* 19: 6759-6769.
3. Zheng, M., et al. 2002. Regulation of HEF1 expression and phosphorylation by TGF- β 1 and cell adhesion. *J. Biol. Chem.* 277: 39599-39608.
4. Iwata, S., et al. 2005. HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L). *Oncogene* 24: 1262-1271.
5. Pugacheva, E.N., et al. 2005. The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* 7: 937-946.
6. Sasaki, T., et al. 2005. Nedd9 protein, a Cas-L homologue, is upregulated after transient global ischemia in rats: possible involvement of Nedd9 in the differentiation of neurons after ischemia. *Stroke* 36: 2457-2462.
7. Natarajan, M., et al. 2005. HEF1 is a necessary and specific downstream effector of FAK that promotes the migration of glioblastoma cells. *Oncogene*. Published ahead of print.
8. Zheng, M., et al. 2006. Cell adhesion regulates Ser/Thr phosphorylation and proteasomal degradation of HEF1. *J. Cell. Sci.* 119: 96-103.

CHROMOSOMAL LOCATION

Genetic locus: NEDD9 (human) mapping to 6p25-p24; Nedd9 (mouse) mapping to 13 A4.

SOURCE

Cas-L (H-70) is a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 765-834 of Cas-L of human origin.

PRODUCT

Each vial contains 200 μ g IgG in 1.0 ml of PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

APPLICATIONS

Cas-L (H-70) is recommended for detection of Cas-L of mouse, rat and human origin by Western Blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunoprecipitation [1-2 μ g per 100-500 μ g of total protein (1 ml of cell lysate)] and immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500).

Suitable for use as control antibody for Cas-L siRNA (h): sc-40794 and Cas-L siRNA (m): sc-40795.

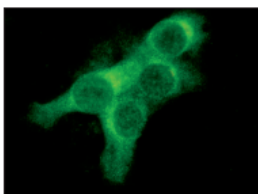
Molecular Weight of Cas-L: 105 kDa.

Positive Controls: HeLa whole cell lysate: sc-2200, MCF7 whole cell lysate: sc-2206, CTLL-2 cell lysate: sc-2242 or NIH/3T3 whole cell lysate: sc-2210.

RECOMMENDED SECONDARY REAGENTS

To ensure optimal results, the following support (secondary) reagents are recommended: 1) Western Blotting: use goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004 (dilution range: 1:2000-1:100,000) or Cruz Marker™ compatible goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2030 (dilution range: 1:2000-1:5000), Cruz Marker™ Molecular Weight Standards: sc-2035, TBS Blotto A Blocking Reagent: sc-2333 and Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048. 2) Immunoprecipitation: use Protein A/G PLUS-Agarose: sc-2003 (0.5 ml agarose/2.0 ml). 3) Immunofluorescence: use goat anti-rabbit IgG-FITC: sc-2012 (dilution range: 1:100-1:400) or goat anti-rabbit IgG-TR: sc-2780 (dilution range: 1:100-1:400) with UltraCruz™ Mounting Medium: sc-24941.

DATA



Cas-L (H-70): sc-25503. Immunofluorescence staining of methanol-fixed NIH/3T3 cells showing cytoplasmic localization.

STORAGE

Store at 4° C, **DO NOT FREEZE**. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

RESEARCH USE

For research use only, not for use in diagnostic procedures.

PROTOCOLS

See our web site at www.scbt.com or our catalog for detailed protocols and support products.

Annexes

Communications

Communications orales :

Moreau, D. (2004). Etude de l'activité antiproliférative de substances extraites de microalgues marines produites en culture contrôlée. In Symposium Molécule Marine à activité AntiTumorale. IFREMER centre de Brest.

Moreau, D. (2006). Etude des activités antiprolifératives et anticancéreuses de substances d'origine naturelle ou synthétique In Université de Printemps, St Nazaire: ISOMer.

Posters :

Breteche, A., Robic, A., Denis, C., Maillard, S., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Debitus, C., Hooper, J., Moreau, D., Wielgosz-Collin, G., Kornprobst, J.-M. & Barnathan, G. (2005). Antitumor glycolipids from some marine sponge. In European Conference on Marine Natural Products: Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Ioannou, E., Tzakou, O., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005). Clavularane diterpenes from the brown alga

Annexes

Dilophus spiralis. In European Conference on Marine Natural Products: Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Kaldi, M., Vagias, C., Furnari, G., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005). Cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. In European Conference on Marine Natural Products: Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris.

Publications

Abatis, D., Vagias, C., Galanakis, D., Norris, J.N., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005). Atomarianones A and B: two cytotoxic meroditerpenes from the brown alga *Taonia atomaria*. *Tetrahedron Letters*, 46, 8525-8529.

Carbonnelle, D., Jacquot, C., Moreau, D., Chinou, I., Roussis, V., Tomasoni, C., Jugé, M. & Roussakis, C. (2006). Up-regulation of CDK1 mRNA after Cucurbitacin-D-induced proliferation arrest of a Non-Small Cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6). *Internationale Journal of Oncology*, submitted.

Jacquot, C., Moreau, D., Tomasoni, C., Juge, M., Coiffard, L., Roussis, V. & Roussakis, C. (2003). Proliferation arrest in G1 phase of a non-small cell lung cancer cell line (NSCLC-N6) treated by an original compound methyl-4-methoxy-3-(3-methyl-2-butanoyl) benzoate (VT1) independently of the p53/p21 cascade. *International Journal of Oncology*, 23, 495-501.

Kladi, M., Vagias, C., Furnari, G., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005). Cytotoxic cuparene sesquiterpenes from *Laurencia microcladia*. *Tetrahedron Letters*, 46, 5723-5726.

Kontiza, I., Vagias, C., Jakupovic, J., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005). Cymodienol and cymodiene: new cytotoxic diarylheptanoids from the sea grass *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron Letters*, 46, 2845-2847.

Moreau, D., Jacquot, C., Chinou, I., Tomasoni, C., Jugé, M., Séraphin, D., Guilet, D., Richomme, P. & Roussakis, C. (2006 (submitted)). Induced proliferation arrest of a non-small cell lung carcinoma cell line (NSCLC-N6) by a new 4-phenylcoumarin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

Moreau, D., Thomas-Guyon, H., Jacquot, C., Juge, M., Culioli, G., Ortalo-Magne, A., Piovetti, L. & Roussakis, C. (2006). An extract from the brown alga *Bifurcaria bifurcata* induces irreversible arrest of cell proliferation in a non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line. *Journal of Applied Phycology*, 18, 87-93.

Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R., Le Guedes, R., Cadoret, J.-P., Muller-Feuga, A., Kontiza, I., Vagias, C., Roussis, V. & Roussakis, C. (2006). Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents

Annexes

in bronchopulmonary and epithelial cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22, 97-103.

Moreau, D., Jacquot, C., Tsita, P., Chinou, I., Tomasoni, C., Juge, M., Antoniadou-Vyza, E. & Roussakis, C. (2006 (submitted)). Innovative drug inductor of new molecular target, with antitumor activity against Non Small Cell Lung Cancer. *Proceeding of the National academy of Sciences of the United States of America*.

Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2004). Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry*, 65, 1159-1164.

Tsotinis, A., Gerasimopoulou, M., Vlachou, M., Moreau, D. & Roussakis, C. (2006). C5,C6-disubstituted 1H-indole-2-carboxamides: Synthesis and cytotoxic activity in the human non-small lung cancer cell line NSCLC-N16-L16. *Letters in Drug Design and Discovery*, 3, 14-16.



Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines

Dimitri Moreau^{a,*}, Christophe Tomasoni^a, Catherine Jacquot^a, Raymond Kaas^b,
Roland Le Guedes^b, Jean-Paul Cadoret^b, Arnaud Muller-Feuga^b, Ioanna Kontiza^c,
Constantinos Vagias^c, Vassilios Roussis^c, Christos Roussakis^a

^a Laboratoire de Pharmacologie Marine, ISOMer, Faculté de Pharmacie de Nantes, 1 rue Gaston Veil, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 03, France

^b Laboratoire de Physiologie et Biotechnologie des Algues, IFREMER, rue de l'Île d'Yeu, BP 1105, 44311 Nantes Cedex 03, France

^c University of Athens, Department of Pharmacy, Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15771, Greece

Received 10 November 2005; accepted 9 January 2006

Available online 6 March 2006

Abstract

The antiproliferative activities of several extracts from cultivated microalgae in France have been studied against bronchopulmonary and epithelial cell lines, respectively (A549, NSCLC-N6 and SRA 01/04). The algal extracts, of Diatomae (*Odontella aurita*, *Chaetoseris* sp.), as well as of Haptophyceae: *Isochrysis aff. galbana*, appeared as the most active among all the assayed species, expressing a broad spectrum of in vitro antiproliferative activity of well-differentiated pathologic cells such as NSCLC-N6 by terminal differentiation. Bio-guided fractionation of the above referred extracts, led us to the isolation, of the carotenoid fucoxanthin. Fucoxanthin has been structurally determined, through modern spectral means and has been studied separately for its activities.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Odontella aurita*; Antiproliferative activities; Bronchopulmonary carcinoma; Secondary cataract; Apoptosis; Fucoxanthin

1. Introduction

Marine microalgae comprise the largest group of living organisms in the oceans, constituting an estimated 10,000 species. Algae are at the base of entire aquatic food chain. Therefore, it is not surprising that the microalgae, which compose the phytoplankton, play a vital role in the rearing of aquatic animals like molluscs, shrimps and fish. Moreover, there are numerous applications for molecules from these phototropic microorganisms in human and animal food, health and cosme-tology (Muller-Feuga, 2000).

In recent years, there has been a growing interest in functional foods, that is, foods able to provide additional physiological benefits for human health, other than the basic nutritional and

energetic requirements (Bidlack, 1994). Often, functional foods are traditional foods enriched with an ingredient able to provide or promote a specific beneficial action for human health. These are called functional ingredients. These ingredients are preferred to have a natural origin, such as plants or perhaps algae and/or microalgae. These types of marine sources are receiving increasing attention mainly for their content in, for example, polyunsaturated fatty acids and, β -carotene and other pigments (antioxidants), sulphated polysaccharides and sterols (antimicrobials).

One of the main interests in our laboratories is to assess the suitability obtained from extracts and pure compounds from cultivated microalgae, like the ones which they have been studied, as food antioxidants and preventative agents against secondary cataract and cancer.

In this work, a preliminary screening of ten marine and fresh water species from different orders (Diatomophyceae, Rhodophyceae, Haptophyceae, Cryptophyceae, Prasinophyceae

* Corresponding author. Tel.: +33 2511 25672; fax: +33 2511 25690.
E-mail address: dimitri.moreau@univ-nantes.fr (D. Moreau).

Annexes

Table 1
Detail of the different strains studied, with the source and the optimal condition of growing

Order	Species	Source	Medium	pH	T (°C)
Diatomophyceae	<i>Odontella aurita</i>	IFREMER	Conway	7.5	20
	<i>Chaetoceros</i> sp.	ccap 1010/11	Conway	7.5	20
	<i>Porphyridium purpureum</i>	SAG 111/79	Hemerick	7	20
Rhodophyceae	<i>Rhodella violacea</i>	SAG 115/79	Conway	7	24
	<i>Galdieria sulphuraria</i> ^a	074W	Galdi	2	45
	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ^a	PG 27	MMG/TAP	7	24
Haptophyceae	<i>Isochrysis affinis galbana</i>	IFREMER	Conway	7	20
Cryptophyceae	<i>Rhodomonas salina</i>	ccap 978/24	Conway	7	22
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis suecica</i>	ccmp 904	Conway	7	20
Dinophyceae	<i>Heterocapsa triquetra</i>	IFREMER	ESP	7.8	22

G. sulphuraria source: Institut für biologie, Freie Universität, Berlin.

^a Fresh water microalgae.

and Dinophyceae) were investigated as natural source of antiproliferative agents in vitro against asynchronous cells of human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma line (NSCLC-N6) (Roussakis et al., 1991), human lung epithelial cell line (A549)

and against a proliferative human lens epithelial cell line (SRA 01/04). Bio-guided fractionation of the extracts, which appeared as the most active, led us to the isolation of the carotenoid fucoxanthin, which has been also thoroughly assayed. In all cases, the

Table 2
Composition of the different media used for algal culture

Products	Medium				
	Hemerick	Conway	Galdi	MMG/TAP	ESP
NaNO ₃ (g L ⁻¹)	1.7	0.1			0.07
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g L ⁻¹)			1.5		
NH ₄ Cl (g L ⁻¹)				0.4	
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O (g L ⁻¹)	0.175			0.106	
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	0.175		0.3	0.053	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (g L ⁻¹)		0.02			
Na ₂ C ₃ H ₇ O ₆ P·5H ₂ O (g L ⁻¹)					0.01
Na ₂ SiO ₃ ·5H ₂ O (g L ⁻¹)		0.1			
FeEDTA	0.05		0.014		
Na ₂ EDTA·2H ₂ O (g L ⁻¹)	0.049	0.045			0.008
CaCl ₂ ·2H ₂ O (g L ⁻¹)	1.47		0.02	0.05	
KCl (g L ⁻¹)	0.75				
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g L ⁻¹)	12.3		0.3	0.1	
MgSO ₄ ·H ₂ O (g L ⁻¹)					0.00082
NaCl (g L ⁻¹)	29.0				
Tris (g L ⁻¹)					0.1
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (μg L ⁻¹)			0.08		
CoCl ₂ ·6H ₂ O (μg L ⁻¹)		20.0	80	2.927	
CoSO ₄ ·7H ₂ O (μg L ⁻¹)	0.091				24
CuSO ₄ ·5H ₂ O (μg L ⁻¹)	0.08	20.0	160	2.855	
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O (μg L ⁻¹)					3510
FeCl ₃ ·6H ₂ O (μg L ⁻¹)		1.3			245
FeSO ₄ ·7H ₂ O (μg L ⁻¹)				9.073	
H ₃ BO ₃	2.0	33.6	5720	20.73	5700
MnCl ₂ ·4H ₂ O (μg L ⁻¹)	1.8	0.36	3640	9.2	
Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) ₆ ·4H ₂ O (μg L ⁻¹)	20	9.0	260	2.0	
NaVO ₃ ·4H ₂ O (μg L ⁻¹)			80		
O ₅ SV·5H ₂ O (μg L ⁻¹)	0.043				
ZnCl ₂ (μg L ⁻¹)		21			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (μg L ⁻¹)	0.213		0.44	40	11000
Vitamin B12 (μg L ⁻¹)		10			2
Thiamin (μg L ⁻¹)		200			100
Biotin (μg L ⁻¹)					1
QSP L (μg L ⁻¹)	FW	MW	FW	FW	MW

Mineral nutrient and their concentration (1 ×).

Table 3
IC₅₀ for all assayed microalgal extracts, with different solvents, against three cell lines

Species	Cell lines								
	SRA			A549			NSCLC-N6		
	EtOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	EtOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O	EtOH	CH ₂ Cl ₂	H ₂ O
<i>O. aurita</i>	18.4 ± 1.4	18.2 ± 0.4	9.1 ± 1.3	–	–	20.6 ± 0.5	55.8 ± 3.7	36.9 ± 1.5	42.6 ± 5.8
<i>Chaetoceros</i> sp.	15.5 ± 0.5	13.5 ± 0.9	7.8 ± 0.3	–	41.5 ± 3.8	61.1 ± 8.6	–	13.5 ± 2.4	–
<i>P. purpureum</i>	–	–	0.5 ± 0.1	–	–	13.9 ± 0.4	–	–	6.3 ± 0.5
<i>R. violacea</i>	–	26.7 ± 2.5	50.8 ± 2.6	–	–	–	–	–	–
<i>G. sulphuraria</i>	41.3 ± 3.8	10 ± 0.6	<0.366 ± 0.05	–	37.3 ± 2.5	9.1 ± 1.3	–	18.7 ± 2.5	4.8 ± 0.5
<i>C. reinhardtii</i>	–	–	11.1 ± 0.3	–	–	16 ± 2.2	–	36.6 ± 0.6	24.6 ± 2
<i>I. affinis galbana</i>	20.7 ± 3.4	25.4 ± 1.7	26.2 ± 1.4	24.6 ± 1.3	40.7 ± 2.6	–	21.6 ± 4.3	14.5 ± 1.8	17.3 ± 2.8
<i>R. salina</i>	28.1 ± 1.5	8.2 ± 1.5	–	–	–	–	–	–	–
<i>T. suecica</i>	–	12.3 ± 2.5	–	–	–	–	–	45.3 ± 10.1	17.6 ± 5
<i>H. triquetra</i>	19.7 ± 1.4	36.8 ± 1.5	8.2 ± 1.6	–	–	–	21.4 ± 2.4	–	13.8 ± 0.3

The results are expressed in µg/ml.

studied organisms were isolated from natural population and cultured in controlled manner in laboratory (Muller-Feuga et al., 2003).

In the literature, there are several reports on the fatty acid, lipid, amino-acids and sugar composition of almost all microalgae used in mariculture (Volkman et al., 1989; Servel et al., 1989; Brown, 1991), because mostly of the importance of these data, for determining the nutritional value of the microalgae as food for animals in mariculture. Especially for the diatom *Odontella aurita*, the isolation and structure elucidation of a new sterol sulfate has been published (Toume and Ishibashi, 2002). No studies have been reported, to our knowledge, on any other chemical constituents of the assayed microalgae.

2. Materials and methods

2.1. Microalgal materials, culture conditions and chemicals

Studied species were isolated from their natural environment and were cultured in our laboratory. All parameters of culture (different sources of strains, culture media, pH, growing temperature conditions) are presented in details in Table 1. Details on the composition of several media used are presented in Table 2. Unialgal cultures were carried out in batch conditions in 10 l glass bottles, under constant light and aeration (air/CO₂ mixture, 99:1). Every 4 days the medium was supplemented with 1 × nutrient (Table 2), until the cell concentration achieved the stationary phase.

Water in all cases was sterile and distilled and solvents were analytical grade Cyclohexane (Lab-scan), EtOAc (Lab-scan), MeOH . . . Acetone, DMSO, etc.

2.2. Preparation of algal extracts

All algae were recovered from culture, in the stationary phase, by centrifugation at low speed and low temperature (4 °C). The algal residue was freeze dried

before extraction and then it was then re-suspended in ethanol 100% (400 ml/g of dried weight), dichloromethane (400 ml/g of dried weight) and water, respectively, so that three extracts of different polarities to be prepared. All extracts were filtered, and evaporated under vacuum at low temperature (<45 °C). All organic extracts were dissolved with dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted in water at 1 mg/ml, before testing on cancer cell line. The final concentration of DMSO used to dissolve extracts did not exceed 0.2% and had no effect on the proliferation of the cells (results not shown). Aqueous extracts were directly diluted in water at 1 mg/ml.

2.3. Strains and media, cell lines and culture

The NSCLC-N6-L16 cell line (Roussakis et al., 1991), derived from a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (moderately differentiated, rarely keratinizing, classified as T2N0M0), and A549 obtained from ATCC collection reference CCL6185 (Giard et al., 1973), were used for all experiments. Both cell lines were cultured in RPMI 1640 medium with 5% fetal calf serum, to which were added 100 IU penicillin ml⁻¹, 100 µg streptomycin ml⁻¹ and 2 mM glutamine, at 37 °C in an air/carbon dioxide (95:5 v/v) atmosphere. In these conditions, cell doubling time was 48 h. Cells used in all experiments never exceeded 35 passages.

Human Lens Epithelial cell line, SRA 01/04, which was established by transfection with large T-antigen of SV40 (Ibaraki et al., 1998) was cultured in antibiotic-free Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biocrom KG) supplemented with 4% foetal calf serum and incubated in the same conditions described for L16 and A549.

2.4. Cytotoxicity determinations: continuous drug exposure

Experiments were performed in 96 wells microtiter plates (10⁵ cells ml⁻¹ for NSCLC-N6, 2 × 10⁴ cells ml⁻¹ for A549 and 3 × 10⁴ cells ml⁻¹ for SRA). Cell growth was estimated by a colorimetric assay based on the conservation of tetrazolium dye (MTT) to a blue formazan product by live mitochondria (Mosmann, 1983). Eight repeats were performed for each concentration. Control growth was estimated from eight determinations. Optical density at 570 nm

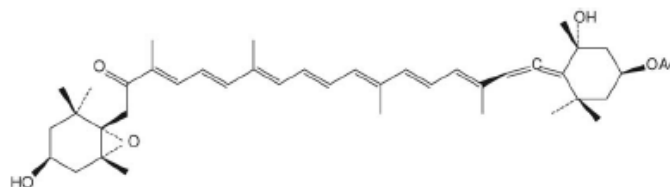


Fig. 1. Chemical structure of fucoxanthin.

Annexes

100

D. Moreau et al. / Environmental Toxicology and Pharmacology 22 (2006) 97–103

corresponding to solubilized formazan was read for each well on a Titertek Multiskan MKII.

2.5. Cytotoxicity determinations: discontinuous drug exposure

Cells were incubated for 72 h in 96 wells microtiter at the concentration of 5×10^4 cells ml^{-1} for NSCLC-N6, 10^4 cells ml^{-1} for A549 and 1.5×10^4 cells ml^{-1} for SRA in the culture conditions described above, and in the presence or absence of the drug. After 72 h medium was removed, cells were washed with phosphate-buffered saline to eliminate drug traces, and then 100 μl fresh medium containing no drug were placed in each wells. Cell growth was evaluated by the colorimetric assay of Mosmann using MTT (Mosmann, 1983).

2.6. Extractions and solvent fractionation

Due to the results of cytotoxic assays, the dichloromethane extract of *O. aurita* was primary selected for the bio-guided fractionation and the isolation and determination of the active compounds. Then total dichloromethane extract was first subjected to silica gel column chromatography (CC), using mixtures of CH_2Cl_2 /acetone/EtOH (from CH_2Cl_2 100% to EtOH 100%), to afford five frs.: fr. 1 has been eluted with CH_2Cl_2 , fr. 2 with 100% CH_2Cl_2 , fr. 3 with CH_2Cl_2 /acetone (70:30), fr. 4 with CH_2Cl_2 /acetone (50:50), and finally fr. 5 with 100% EtOH. After testing on NSCLC-N6 cell lines, the only active fraction (fr. 3) was further purified after has been subjected to vacuum column chromatography on silica gel (VLC, 60H, Merck). Fifteen fractions were obtained (named frs. 3.1–3.15), using 100 ml of mixtures of cyclohexane/EtOAc/MeOH of increasing polarity. After a new test of the purified extract, the identification of active compound was done through modern spectral means.

The $[\text{M}]^+$ ion of compound 3.10 atm. m/z 658, in combination with the ^{13}C NMR data required a $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{O}_6$ molecular formula. Characteristic were the overlapping peaks at δ 6.09–6.69 ppm consisted with conjugated double bonds intergrading for nine protons. Obvious were four singlets at 1.92, 1.97, 1.79, 1.97 resulting from four vinylic methyls, as well as a multiplet peak at 5.36 due to an oxidized methine. Moreover characteristic was at the ^{13}C NMR spectrum the presence of an allene moiety [δ : 117.5 (C-6'), 202.4 (C-7'), 103.5 (C-8')]. These evidences lead to the assumption that compound 3.10 was (3*S*,5*R*,6*S*,3'*S*,5'*R*,6'*R*)-fucoxanthin, also according to international literature (Haugan et al., 1992).

2.7. Detection of apoptotic cells in fucoxanthin

The detections of apoptotic cells were performed for all three cell lines under the same conditions. Cells were incubated in the presence of 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fucoxanthin for 72 h; for the studied of DNA fragmentation, the DNA was extract with a classical phenol/chloroform protocol. Then an electrophoresis was performed on agarose gel for all the DNA extracts. For the observation of apoptotic cells, they were stained with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of acridin orange for 15 min in the dark. The results were observed using a fluorescence microscope, Olympus AX70^B, with exciter filter BP 450–480.

3. Results and discussion

3.1. Inhibitory effect of algal extracts on cell lines

For each one of the tested extracts, the concentration required to reduce cell growth by 50% (IC_{50}) was determined and results are shown in Table 3 for all cell lines. Almost a 73% of the assayed extracts showed moderate to strong activity against SRA cell line, while only 53% and 30% exhibited activity against NSCLC-N6 and A549 cell lines, respectively.

3.2. Chemical composition of active compound from *O. aurita*

The concentration of frs. 3 and 3.10 required to reduce L16 cell growth by 50% was determined as previously described, and

their IC_{50} were found 8.5 and 7 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$, respectively, after 72 h of treatment. Through the NMR spectra as well through international literature it has been identified that fr. 3.10 was pure fucoxanthin Fig. 1. The thin layer chromatography of *Chaetoceros* sp. and *I. aff. galbana* dichloromethane extracts show a wide quantity of fucoxanthin as for *O. aurita*, certainly responsible of the activities observed.

3.3. Growth inhibition by continuous and discontinuous drug exposure

Fig. 2 illustrated the growth kinetics of NSCLC-N6 cells in the presence (from 5 to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$) and absence (control) of the fucoxanthin. The inhibitory effect of fucoxanthin was dose-

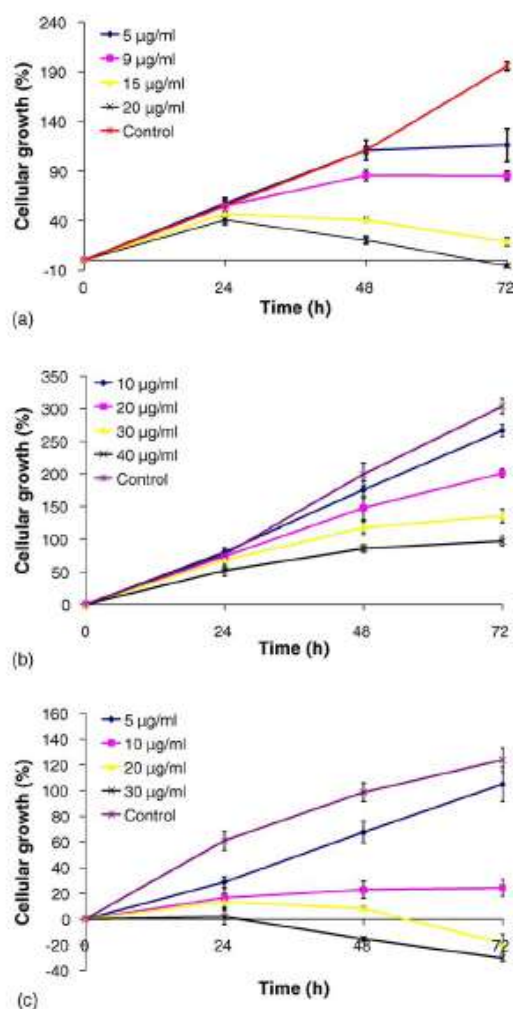


Fig. 2. Effect of the carotenoid fucoxanthin on the cell growth of NSCLC-N6 (a); A549 (b) and SRA (c) cell-lines; growth kinetics versus time after continuous exposure to drug at different concentrations. The proliferation is reduced for the three cell line in a dose dependant manner and we can observe a plateau after 24 h of treatment.

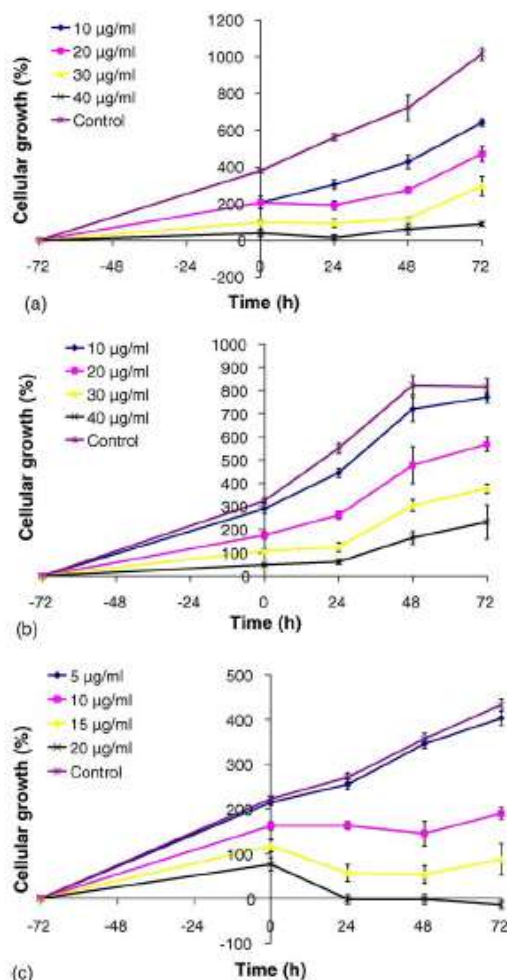


Fig. 3. Effect of fucoxanthin on the cell growth of the NSCLC-N6 (a), A549 (b), SRA (c) cell lines: growth kinetics versus time after discontinuous exposure to drug at different concentrations. The cell growth is apparently blocked after 72 h of treatment for the three cell lines at different concentration.

dependent and only observed with a continuous drug exposure. The profile obtained was typical of cytostatic activity. Fig. 3 depicted the growth pattern of NSCLC-N6 cell line in a drug free medium with populations pre-treated for 72 h in the presence ($10\text{--}25\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) and absence (control) of fucoxanthin. This results show that the effect of fucoxanthin is irreversible and confirm its cytostatic activity against NSCLC-N6 cell-line since $10\text{ }\mu\text{g/ml}$.

3.4. Induction of apoptosis

Fig. 4 has been showed that the treatment by fucoxanthin induces a DNA fragmentation typical of apoptotic cells. It can be seen a typical fragment around 185 bp (Au et al., 1997). The electrophoresis showed also, the same DNA ladder for the bronchopulmonary cell lines treated by fucoxanthin. The

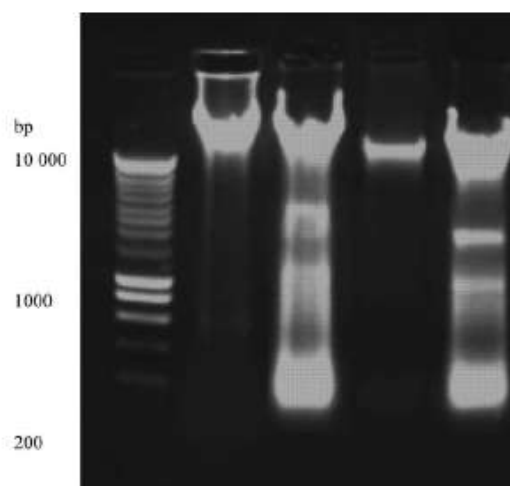


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of the DNA extract from witness and treated cells with $15\text{ }\mu\text{g/ml}$ fucoxanthin. Lane (1): DNA marker (SmartLadder®, eurogentec), lanes (2, 3) NSCLC-N6, lanes (4, 5) A549.

exposure of the cells to fucoxanthin for 72 h, clearly induced morphological change such as rounding up, reduction of cell volume, chromatin condensation, nuclei fragmentation and formation of apoptotic bodies for the two bronchopulmonary cells lines (Figs. 4 and 5). For SRA no apoptosis induction has been observed.

Indeed, the greatest interests of microalgae, is that they can be produced in controlled condition with a low cost, and that they are adapted to a wide variety of environments favour to an exceptional biochemical production. In this study, a screening of new antiproliferative compounds from 10 different species of microalgae, has been taken place. So, a preliminary study of their crude extracts was first necessary to evaluate the presence of new potent cytotoxic and/or cytostatic compounds. Then, the results have been demonstrated, the real extraordinary potential of the microalgae for the discovery of active extracts. Through this screening, it has been already permitted to identify more than 10 extracts active on three cell lines and two different pathologies.

After the identification, through the bioguided fractionation, of the carotenoid fucoxanthin as the responsible agent of the activity observed by the dichloromethane extracts of the diatoms microalgae, it has been also investigated the cytostatic activity of this molecule. The expressed antiproliferative effect of this compound, has been studied by characterizing the kinetics of cell growth induced by continuous and acontinuous treatment and observing the induced apoptosis. Through all these parameters observed, can be suggested that fucoxanthin could trigger the terminal differentiation of cancerous cells in vitro. It has been already reported that fucoxanthin induces apoptosis in human leukemia, prostate and colon cancer cells (Kotake-Nara et al., 2001; Hosokawa et al., 1999, 2004). Furthermore, it has been previously also demonstrated, an inhibitory effect of fucoxanthin on *N*-myc expression and on cell cycle progression for human neuroblastoma cell line (Okuzumi et al., 1990). But it is the first time that it has been demonstrated an arrest in

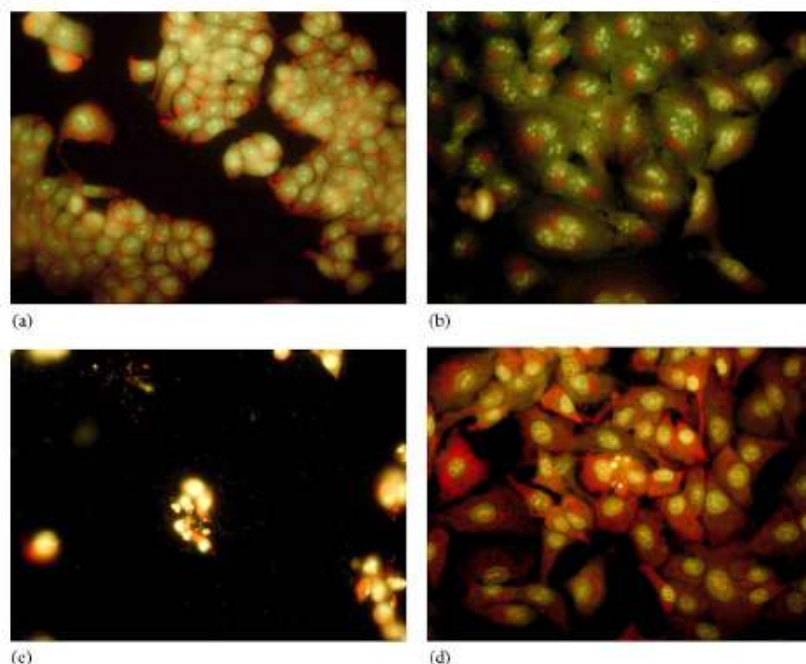


Fig. 5. Observation of cells stained with acridin orange. Morphological comparison by fluorescence microscopy of treated cells by fucoxanthin and control cells (a, b) NSCLC-N6; (c, d) A549.

G0/G1 phase of the GOTO cells by fucoxanthin as well as that induces apoptosis in lung cancer and in human lens epithelial cells.

The structures of carotenoids are of great interest, in the reduction of growth as well as in apoptosis induction, against cancer cells. Many studies have been also reported the antioxidant activity of fucoxanthin (Nomura et al., 1997; Murakami et al., 2000). In contrast, the pro-oxidant action of carotenoids is shown to induce apoptosis through the production of reactive oxygen species (Paloza et al., 2003). This suggests that carotenoids act either as an antioxidant or as a pro-oxidant, in dependence on their environment.

In conclusion, the studied microalgae appeared to be efficient and safe antiproliferative agents. Interestingly, the species *O. aurita*, *Chaetoceros* sp. and *I. aff. galbana* are proved as rich sources of the carotenoid fucoxanthin. This molecule exhibited cytostatic activity and this effect could have important implications for the application of mixtures of this kind of microalgae in food manufacturing and the formulation of ocular implant products used in cataract treatment.

References

- Au, J.L.-S., Panchal, N., Li, D., Gan, Y., 1997. Apoptosis: a new pharmacodynamic endpoint. *Pharmaceut. Res.* 14, 1659–1671.
- Bidlack, W.R., 1994. Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals. In: Goldberg, I. (Ed.), *Trends in Food Science and Technology*, vol. 6. Chapman and Hall, pp. 66–67.
- Brown, M.R., 1991. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 145, 79–99.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Amstein, P., Kersey, J.H., et al., 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417–1423.
- Haugan, A., Englert, G., Glinz, E., Liaaen-Jensen, S., 1992. *Acta Chem. Scand.* 46, 389–395.
- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., et al., 1999. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell HL-60. *Food Sci. Technol. Res.* 5, 243–246.
- Hosokawa, M., Kudo, M., Maeda, H., Kohno, H., Tanaka, T., Miyashita, K., 2004. Fucoxanthin induces apoptosis and enhances the antiproliferative effect of the PPAR[gamma] ligand, troglitazone, on colon cancer cells. *Biochim. et Biophys. Acta (BBA)-Gen. Sub.* 1675, 113–119.
- Ibaraki, N., Chen, S.C., Lin, L., Okamoto, H., Pipas, J.M., Reddy, V., 1998. Human lens epithelial cell line. *Exp. Eye Res.* 67, 577–585.
- Kotake-Nara, E., Kushi, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., Nagao, A., 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* 131, 3303–3306.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Muller-Feuga, A., 2000. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *J. Appl. Phycol.* 12, 527–534.
- Muller-Feuga, A., Le Guedes, R., Pruvost, J., 2003. Benefits and limitations of modeling for optimization of *Porphyridium cruentum* cultures in an annular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 103, 153–163.
- Murakami, A., Nakashima, M., Koshihara, T., Maoka, T., Nishino, H., et al., 2000. Modifying effects of carotenoids on superoxide and nitric oxide generation from stimulated leukocytes. *Cancer Lett.* 149, 115–123.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y., 1997. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 42, 361–370.
- Okuzumi, J., Nishino, H., Murakami, M., Iwashima, A., Tanaka, Y., et al., 1990. Inhibitory effects of fucoxanthin, a natural carotenoid, on N-myc expression and cell cycle progression in human malignant tumor cells. *Cancer Lett.* 55, 75–81.

Annexes

- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Di Nicuolo, F., Piccioni, E., et al., 2003. Carotene regulates NF-B DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. *J. Nutr.* 133, 381–388.
- Roussakis, C., Gratas, C., Audouin, A.F., Le Boterff, J., Dabouis, C., et al., 1991. Study of in vitro drug sensitivity on a newly established cell line from a primary bronchial epidermoid carcinoma of human origin (NSCLCN6). *Anticancer Res.* 11, 2239–2244.
- Servel, M.-O., Claire, C., Derrien, A., Coiffard, L., De Roeck-Holtzhauer, Y., 1989. Fatty acid composition of some marine microalgae. *Phytochemistry* 36, 691–693.
- Toume, K., Ishibashi, M., 2002. 5[alpha],8[alpha]-Epidioxysterol sulfate from a diatom *Odontella aurita*. *Phytochemistry* 61, 359–360.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I., Garland, C.D., 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128, 219–240.

Innovative drug inductor of new molecular targets, with antitumor activity against Non Small Cell Lung Cancer.

Dimitri Moreau^{*}, Catherine Jacquot^{*}, Polyxeni Tsita[‡], Ioanna Chinou[§], Cristophe Tomasoni^{*}, Marcel Jugé^{*}, Ekaterini Antoniadou-Vyza[‡], Christos Roussakis^{*†}.

^{*}Laboratoire de Pharmacologie Marine, ISOMer, Faculté de Pharmacie de Nantes, 1 rue Gaston Veil, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 03, France ; [‡]Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15701, Greece; [§]Division of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, Athens 15771, Greece

Abstract

In spite of our growing insight into carcinogenesis, treatment of tumors, especially non-small cell lung cancer (NSCLC), remains limited and it is urgent to develop strategies that target tumor cells and their genetic features. Drug discovery efforts have historically focused on the search for compounds that modulate the protein products of genes. Current drug therapy targets only a few hundred endogenous targets, mainly proteins, such as receptors and enzymes. But now, the interest in specifically targeting RNA is increasing, both for target validation and/or therapeutic purposes. In this regard, our work was concerned with the induction of new molecular targets correlated to a cytostatic effect on NSCLC cell line, after treatment with a new triazin named A190. The *in vitro* study of cell cycle and apoptosis induction demonstrated the antiproliferative potential of this new compounds, and the use of quantitative RT-PCR analysis permitted to display an original mechanism of action involving two genes: HEF1 and B2. The antitumor effect was also confirmed by the good results *in vivo* on nude mice xenografts.

Introduction

Cancer is a genetic disease with alterations translating to the proteomic level which favour cell survival, proliferation, angiogenesis and metastasis. Completion of the human genome sequencing unveiled an estimated number of 35,000 genes and their multiple RNA splice variants. To fully exploit this information for targeted cancer therapy, high throughput genomic and proteomic technologies have been applied to identify a plethora of targets involved in the malignant phenotype that need to be validated and prioritized as therapeutic target. Actually, the specificity of chemotherapeutic agents is a priority for the discovery of

Annexes

new treatments. Also, one of the new aims of cancer therapy is to find molecules able targeting the genetic mechanisms implicated in cancer cell proliferation.

Lung cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide. It is the most common incident form of cancer in Europe (1), and the third most common in the USA, accounting for approximately 13% of all cancer diagnoses in both regions. The overall 5-year survival rate is only 15%.

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is found in approximately 85% of patients with lung cancer (2, 3), and the majority of these patients (more than 70%) present with unresectable locally advanced or metastatic diseases, which are at present incurable (2, 3). Following the introduction of some agents combined, like *cis*-platin or carboplatin plus the newer agents gemcitabine, vinorelbine, paclitaxel, and docetaxel (4-7), improvements in outcome have been seen over the past 10 years, but now a 'plateau' in terms of survival appears to have been reached (8).

Then, new more effective therapies are required for NSCLC in order to further improve survival, and molecularly targeted agents may represent a novel approach to treatment (9), in both the first-line and second-line settings (10, 11). In this perspective, our laboratory is working on the screening of original compounds, issue from natural or synthetic chemistry, to find new molecules with innovative mechanisms of action (12-14). It is known from our previous studies that, the chemoresistance observed for NSCLC is largely due to a very high proportion of cells in the G0/G1d phase of the cell cycle. (15-17). Therefore, such as many anticancer drugs have a cycle dependent activity, their effectiveness on such slowly developing tumors is limited. Then, successful clinical treatments support the idea of differentiation (18, 19). As terminal differentiation pathway is initiated in the G1-phase of the cell cycle (20), substances inducing arrest of cells in G1-phase of the cycle have to be considered as good potential candidates for providing drugs able to treat slowly-developing cancers.

The aim of the present study, is to detail the mechanism of action of a new synthetic triazine name A190, selected from a series of more than 200 isoformes, for its good activity on two NSCLC cell lines: NSCLC-N6 (21) and A549 (22). Therefore, it has been studied: the cell responses, by the observation of cell proliferation arrest, the induction of apoptosis, the molecular mechanisms involved and by studying the regulation of to molecular targets HEF1 (23, 24) and B2 (25). B2 is a newly identified RNA as long as 13 486 bp (GenBank accession n°: AY166681). It is a part of the 6p24-p25 portion of the human chromosome 6 within intron 2 of the HEF1 gene. It has no apparent open reading frame and has an equivalent structure as

Annexes

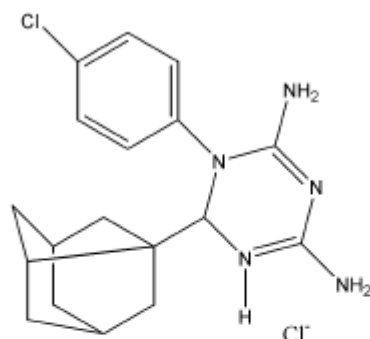
previous identified extremely long non-coding RNAs which regulate gene expression (26). B2 RNA is over-expressed after cytostatic treatments and we showed that this overexpression is involved in the G1 proliferation arrest of the NSCLC-N6 (25). HEF1 belongs to a family of docking adapter proteins including p130^{Cas} and Efs (27-29) named Cas family. Those proteins, contain multiple protein-protein interaction domains, that make complex activator of signaling cascades following cell adhesion (28-34). In interphase cells, HEF1 and other Cas proteins localize to sites of focal adhesion, bind to focal adhesion kinase (FAK) through the conserved SH3 domain (30). HEF1 is regulated at multiple levels in a cell cycle-dependent manner (35), and is implicated in different cellular functions, including: migration (36), mitosis (37), differentiation (38), anoikis (39) and apoptosis (24).

To confirm the *in vitro* results on the cell lines, the antitumoral effect was also studied, with an *in vivo* experiment on NSCLC-N6 grafted nude mice

Methods

The compounds A190 (4,6-diamino-1,2-dihydro-1-(4''-chlorophenyl)-2-(1-tricyclo[3.3.1.1^{3,4}] decyl-1,3,5-triazine).

This molecule is under international protection (Patent PCT: GR02/00036)



Cell Lines. The NSCLC-N6-L16 cell line (21), derived from a human non-small-cell bronchopulmonary carcinoma (moderately differentiated, rarely keratinizing, classified as T2N0M0), and A549 obtained from ATCC collection reference CCL-185 (22), were used for all experiments. Both cell lines were cultured in RPMI 1640 medium with 5% fetal calf serum, to which were added 100 IU penicillin.ml⁻¹, 100 µg streptomycin.ml⁻¹ and 2 mM glutamine, at 37°C in an air/carbon dioxide (95:5, v/v) atmosphere.

Annexes

Annexes

Cell Synchronization. During the mitosis, cell shape and adhesion is dramatically changing (40). Indeed, this phase induce an unpolymerization of the microtubules (41) and a lost of the cytoskeleton and the adhesion to the support. Then, the cells are just weakly hang up to the bottom of the culture flask during all the mitosis phase. It is also easy to isolate those cells by a slight stir up of the culture medium, to take off and suspend the cells. The cells are then salvage by slow centrifugation and replace in a new culture flask.

Cytotoxicity Determinations: Continuous drug exposure. Experiments were performed in 96 wells microtiter plates (10^5 cells/ml for NSCLC-N6 and 2×10^4 cells/ml for A549). Cell growth was estimated by a colorimetric assay based on the conservation of tetrazolium dye (MTT) to a blue formazan product by live mitochondria (42). Eight repeats were performed for each concentration. Control growth was estimated from 8 determinations. Optical density at 570 nm corresponding to solubilized formazan was read for each well on a Titertek Multiskan MKII.

Cytotoxicity Determinations: Discontinuous Drug Exposure. Cells were incubated for 72 h in 96 wells microtiter at the concentration of 5×10^4 cells/ml for NSCLC-N6 and 10^4 cells/ml for A549 in the culture conditions described above, and in the presence or absence of the drug. After 72h medium was removed, cells were washed with phosphate-buffered saline to eliminate drug traces, and then 100 μ l fresh medium containing no drug were placed in each wells. Cell growth was evaluated by the colorimetric assay of Mosmann using MTT (42).

Apoptosis Detection. The detections of apoptotic cells, were performed for both cell lines under the same conditions. Cells were incubated in the presence of 39,4 μ M A190 for 72 hours; For the studies of DNA fragmentation, the DNA was extract with a classical phenol/chloroform protocol. Then an electrophoresis was performed on agarose gel for all the DNA extracts. For the observation of apoptotic cells, they were stained with 10 μ g/ml of Acridin orange for 15 min in the dark. The results were observed using a fluorescence microscope, Olympus AX70®, with exciter filter BP 450-480.

Cell Cycle Analysis. For DNA staining, 2×10^5 cells were cultured in 25-mL flasks in the absence as well as in the presence of products. DNA staining was carried out using the technique of Vindelov (43). The solution (0.01 M glycine/NaOH; 0.96 mM propidium iodide ; 0.1 M Nonidet P40 ; 700 IU ribonuclease A/I ; 0.3 M NaCl ; diluted 1 :2 (v/v) in phosphate buffered saline) was dropped into the flasks which were then shaken and left in a dark environment at 4°C for 15 min. The cell suspension thus obtained, was filtered on nylon mesh (50 μ m) and analysed. Each histogram was performed with experiments performed

Annexes

independently eight times. The DNA content of at least 30000 nuclei was measured on a Becton Dickinson FACScan. For flow cytometric analysis, for the cells that had not been treated with BB extracts the G0/G1, S, and G2M phases were estimated by mathematical model of Fried (44). However, as is often the case, treated cells could not be analyzed by this method. Cell distribution in the cell cycle was thus evaluated by planimetric analysis (45). To eliminate 3 doublets, nuclei are selected by gating on the cytogram « DNA peak vs DNA area ».

RNA Isolation. Total RNA was extracted using RNAble® kit (Eurobio). The RNA concentration and the quality was assessed spectrophotometrically (GeneQuant II, Pharmacia biotech). Total RNA was used for microarray analysis and for QRT-PCR.

cDNA Synthesis. 2 µg of total RNA was reverse-transcribed using Random primers Hexamer (Promega) following instructions of to the manufacturer. The polymerisation was performed using M MLV-reverse transcriptase (Promega) at 37°C for 1h.

Quantitative real-time RT-PCR. Real-time RT-PCR was carried out, in a final volume of 25 µl with 1 µl 1:20 dilution of diluted cDNA mixture, 10 pmol gene-specific Forward and 10 pmol Reverse primer in 1× SYBR®Green PCR master mix (Applied Biosystems) with the following protocol: 15s at 95 C for denaturation, 30s at 60°C for annealing and extension on a ABI Prism® Sequence Detection System 5700 (Applied Biosystems). The primers were designed using Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>, sequences are listed in table 1). All primers sequences were controlled with a dimmers finder to reduce the risk of unspecific fixation of Sybr® green (<https://www.operon.com/oligos/toolkit.php>). For the gene HEF1 the primers were choose on two different exons (1 and 2), to be sour to have no interference between the amplifications of HEF1 and B2. The relative expression of each gene was normalized to that of human β-actin. Nontemplate control sample was used for each PCR to check the genomic DNA contaminations of cDNA template. Analysis of the results was done using GenAmp® 5700 SDS (Applied Biosystems) software.

Table 1 : Primers used in QRT-PCR (5'-3')

Gene product	Forward primer	Reverse primer
B2	ATTCCCTTGCCTTCTTGAT	CGTGAGGTCTGCCACTACAG
HEF1	CCGCTGCCGAAATGAATAT	CCCTGTGTTCTGCTCTATGACG
β-Actin	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	GTAATTGCGCTCAGGAGGAG

Annexes

In vivo studies. Female athymic NMRI-nu (nu/nu) mice (4 weeks of age) were purchased from Janvier Laboratories (Le Genest St Isle, France). The research protocol was approved and mice were maintained in accordance with the institutional guidelines of French administration. 1×10^6 exponentially growing NSCLC-N6 cells suspended in 150 μ l PBS were injected s.c. into the hind limb of 4 mice. When volume of the first tumours were enough, about 250 mm³, they were extracted and homogeneisated in PBS to be reinjected in 60 new mices. When tumours were visible in the new graft, about 15-20 mm³, the mice were randomized into the following treatment groups of 6 mice; Control: every three days i.p. administration of vehicle solution for A190, Treatment: every three days i.p. administration of A190 (50, 100 or 150 mg/kg). Mice were monitored daily for signs of toxicity and were weighed regularly. Tumour size was measured with a calliper square and tumour volume (TV) was calculated by the formula, $TV = (\text{larger diameter} \times (\text{smaller diameter})^2) / 2$ every 3 or 4 days.

Statistical analysis. For *in vivo* experiment, data verification of normality and equivariance were conducted with SigmaStat© version 3.11 (Systat Software Inc., Richmond, California, USA). This procedure authorizes to analyze data by a one way ANOVA, in all cases. For significant differences in treatment ($p < 0,05$), multiple *a posteriori* comparisons tests were assessed by Tukey's method (46). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

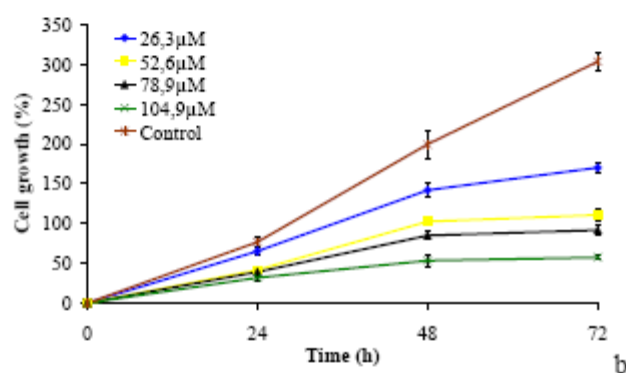
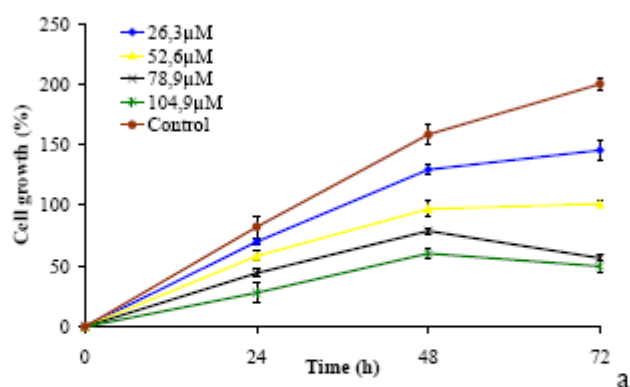
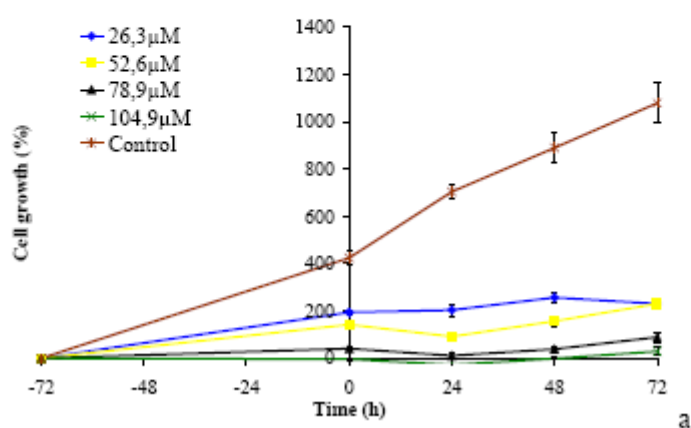


Figure 1: Effect of A190 on the cell growth of NSCLC-N6 (a) and A549 (b) cell lines: growth kinetics versus time after continuous exposure to drug at different concentrations. The proliferation is reduced for both cell lines in a dose dependant manner and we can observe a plateau from 48h of treatment.



Annexes

Annexes

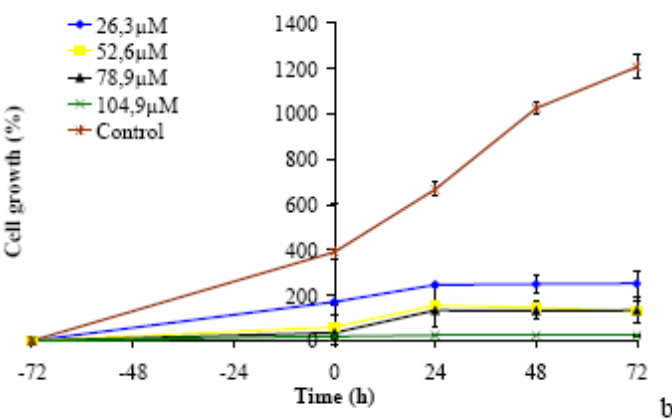


Figure 2: This graph depicted the growth pattern of NSCLC-N6 (a) and A549 (b) cell lines synchronized in a drug free medium with populations pre-treated for 72 h in the presence and absence (Control) of A190. This results show that the effect of A190 is irreversible and confirm its cytostatic activity against NSCLC-N6 and A549 cell lines since 26,3µM.

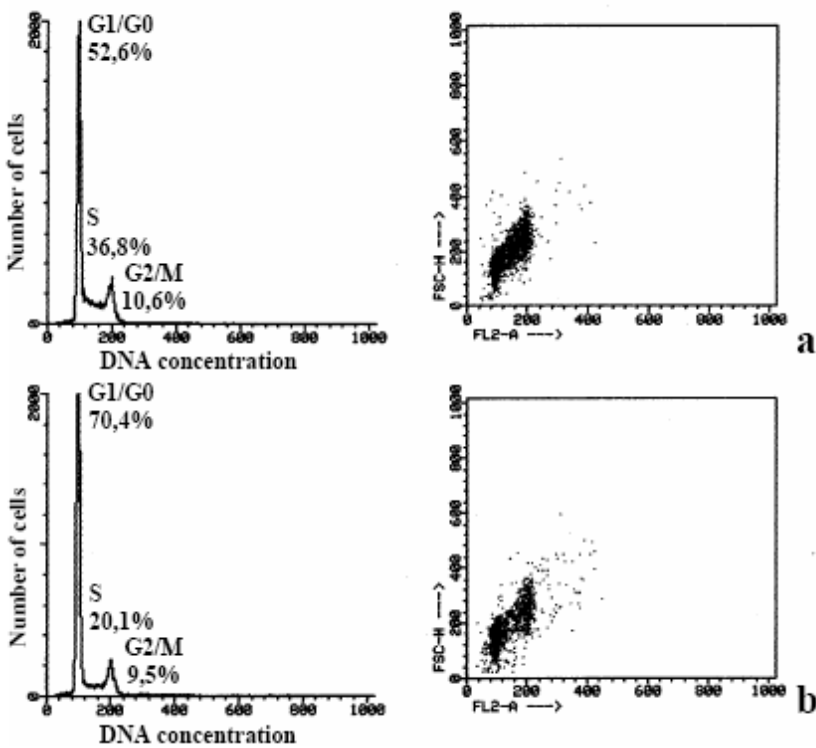


Figure 3: Flow cytometry analysis of NSCLC-N6 cells treated or not by A190 for 48h (a: control; b: 92,03µM). The table details the cell ratio in each phase of the cell cycle. The DNA histogram isn't shown for one of the two doses.

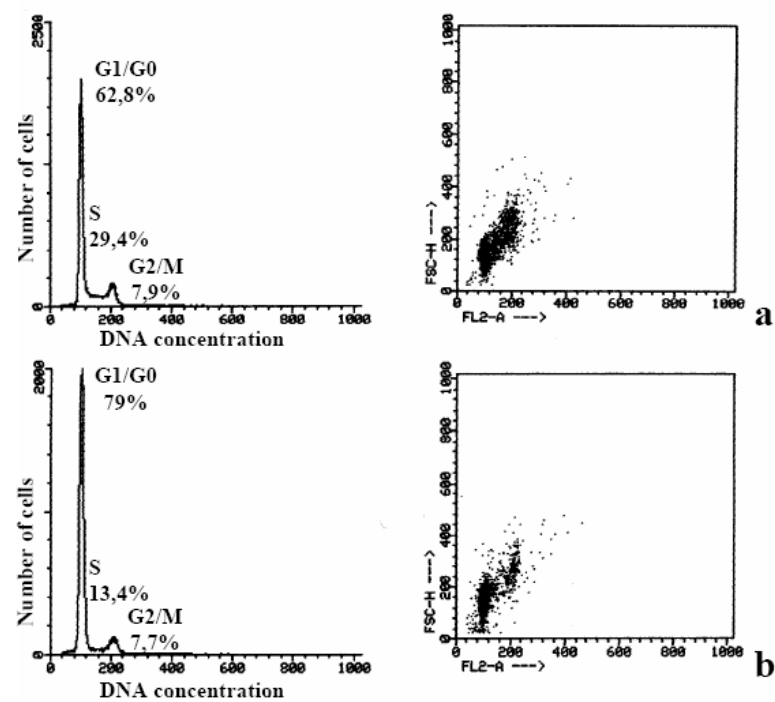


Figure 4: Flow cytometry analysis of NSCLC-N6 cells treated or not by A190 for 72h (a: control; b: 92,03 μ M). The table details the cell ratio in each phase of the cell cycle. The DNA histogram isn't shown for one of the two doses.

Annexes

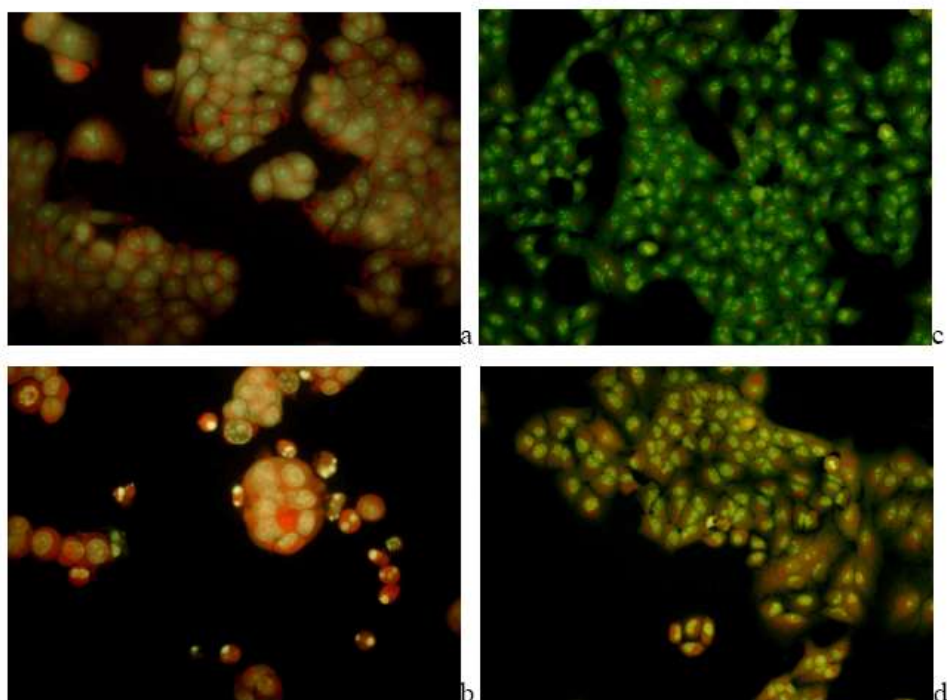


Figure 6: Observation of cells stained with acridin orange. Morphological comparison, by fluorescence microscopy, of treated cells by A190 and control cell. a (control), b(treated): NSCLC-N6; c (control), d(treated): A549. The fluorochrome show DNA in green and RNA in red.

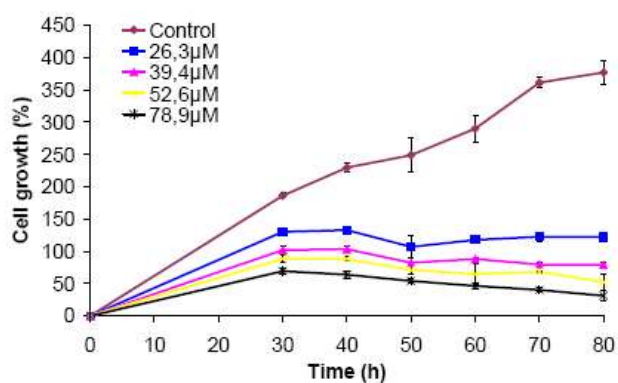


Figure 7: A new kinetics of activity study was done on the synchronized cells used for molecular targets analysis. This graph show the effect of A190 on the cell growth of NSCLC-N6 cell lines synchronized: growth kinetics versus time after continuous exposure to drug at different concentrations. The proliferation is reduced for both cell lines in a dose dependant manner and we can observe a plateau after 30h of treatment. In this case the dose effect is less pronounced

Annexes

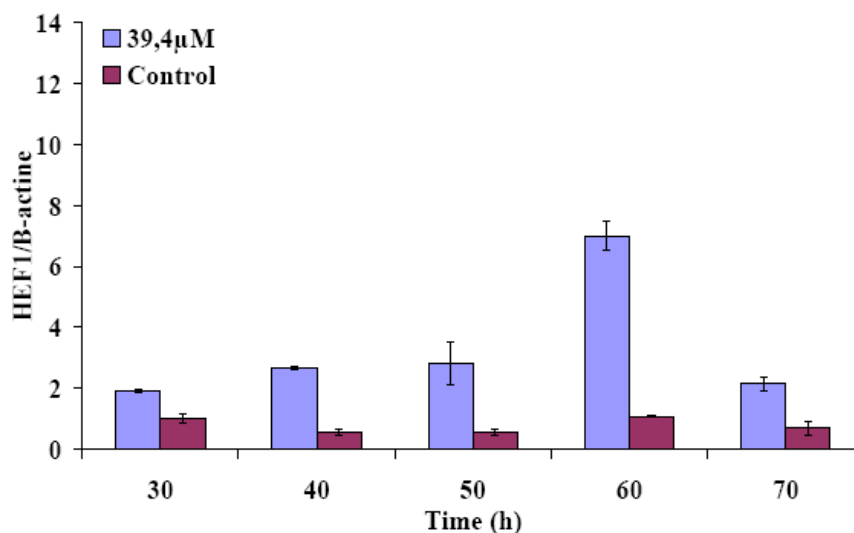


Figure 8: Study of the expression of the gene HEF1 in NSCLC-N6 cells treated or not by A190. The results are express as the ratio between HEF1 and β -actin (control gene) mRNA quantity. The evolution of the gene expression as been followed on 70h and the relative quantity was evaluated every 10h.

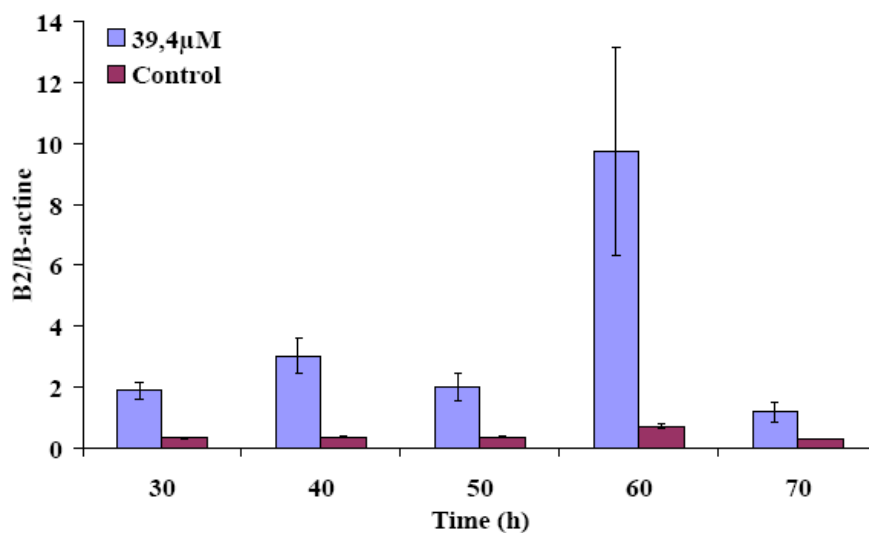
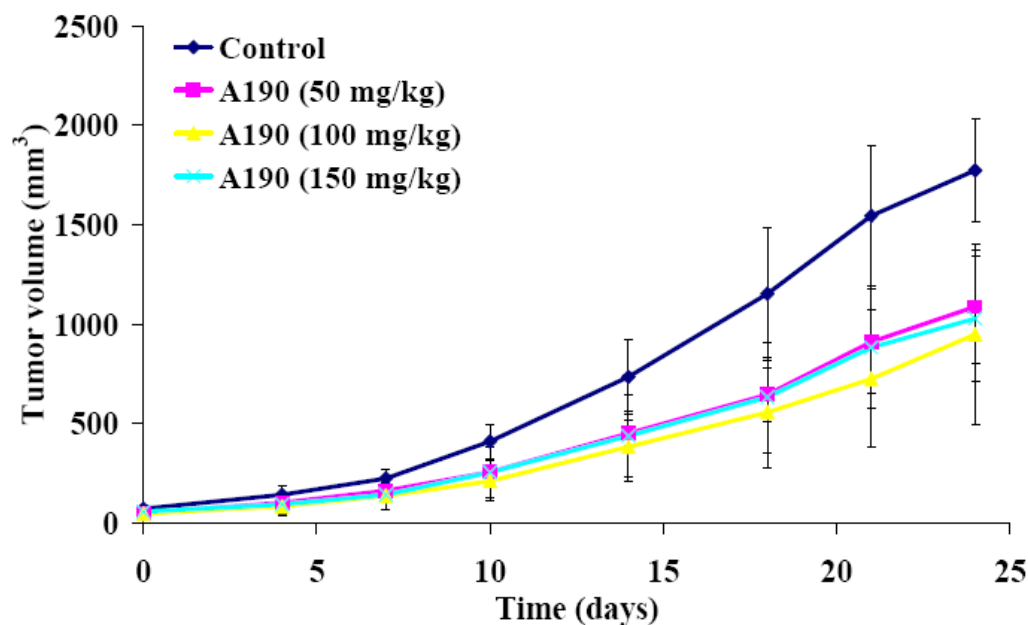


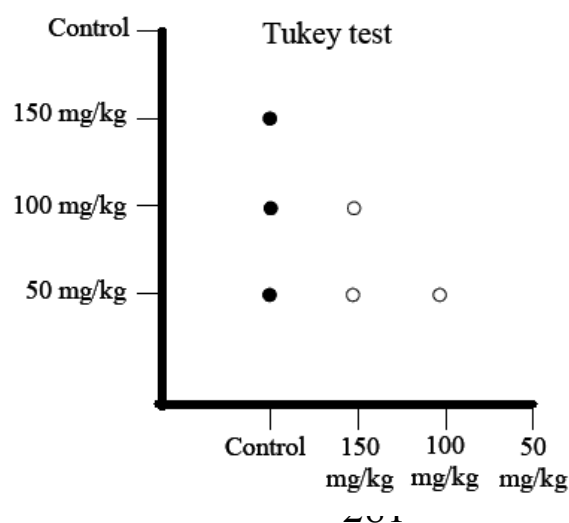
Figure 9: Study of the expression of the gene B2 in NSCLC-N6 cells treated or not by A190. The results are express as the ratio between B2 and β -actin (control gene) mRNA quantity. The evolution of the gene expression as been followed on 70h and the relative quantity was evaluated every 10h.

Annexes



	Time of course (days)							
	0	4	7	10	14	18	21	24
F	1,369	2,600	3,378	5,576	5,969	7,430	8,726	8,690
p	0,284 (ns)	0,084 (ns)	0,05 (ns)	0,007 **	0,005 **	0,002 **	<0,001 ***	<0,001 ***

Figure 10: Antitumour effect of A190 in nude mice xenografts. Means values of tumor volume ($\text{mm}^3 \pm 95\%$ confidence interval) for each dose of treatment a long 3 weeks. The table indicate the ANOVA results at each time of measuring, with F = fischer's value and p value (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,001$, *** = $p < 0,0001$). The multiple comparisons done from the day 10 shows significant differences between each dose of treatment to the control, but no significant differences between the three doses.



Annexes

Figure 10: Graph showing the results of the multiple comparison test done on each time after the day 10. The black points indicate a significant difference between two groups.

Cytostatic Activity. The Figure 1 illustrated the growth kinetics of NSCLC-N6 and A549 cells in the presence (from 26,3 to 78,9 μ M) and absence (Control) of A190. The inhibitory activity of A190 is dose dependent, without any toxicity at the highest doses. The profile obtained was typical of cytostatic activity; indeed we can see a “plateau” indicating the arrest of cell growth without excessive mortality. The microscopic observations revealed that the cells don't lose their typical shape a long the treatment, we can't observed any necrosis induce by toxicity of the molecule. The figure 2 confirms the cytostatic activity, by demonstrating no growing renewal, despite the arrest of the treatment after 72h. A majority of cells are phase-dependent blocked and then can't return in the cell cycle.

The flow cytometry permit to identify the blockade mechanism, the Figure 3 show the effect of A190 on the cell cycle of NSCLC-N6 cell line after 48/72 h of treatment. It displays DNA fluorescence histograms for an untreated population (Control) and other one treated for 48/72 hours by 92,03 μ M of A190. The results clearly indicate, an increasing ratio of the cell in G1/G0, with together a decreasing ratio of the cell in S phase between the control and the treated cells. Those results obviously show that A190 induce a blockage of the cell in the phase G1/G0 of the cell cycle. This mechanism, is totally confirmed the cytostatic effect deduced from the results of kinetics of activity (figure 1 and 2). This blockade will conduct the cells to a programmed death by apoptosis that is observed and confirm by Figure 5 and 6. Indeed, Figure 5 shows that the treatment by A190 induces a DNA fragmentation typical of apoptotic cells. It can be seen a typical fragment around 180 bp (47). The exposure of the cells to A190 for 72 h, clearly induced morphological change such as rounding up, reduction of cell volume, chromatin condensation, nuclei fragmentation and formation of apoptotic bodies for the two bronchopulmonary cells lines (Figure 8). Those observations have been done at different time a long the treatment (results not shown), and it appear that the launching of apoptosis start around 60h after the beginning of treatment. Those results confirm that A190 induce an arrest of proliferation, by inducing terminal differentiation and that the cells stay under genetics controls along a treatment.

Molecular Targets Induction. The molecular analyses were performed on synchronized cells, to facilitate the underline of the treatment effect on genes regulation. Indeed, the molecule A190 act on the gene HEF1 whose the expression is variable a long the

Annexes

cell cycle (48). Then the study conduct on the total RNA by quantitative RT-PCR, clearly show an influence of the treatment on the expression of our the molecular target B2 and HEF1. Indeed, the Figure 8 and 9 clearly show an over-expression of the gene B2 and HEF1 induce by a treatment of NSCLC-N6 cells. Moreover, those results seem to show that the presence of A190 induce an expression peak every 20 hours, with maximum at 60 hours of treatment. This can be correlated with the doubly-time of this cell line that is around 20 ± 1 hours (time calculated during all kinetics study). Then, we can certainly correlate it to the flow cytometry result, indeed we can think here that the treatment block more and more cells by induction of B2 and HEF1 cell expression, and it's also more and more underline by the QRT-PCR analysis. After 60 hours, the quantity of B2 and HEF1 is drastically decreasing, certainly due to the massive cell death by apoptosis.

Antitumour effect *in vivo*. It has been evaluated the antitumour effect of A190 *in vivo* using the model of nude mice NMRI/nu xenografts. The treatments have begun when the tumours volumes reached around 60 mm^3 . Three doses have been tested by 8 injections intraperitoneally of the drug dissolve in water. A190 significantly inhibited tumour growth compared with control from the day 10 ($p < 0,05$). In addition, the ANOVA statistical analyses shown, that the differences between the treated to control groups, are drastically increasing a long the time. On the other hand, the multiple comparison test done from the day 10, show that there's no significant difference between the three doses. No toxicity of the treatment has been recorded by the monitoring of mice reaction and weight. Then it can concluded, that it has a therapeutic "plateau" between 50 to 150 mg/ml. Those results seem to be correlated with the *in vitro* experiments, indeed no toxicity on the cell was seen with the highest doses (figure 10).

Discussion

In this study, **it has been shown** that A190 produced irreversible cytostatic activity on the NSCLC-N6 line, associated with blockade in G1 phase of the cell cycle and death by apoptosis. This activity was slightly dose-dependent, don't present any toxicity and related to induction of atypical terminal differentiation. These results indicate that, the molecule A190 is then able to target particular mechanisms responsible of a terminal differentiation of the cells. This process is especially interesting to resolve problems of specificity of drugs. These findings led us to study the genetic mechanisms involved in this type of activity. These investigations, were based on previous work performed in our laboratory showing the existence

Annexes

of genetic variations relative to known or novel genes after treatment of our NSCLC-N6 cell line by cytostatic agents such as bistranides (49, 50) and VT1 (51).

As it has been explained by us previously, the protein HEF1 is implicated in various process of the cell cycle (48) and in particularly in apoptosis (24). Indeed, pHEF1 is cleaved along the cell cycle in different forms: p115^{HEF1}, p105^{HEF1} (those ones are the entire protein), p65^{HEF1}, p55^{HEF1} and p28^{HEF1}, each protein are implicated in a particular phase of the cell cycle. It has been demonstrated that an overexpression of HEF1 can induced the production of p28^{HEF1} and then inducing apoptosis (37). B2 is a long RNA of 13 486 bp (GenBank accession n°: AY166681), code by the intron 2 of HEF1, and with structure similar to identified non-coding RNA able regulate gene expression (26). Then we can hypothesis two different mechanisms involved in A190 activity: The first one considers that B2 can influence the over-expression of the HEF1 gene. In consequence, the apparition of the p28^{HEF1} form will induce a cell death by apoptosis. The latter supposes that an abundance of the p55^{HEF1} form will favour pursuit or an entrance in the cell cycle. Then, became to the S phase of the cycle, the B2 gene will be able to hinder the DNA replication. Indeed, a so long nuclear RNA can hybridise to DNA and then induce a steric encumbrance responsible of a blockade of the DNA polymerase activity. The cells, will be therefore blocked in G1/S phase. It has been though now, that there is an agreement of the two mechanisms, and all the cell populations will be therefore target.

This work shows then, an extremely innovative way to inhibit the proliferation of cell from the most deadly type of cancer. Indeed, the pathway implicate new molecular target that were not oncogenes or tumour suppressor genes. It has been considered by us, a novel type of therapy, always most specific and with less possible resistance of the cancer cell, how can be named “genechemical therapy”. To future extend the comprehensions of the mechanisms involved in an A190 treatment, we will envisage detail the role of B2 by different study using siRNA and plasmid construct. The protein production will be also followed a long a treatment and correlated to a mRNA dosage. All those parameters will be studied in each phase of the cell cycle, using synchronized cell. Finally, new *in vivo* studies will be conduct to confirm the implication of those molecular mechanisms in the antitumorales activity.

Acknowledgements

This work was supported in part by fellowships from “La ligue départementale contre le Cancer” and fellowship from “IOLTECH”. We thank to Dr. V. Turpin for his assistance in statistical analysis.

Footnotes

[†] Author to whom correspondence should be addressed (Telephone 0251125672; Fax 0251125690; e-mail dimitri.moreau@univ-nantes.fr).

1. Costa, F., x00ed & cio, F. (2005) *Gene* **357**, 83-94.
2. Pang, K. C., Frith, M. C. & Mattick, J. S. (2006) *Trends in Genetics* **22**, 1-5.
3. Boyle, P. & Ferlay, J. (2005) *Annals of Oncology* **16**, 481-488.
4. Jacobson, B. C., Gould, M. K., Silvestri, G. A., Detterbeck, F., Papagiannis, A., Buyukcelik, A., Yalcin, B., Utkan, G., Spira, A. & Ettinger, D. S. (2004) *New England Journal of Medicine* **350**, 2008-2010.
5. Lilenbaum, R. C., Herndon II, J. E., List, M. A., Desch, C., Watson, D. M., Miller, A. A., Graziano, S. L., Perry, M. C., Saville, W., Chahinian, P., *et al.* (2005) *Journal of Clinical Oncology* **23**, 190-196.
6. Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J. & Johnson, D. H. (2002) *New England Journal of Medicine* **346**, 92-98.
7. Lynch, T. J., Adjei, A. A., Bunn Jr, P. A., DuBois, R. N., Gandara, D. R., Giaccone, G., Govindan, R., Herbst, R. S., Johnson, B. E., Khuri, F. R., *et al.* (2004) *Clinical Cancer Research* **10**.
8. Giaccone, G., Herbst, R. S., Manegold, C., Scagliotti, G., Rosell, R., Miller, V., Natale, R. B., Schiller, J. H., Von Pawel, J., Pluzanska, A., *et al.* (2004) *Journal of Clinical Oncology* **22**, 777-784.
9. Ramalingam, S. & Belani, C. P. (2004) *Oncology (Williston Park, N.Y.)* **18**, 21-26.
10. Gatzemeier, U., Groth, G., Butts, C., Van Zandwijk, N., Shepherd, F., Ardizzoni, A., Barton, C., Ghahramani, P. & Hirsh, V. (2004) *Annals of Oncology* **15**, 19-27.
11. Hao, D., Hammond, L. A., Eckhardt, S. G., Patnaik, A., Takimoto, C. H., Goetz, A. D., Tolcher, A. W., McCreery, H. A., Rowinsky, E. K., Schwartz, G. H., *et al.* (2003) *Clinical Cancer Research* **9**, 2465-2471.
12. Ardizzoni, A. & Tiseo, M. (2004) *Journal of Chemotherapy* **16**, 104-107.
13. Dubey, S. & Schiller, J. H. (2005) *Oncologist* **10**, 282-291.
14. Jacquot, C., Moreau, D., Tomasoni, C., Juge, M., Coiffard, L., Roussis, V. & Roussakis, C. (2003) *Int J Oncol* **23**, 495-501.
15. Kontiza, I., Vagias, C., Jakupovic, J., Moreau, D., Roussakis, C. & Roussis, V. (2005) *Tetrahedron Letters* **46**, 2845-2847.
16. Moreau, D., Tomasoni, C., Jacquot, C., Kaas, R., Le Guedes, R., Cadoret, J.-P., Muller-Feuga, A., Kontiza, I., Vagias, C., Roussis, V., *et al.* (2006) *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**, 97-103.
17. Siavoshian, S., Böesh, S., Riou, D., Dabouis, G., More, M. T., Pondaven, P. & Roussakis, C. (1998) *Anticancer Research* **18**, 193-200.
18. Zimmermann, P. V., Hawson, G. A. T., Bint, H. H. & Parsons, P. G. (1987) *Lancet*. **2**, 530-533.
19. Salvati, F., Teodori, L., Gagliardi, L., Signora, M., Aquilini, M. & Storniello, G. (1989) *Chest*. **96** **96**, 1092-1098.
20. Maurer, H. R., Eckert, K. & Bissery, M. C. (1993) *Int. J. Oncol.* **3**, 161-165.
21. Lotan, R., Francis, G. E., Freeman, C. S. & Vaxman, S. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3453-3464.
22. Rimm, E. B., Ascherio, A., Willett, W. C., Katan, M. B. & Stampfer, M. J. (1996) *Annals of Internal Medicine* **125**, 384-389.

Annexes

23. Roussakis, C., Gratas, C., Audouin, A. F., Boterff, J. L., Dabouis, C., Andre, M. J., Moyon, E., Vo, N. H., Pradal, G. & Verbist, J. F. (1991) *Anticancer research* **11**, 2239-2244.
24. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H. & Parks, W. P. (1973) *J Natl Cancer Inst* **51**, 1417-1423.
25. Fashena, S. J., Einarson, M. B., O'Neill, G. M., Patriotis, C. & Golemis, E. A. (2002) *Journal of Cell Science* **115**, 99-111.
26. Kelloff, G. J., Crowell, J. A., Steele, V. E., Lubet, R. A., Malone, W. A., Boone, C. W., Kopelovich, L., Hawk, E. T., Lieberman, R., Lawrence, J. A., *et al.* (2000) *Journal of Nutrition* **130**.
27. Jacquot, C., Carbonnelle, D., Tomasoni, C., Papaconstadinou, A. & Roussakis, C. (2004) *Int. J. Oncol* **24**, in press.
28. Liu, A. Y., Torchia, B. S., Migeon, B. R. & Siliciano, R. F. (1997) *Genomics* **39**, 171-184.
29. Alexandropoulos, K. & Baltimore, D. (1996) *Genes Dev.* **10**, 1341-1355.
30. Ishino, M., Ohba, T., Sasaki, H. & Sasaki, T. (1995) *Oncogene* **11**, 2331-2338.
31. Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. & Hirai, H. (1994) *EMBO J.* **13**, 3748-3756.
32. Law, S. F., Estojak, J., Golemis, E. A., Wang, B., Mysliwiec, T. & Kruh, G. (1996) *Molecular and Cellular Biology* **16**, 3327-3337.
33. Manié, S. N., Astier, A., Canty, T., Avraham, H., Haghayeghi, N., Sattler, M., Salgia, R., Freedman, A. S., Beck, A. R. P., Law, S. F., *et al.* (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4230-4236.
34. Minegishi, M., Tachibana, K., Sato, T., Iwata, S., Nojima, Y. & Morimoto, C. (1996) *Journal of Experimental Medicine* **184**, 1365-1375.
35. Nojima, Y., Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Furuya, H., Sakai, R., Sato, T., Tachibana, K., Morimoto, C., Yazaki, Y., *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15398-15402.
36. Vuori, K. & Ruoslahti, E. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22259-22262.
37. Law, S. F., Zhang, Y. Z., Klein-Szanto, A. J. & Golemis, E. A. (1998) *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3540-3551.
38. Lauffenburger, D. A. & Horwitz, A. F. (1996) *Cell* **84**, 359-369.
39. Silva, G. L., Cui, B., Chávez, D., You, M., Chai, H. B., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., Rasoanaivo, P., *et al.* (2001) *Journal of Natural Products* **64**, 1514-1520.
40. Boudreau, N. & Bissell, M. J. (1998) *Current Opinion in Cell Biology* **10**, 640-646.
41. Frisch, S. M. & Francis, H. (1994) *J. Cell Biol.* **124**, 619-626.
42. Yu, D., Suzuki, M., Xie, L., Morris-Natschke, S. L. & Lee, K. H. (2003) *Medicinal Research Reviews* **23**, 322-345.
43. Sawin, K. E. & Endow, S. A. (1993) *Bioessays* **15**, 399-407.
44. Mosmann, T. (1983) *Journal of Immunological Methods* **65**, 55-63.
45. Vindelov, L. L. (1977) *Virshows Arch. B. Cell Pathol.* **24**, 227-242.
46. Fried, J. & Mandel, M. (1979) *Computer Programms Biomedical* **10**, 218-230.
47. Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A., Buchner, T., Hauss, W. H. & Freireich, E. J. (1976) *Cancer Research* **36**, 1176-1181.
48. Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995) *Biometry : the principles and practice of statistics in biological research* (Freeman W.H. and compagny, New York).
49. Au, J. L.-S., Panchal, N., Li, D. & Gan, Y. (1997) *Pharmaceutical Research* **14**, 1659-1671.

Annexes

50. Law, S. F., Zhang, Y. Z., Klein-Szanto, A. J. & Golemis, E. A. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 3540-3551.
51. Liscia, E., Riou, D., S.Siavoshian, Boesh, S., Dabouis, G., Biard, J. F. & Roussakis, C. (1996) *Anticancer Research* **16**, 1209-1212.
52. Siavoshian, S., Jacquot, C., Biard, J. F., Briand, G. & Roussakis, C. (1999) *Anticancer Res.* **19**, 5361-5366.
53. Carbonnelle, D., Jacquot, C., Lanco, X., LeDez, G., Tomasoni, C., Briand, G., Tsotinis, A., Calogeropoulou, T. & Roussakis, C. (2001) *International journal of cancer* **92**, 388-397.

Résumé

Maladie encore rare au début du 20^{ème} siècle, le cancer du poumon est à l'origine de plus de 6 % des décès en France actuellement. Il occupe le premier rang des décès par cancer alors que la France est considérée comme un pays à risque moyen parmi les pays occidentaux. La découverte de nouveaux traitements anticancéreux toujours plus efficaces et spécifiques, est donc aujourd'hui primordiale.

La validation de la capacité d'une molécule à pouvoir inhiber la prolifération cancéreuse, passe par plusieurs étapes de tests commençant par la mise en évidence d'une activité au niveau cellulaire. Une des stratégies utilisées pour la découverte de nouveaux composés antiprolifératifs, passe par une investigation du potentiel bioactif d'un grand nombre de composés chimiques (le screening) sur lignées cellulaires cancéreuses, ici NSCLC-N6 et A549. Ces composés peuvent avoir des origines diverses allant du milieu naturel à la chimie de synthèse. Nous avons étudiés ici différentes molécules :

Des extraits d'origine naturelle produits par des microalgues. 10 espèces différentes issues de 7 classes phylogénétiques ont été étudiées. Les résultats des premiers tests d'activité ont permis de sélectionner plusieurs extraits pour mener une étude chimique approfondie visant à isoler et identifier les principes actifs (Moreau *et al.*, 2006).

Une triazine brevetée par le laboratoire issue de la chimie de synthèse (A190).

Comme nous l'avons dit la spécificité des nouveaux traitements est prioritaire, c'est pourquoi les recherches menées ici visent à décrire les mécanismes génomiques impliqués dans l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses. La mise en évidence de l'action d'une molécule au niveau génomique passe par l'étude du transcriptome et/ou du protéome.

C'est ainsi qu'au cours de différents travaux au sein du laboratoire deux cibles particulières ont pu être identifiées par RF-Differential display : le gène HEF1 et l'ARN non traduit B2 codé par une région intronique d'HEF1. Au cours de cette thèse nous avons suivi l'implication de la molécule A190 dans la modulation de ces gènes et nous avons tenter de comprendre leurs implications

au niveau du cycle cellulaire (Moreau *et al.*, 2006 (soumis)). Le potentiel antitumorale de la molécule A190 a enfin été étudiée au cours d'une expérimentation sur modèle animal et s'est révélé très probant.

Mots clés : Cancer bronchopulmonaire, Cibles moléculaires, ARN régulateur, Expression génique, Antiprolifératif, Apoptose, Molécules naturelles, Microalgues.

Studies of new molecular targets from Non Small Cell Lung Cancer, pharmacomodulated by synthetic and natural original compounds

Summary

Still rare disease at the beginning of the 20th century, the lung cancer is at the origin of more than 6 % of the deaths in France currently. It occupies there the first rank of the deaths by cancer whereas France is regarded as a country at the average risk among the Western countries. The discovery of new anti-cancer treatments increasingly more effective and specific, is thus today of primary importance.

The validation of the capacity of a molecule to being able to inhibit the cancerous proliferation, passes by several stages of tests starting with the description of an activity at the cellular level. One of the strategies used for the discovery of new compounds antiproliferatives, passes by an investigation of the bioactive potential of a great number of chemical compounds (the screening) on cancerous cellular lines, here NSCLC-N6 and A549. These compounds can have various origins from the natural environment to the chemistry of synthesis. The studied molecules are here:

Extracts of origin marines produced by microalgues. 10 different species resulting from 7 phylogenetic classes were studied. The results of the first tests of activity made it possible to select several extracts to undertake a thorough chemical study aiming to isolate and identify the active ingredients (Moreau *et al.*, 2006).

A triazine under protection resulting from the chemistry of synthesis (A190).

As we said the specificity of the new treatments is a priority, this is why research undertaken here aims at describing the genomic mechanisms implied in the stop of the proliferation of the cancerous cells. The description of the action of a molecule on the genomic level implies the study of the transcriptome and/or the proteome. Thus during various laboratory works two particular targets have been identified by RF-Differential display: gene HEF1 and the ARN not translated B2 coded by an intronic area of HEF1. During this thesis we followed the implication of the A190 molecule in the modulation of these genes and we have tried to understand their implications in the cellular cycle (Moreau *et al.*, 2006 (submitted)). The potential antitumor of the A190 molecule finally was studied during an in vivo experimentation and appeared very convincing.

Key words: Bronchopulmonary cancer, Molecular targets, Regulatory RNA, Gene expression, Antiproliferativ, Apoptosis, Natural products, Microalgae.