

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Rôles de l'endothéline et d'un antagoniste sur les cancers de la thyroïde

Collignon, Florence

Award date:
2005

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

ROLES DE L'ENDOTHELINE ET D'UN ANTAGONISTE SUR LES CANCERS DE LA THYROIDE

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Florence COLLIGNON
Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Rôles de l'endothéline et d'un antagoniste sur les cancers de la thyroïde

COLLIGNON Florence

Résumé

L'endothéline (ET), connue principalement pour ses effets vasoconstricteurs, mitogènes et pro-inflammatoires, est devenue une cible thérapeutique depuis la découverte de son implication dans des processus pathologiques tels que l'asthme, l'hypertension artérielle et pulmonaire ainsi que l'infarctus du myocarde. L'ET fait partie d'une famille de trois peptides dont ET-1, la forme principale, agit en se fixant sur le récepteur ET_A. L'ensemble formé par ET-1, le récepteur ET_A et les éléments nécessaires pour la synthèse et la sécrétion de ET-1 est appelé « l'axe ET ».

Récemment on a pu démontrer une surexpression de cet axe dans toute une série de cancers, dont les cancers papillaires thyroïdiens. ET-1 est de plus en plus souvent invoquée dans le développement de processus cancéreux tels que l'inhibition de l'apoptose, la néo-angiogenèse, l'invasion et la prolifération cellulaire. Le récepteur ET_A est devenu dès lors une nouvelle cible dans la thérapie anti-cancéreuse suite à la mise au point d'antagonistes sélectifs de ce récepteur tels que l'atrasentan.

Pour définir l'implication de ET-1 endogène dans des cancers papillaires thyroïdiens, les effets de l'atrasentan sur la prolifération, la motilité et l'apoptose ont été étudiés sur la lignée TPC1. Il en ressort que l'atrasentan, à forte concentration (100 µM), diminue la prolifération des TPC1 mais n'influence pas leur motilité. L'atrasentan seul n'induit pas l'apoptose. En revanche, sa combinaison avec de faibles concentrations de l'agent chimiothérapeutique doxorubicine semble amplifier l'apoptose induite par ce dernier.

En conclusion, ET-1 endogène participe à la prolifération dans la lignée cancéreuse papillaire thyroïdienne TPC1. ET-1 ne contribue pas à la motilité cellulaire mais pourrait agir partiellement comme facteur de survie. L'atrasentan, antagoniste ET_A, possède des propriétés intéressantes qu'il serait judicieux de confirmer dans d'autres types de cancer thyroïdien surexprimant l'axe ET et, peut-être, d'exploiter in vivo.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2005

Promoteur : B. Flamion

Je tiens tout premièrement à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de physiologie et pharmacologie pour m'avoir aidée et accordé de leur temps dans la réalisation de ce mémoire.

Je remercie particulièrement Mr.Flamion, promoteur de ce mémoire, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail au sein du laboratoire. Merci pour vos remarques et suggestions pertinentes ainsi que pour avoir m'avoir consacré de votre temps si précieux, qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

Mes remerciements vont également à Mme Mertens, co-promotrice, pour son encadrement et ses conseils qui m'ont bien souvent éclairée sur de nombreux points, je lui en suis très reconnaissante.

Merci à Cécile pour son 'coaching', Sophie et Laurence. Merci à toutes les trois pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail et pour leur soutien quotidien.

La réalisation de ce travail n'aurait certainement pas pu être menée à bien sans les conseils techniques et l'aide précieuse de Mme Lacremans et Mme Daelman; et à Guy pour sa sympathie.

Une dernière attention revient tout naturellement à mes parents et grands-parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue tout au long de mes études.

Je voudrais terminer en remerciant tous mes amis proches, mes compatriotes de notre petite section biologie humaine et ma chère co-koteuse pour son écoute et son attention qui m'ont particulièrement touchée.

Florence

°C	Degré Celcius
AC	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ANP	Peptide atrial natriurétique
anti-IgG	Anti-immunoglobuline G
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine triphosphate
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma-2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BrdU	5-Bromo-2'-déoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CTL	Contrôle
cyt c	Cytochrome c
DAG	Diacylglycérol
DMEM	Dubelco's modified eagle medium
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
DO	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
ECE	Endothelin converting enzyme
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ET	Endotheline
ET-1	Endothéline-1
ETA	Récepteur à l'endothéline de type A
ETB	Récepteur à l'endothéline de type B
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	fœtal bovine serum
FGF	Fibroblastic growth factor
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
GDP	Guanosine diphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GSK3β	Glycogène synthase kinase 3β
GTP	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	High density lipoprotein
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1α
HRP	Horse-radish peroxydase
I131	Iode 131
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP-3	IGF-binding protein-3
IL	Interleukines
IP3	Inositol trisphosphate
KDa	Kilo Dalton
Ki	Constante d'inhibition

Km	Constante de Michaelis et Menten
LDL	Low density lipoprotein
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MMPs	Métalloprotéases matricielles
NF- κ B	Nuclear factor κ B
NO	Mononoxyde d'azote
NOS	NO synthase
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
PG	Prostaglandines
PGI ₂	Prostaglandies I ₂
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol triphosphate
PKB	Protein kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Poids moléculaire
PPET	Préproendothéline
PSA	Antigène spécifique de prostate
PVDF	PolyVinylidene DiFluoride
RF	RNase-free
RNase	Ribonucléase
Rpm	Rotations par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
Ser/Thr	Serine/thréonine
TAE	Tris-acetate EDTA
TBE	Tris-Borate EDTA
TE	Tris-EDTA
Temed	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TGF	Transforming growth factor
TGF β	Transforming growth factor beta
Tm	Melting temperature
TMB	Tétramethyl-benzidine
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
Tris	Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane
TRK1	Récepteur tyrosine kinase 1
TSH	Thyroid stimulating hormone
uPA	Urokinase type plasminogen activator
UV	Rayons UltraViolets
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western blot

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION.....	4
1.1	Les cancers thyroïdiens	4
1.1.1	Le carcinome papillaire	4
1.1.2	Le carcinome médullaire	5
1.1.3	Le carcinome folliculaire.....	5
1.1.4	Le carcinome anaplasique	5
1.1.5	Traitements des cancers thyroïdiens.....	5
1.2	L'endothéline.....	6
1.2.1	Origine et structure de l'endothéline	6
1.2.2	Clonage et séquençage des gènes	7
1.2.3	Synthèse, sécrétion et élimination de l'endothéline.....	7
1.2.3.1	Facteurs stimulant la synthèse d'endothéline	7
1.2.3.2	Mécanismes de synthèse de l'endothéline.....	8
1.2.3.3	Clairance de ET	8
1.2.4	La famille des endothélines.....	8
1.2.4.1	ET-1.....	8
1.2.4.2	ET-2.....	10
1.2.4.3	ET-3.....	10
1.2.5	Les récepteurs de ET	10
1.2.5.1	Récepteur ET _A	10
1.2.5.2	Récepteur ET _B	10
1.2.6	Physiologie des ETs-« l'axe ET »	11
1.2.6.1	Effet paracrine	11
1.2.6.2	Effet autocrine	11
1.2.6.3	Rôles physiologiques et physiopathologiques	12
1.2.7	L'axe endothéline dans les cancers	12
1.2.7.1	Endothéline et prolifération	13
1.2.7.2	Endothéline et apoptose.....	13
1.2.7.3	Endothéline et métastases osseuses	16
1.2.7.4	Endothéline et invasion tumorale	16
1.2.7.5	Endothéline et angiogenèse	17
1.3	Les antagonistes de l'endothéline	17
1.3.1	Introduction	17
1.4	Effets d'antagonistes sur les pathologies.....	17
1.5	L'atrasentan	18
1.6	Usage de l'atrasentan et d'autres antagonistes en cancérologie.....	19
1.6.1	Cancer ovarien.....	19
1.6.2	Cancer prostatique et métastases osseuses	19
1.7	Endothéline et thyroïde	20
1.7.1	Physiologie	20
1.7.2	Pathologies	21
1.7.2.1	Thyroïdite d'Hashimoto	22
1.7.2.2	Goitre.....	22
1.7.2.3	Carcinome papillaire	22
1.7.2.4	Carcinome médullaire	22
2	BUTS DU MEMOIRE	23

3	MATERIEL ET METHODES	24
3.1	Culture cellulaire.	24
3.1.1	Cellules.....	24
3.1.2	Repiquage des cellules	24
3.1.2.1	Matériel	24
3.1.2.2	Méthode.....	24
3.2	Extraction et quantification d'ARN	24
3.2.1	Principe.....	24
3.2.2	Matériel	24
3.2.3	Méthode.....	25
3.2.4	Quantification d'ARN	25
3.3	Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR.....	25
3.3.1	Principe.....	25
3.3.1.1	Transcription inverse.....	25
3.3.1.2	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	25
3.3.2	Matériel et méthode.....	25
3.3.2.1	Transcription inverse.....	25
3.3.2.2	PCR	26
3.4	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose.....	26
3.4.1	Principe.....	26
3.4.2	Matériel	26
3.4.3	Méthode.....	27
3.5	Test de prolifération au BrdU (Elisa).....	27
3.5.1	Principe.....	27
3.5.2	Matériel	27
3.5.3	Méthode.....	27
3.6	Test de motilité	28
3.6.1	Principe.....	28
3.6.2	Matériel	28
3.6.3	Méthode.....	28
3.6.3.1	Détermination de la concentration nécessaire en mitomycine.....	28
3.6.3.2	Test de motilité.....	28
3.7	Western Blot.....	29
3.7.1	Principe.....	29
3.7.2	Matériel	29
3.7.3	Méthode.....	29
3.7.3.1	Préparation des échantillons	29
3.7.3.2	Dépôt des échantillons sur gel de polyacrylamide et migration	30
3.7.3.3	Transfert des protéines sur une membrane PVDF	30
3.7.3.4	Coloration au rouge ponceau.....	30
3.7.3.5	Saturation des sites de liaison non spécifiques des protéines	30
3.7.3.6	Ajout des AC primaire et secondaire.....	30
3.7.3.7	Révélation en chambre noire.....	30
3.8	Immunofluorescence.....	31
3.8.1	Principe.....	31
3.8.2	Matériel	31
3.8.3	Méthode.....	31
3.9	Test d'exclusion au trypan bleu.....	32
3.9.1	Principe.....	32
3.9.2	Matériel	32
3.9.3	Méthode.....	32

3.10	Echelle d'ADN	32
3.10.1	Principe.....	32
3.10.2	Matériel	32
3.10.3	Méthode.....	33
4	RÉSULTATS.....	34
4.1	RT-PCR	34
4.1.1	But de l'expérience.....	34
4.1.2	Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc	35
4.1.3	Détection des ARNm des récepteurs ET _A et ET _B , de PPET et ECE.....	35
4.2	Test de prolifération au BrdU (Elisa).....	36
4.2.1	But de l'expérience.....	36
4.2.2	Réalisation pratique.....	36
4.2.3	Effet de l'atrasentan sur les TPC1	37
4.2.3.1	Résultats	37
4.2.3.2	Commentaires.....	38
4.2.4	Effet de l'atrasentan sur les 3T3	39
4.2.4.1	Résultats	39
4.2.4.2	Commentaires.....	40
4.2.5	Effet du milieu de culture de cellules TPC1 sur les 3T3	41
4.2.5.1	Résultats	41
4.2.5.2	Commentaires.....	41
4.3	Motilité.....	42
4.3.1	But de l'expérience.....	42
4.3.2	Réalisation pratique.....	42
4.3.3	Résultats	42
4.3.3.1	Détermination de la concentration optimale en mitomycine.....	42
4.3.3.2	Motilité des cellules TPC1	43
4.3.4	Commentaires.....	44
4.4	Western Blot pour Akt et Akt phosphorylé.....	44
4.4.1	But de l'expérience.....	44
4.4.2	Résultats	44
4.4.3	Commentaires.....	46
4.5	Tests de l'apoptose	46
4.5.1	But des expériences	46
4.5.2	Effets de la doxorubicine.....	47
4.5.2.1	Test de l'apoptose par exclusion au trypan bleu.....	47
4.5.2.2	Test de l'apoptose par mise en évidence de l' « échelle d'ADN »	48
4.5.2.3	Test de l'apoptose par immunofluorescence	50
5	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	53
5.1	Prolifération.....	53
5.1.1	Concernant les TPC1	53
5.1.2	Concernant les 3T3.....	54
5.2	Motilité.....	54
5.3	Apoptose	55
6	CONCLUSIONS.....	56

1 Introduction

1.1 Les cancers thyroïdiens

Les cancers thyroïdiens sont assez rares mais ont la particularité de toucher des enfants. L'incidence de ces cancers varie dans le monde suite à l'intervention de facteurs environnementaux, ethniques et alimentaires qui sont encore mal connus. Inutile de rappeler la recrudescence des cancers thyroïdiens apparue à la suite de l'accident de Tchernobyl.

Les tumeurs thyroïdiennes peuvent apparaître à partir de chacun des types cellulaires constituant cette glande. Parmi les tumeurs épithéliales malignes de la thyroïde, on peut distinguer celles d'origine folliculaire telles que les carcinomes papillaire, folliculaire et anaplasique (ou indifférencié) et celle d'origine parafolliculaire illustrée par le cancer médullaire (Tsukahara et al., 1994).

Parmi les tumeurs solides, les cancers thyroïdiens ont la particularité de résulter d'événements oncogéniques généralement bien démontrés. Ainsi, les oncogènes *RET/PTC* jouent un rôle dans un grand nombre des cancers papillaires de la thyroïde, en particulier ceux qui proviennent d'une irradiation externe de la thyroïde ou qui surviennent chez les enfants. Des réarrangements chromosomiques liant le promoteur ou la partie N-terminale de certains gènes au fragment C-terminal du gène *RET* situé sur le chromosome 10 (Santoro et al., 1992). *RET* code pour un récepteur tyrosine-kinase de facteurs de croissance de la famille GDNF. Les formes chimériques oncogènes de *RET* sont actives de façon constitutive dans la thyroïde et, à elles seules, elles peuvent provoquer des cancers thyroïdiens chez des souris transgéniques (Santoro et al., 1996). L'activité constitutive de *RET* stimule de nombreuses voies de signalisation, en particulier Shc-Ras-Raf-Mek-ERK (Durick et al., 1998) et procure aux cellules certaines caractéristiques tumorales telles que la prolifération, l'inhibition de l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion et les métastases (Jameson et Weetman, 2001). D'autres mutations sont responsables de cancers thyroïdiens, en particulier au niveau de la sérine/thréonine kinase *BRAF* (Kimura et al., 2003) ou d'autres récepteurs tyrosine-kinase comme *TRK1*.

Plusieurs autres facteurs sont également à l'origine des cancers thyroïdiens : une irradiation ionisante, une exposition aux rayons X, une alimentation riche en crucifères contenant des composés intervenant dans le métabolisme thyroïdien, des facteurs hormonaux et une carence en iode par exemple. La présence de goître, de nodules thyroïdiens ou de thyroïdite de Hashimoto favoriserait également l'apparition de ces cancers (Sulman et Carpentier, 1999).

1.1.1 Le carcinome papillaire

Il s'agit d'une tumeur différenciée qui peut résulter d'une surcharge iodée ou d'une irradiation. Du point de vue des altérations génétiques, des réarrangements du gène *RET* ou du gène *TRK1* semblent relativement spécifiques du cancer papillaire. Par ailleurs on peut également incriminer des mutations de la protéine *RAS*, des délétions de gènes suppresseurs de tumeur, des mutations du récepteur *TSH* et de la sous-unité *Gsa* des protéines *G* (Jameson et Weetman, 2001).

Malgré son apparence souvent multifocale et sa tendance à envahir des structures internes et adjacentes à la thyroïde, ce cancer possède un bon pronostic de guérison en cas de détection précoce. L'évolution du cancer papillaire conduit à l'apparition, par voie lymphatique, de métastases ganglionnaires, cervicales et sus-claviculaires. Les os et les poumons sont les sites de prédilection à distance des métastases. Il est le plus fréquent, prédomine chez les sujets jeunes et représente 60% des cancers thyroïdiens. Il sécrète de la thyroglobuline et est radiosensible (Jameson et Weetman, 2001 ; Sulman et Carpentier, 1999) (**Figure 1.1**).

1.1.2 Le carcinome médullaire

Le carcinome médullaire représente 5 à 7% des cancers thyroïdiens. Il existe sous forme sporadique et familiale, et correspond à une tumeur des cellules C ou parafolliculaires issues des crêtes neurales. Ces cellules ne captent pas l'iode et ne sont pas régulées par la TSH ; par contre elles sécrètent de la calcitonine qui constitue un marqueur de ce type de cancer.

Vingt pour cent des cancers médullaires ont une origine familiale par transmission autosomique dominante du gène RET suractivé. Ces tumeurs évoluent localement ou à distance et manquent de thérapie adjuvante en cas de métastases (Sulman et Carpentier, 1999).

1.1.3 Le carcinome folliculaire

Ce carcinome représente 30 % des cancers thyroïdiens et peut être très bien ou peu différencié. Il possède un moins bon pronostic que le cancer papillaire parce que la plupart des patients se présentent à un stade plus avancé de la maladie. Il peut avoir pour origine une carence en iode stimulant la production de TSH ou des altérations génétiques. Parmi ces dernières, des mutations de RAS et des délétions au niveau de gènes suppresseurs de tumeur sont les plus courantes (Jameson et Weetman, 2001).

Ce cancer dissémine majoritairement par voie sanguine et génère des métastases osseuses, pulmonaires et au niveau du système nerveux central. Ce type de cancer sécrète de la thyroglobuline et est radiosensible (Sulman et Carpentier, 1999).

1.1.4 Le carcinome anaplasique

Il est rare (moins de 5 %), apparaît chez des personnes de plus de 50 ans et est considéré par certains comme l'évolution de cancers différenciés. Des mutations de p53, acteur important dans la régulation du cycle cellulaire, sont concernées dans le développement de ces cancers (Jameson et Weetman, 2001). Ce cancer est d'une gravité extrême puisqu'il dissémine rapidement par voie sanguine et lymphatique et qu'il répond peu au traitement. Les cellules anaplasiques ne produisent pas de thyroglobuline, ne concentrent pas de l'iode radioactif et sont dépourvues de récepteurs membranaires à la TSH.

1.1.5 Traitements des cancers thyroïdiens

Les moyens thérapeutiques font appel à la chirurgie, à la radiothérapie métabolique ou externe, à l'hormonothérapie et parfois à la chimiothérapie.

Le traitement principal de type chirurgical consiste en l'ablation du nodule malin (lobectomie) sauf dans le cas du cancer médullaire qui requiert une thyroïdectomie

totale. On réalise dans certains cas un curage ganglionnaire bien que celui-ci n'améliore pas pour autant le taux de survie (Sulman et Carpentier, 1999). S'il persiste du tissu fonctionnel, de l'iode radioactif (^{131}I) est injecté à raison d'une dose de 30 à 100 mCi, préférentiellement captée par la thyroïde. Quarante pour cent des métastases thyroïdiennes sont capables de fixer l'iode et peuvent donc être traitées par cette méthode. L'iode radioactif agit par émission de rayonnements γ et β mais ce sont ceux de type β qui détruisent les cellules thyroïdiennes sans affecter les tissus avoisinants. Cette ablation à l'iode radioactif permet donc d'éliminer le tissu normal résiduel et peut traiter des cellules tumorales persistantes. La radiothérapie externe, consistant en l'administration d'une dose de 55 à 60 Grays sur la tumeur et les aires ganglionnaires adjacentes, est rarement utilisée.

Le traitement hormonal fait suite à la thyroïdectomie totale et l'administration d' ^{131}I . Il consiste en l'administration de thyroxine, hormone inhibitrice de la sécrétion de TSH. La plupart des tumeurs différenciées expriment des récepteurs à TSH et la TSH, par fixation, exerce un effet stimulant sur la croissance des cellules thyroïdiennes. L'administration de thyroxine empêche la formation de nouveaux nodules et permet d'assurer un équilibre fonctionnel thyroïdien.

Par ailleurs, la chimiothérapie est peu efficace (effet partiel dans 10 à 20 % des cas et de courte durée) et est associée à la radiothérapie pour les formes localisées avancées inopérables. La doxorubicine est le principal agent chimiothérapeutique et est administré à une posologie de 60 mg/m² de surface corporelle. Cette thérapie est indiquée dans les métastases rapidement évolutives de cancers différenciés, les cancers médullaires métastatiques et les cancers anaplasiques évolués. En ce qui concerne les cancers différenciés (papillaires et folliculaires), les débats restent ouverts entre la pratique d'une thyroïdectomie totale ou d'une lobo-isthmectomie. Cette dernière présente l'avantage d'une moindre incidence d'hypoparathyroïdie mais empêche toutefois de pouvoir pratiquer un scanner à l'iode radioactif lors du suivi des patients après opération. La thyroïdectomie totale présente comme désavantage un taux de morbidité élevé. Pour les cancers médullaires, la thyroïdectomie totale associée au curage ganglionnaire constitue le traitement principal. Les cancers anaplasiques nécessitent une intervention chirurgicale. Dans les formes inopérables, une radiothérapie et une chimiothérapie seront de rigueur. Enfin, pour les métastases à distance d'un cancer papillaire ou folliculaire, on envisage une thyroïdectomie afin de les rendre accessible à l'iode radioactif. En cas de récurrences locales, on traite si possible chirurgicalement et de façon concomitante à l'iode radioactif et à l'hormonothérapie. Si ce n'est pas le cas, on traite par radiothérapie externe (Jameson et Weetman, 2001 ; Sulman et Carpentier, 1999).

1.2 L'endothéline

1.2.1 Origine et structure de l'endothéline

En 1988, Yanagisawa et son équipe ont isolé un peptide à partir du surnageant de cellules aortiques de porc mises en culture. Ce peptide biologiquement actif est caractérisé par son potentiel vasoconstricteur sur les cellules endothéliales vasculaires et porte le nom d'endothéline 1 (ET-1) (**Figure 1.2**). Depuis lors, on lui attribue une grande diversité d'activités pharmacologiques dans les tissus faisant partie ou non du système cardiovasculaire (Inoue et al., 1989 ; Yanagisawa et al., 1989).

Par après, des études ont mis en évidence l'existence chez les mammifères, y compris les humains, de deux peptides distincts similaires à ET-1. Ces trois isomères appartiennent à la famille des endothélines (ETs) et sont appelés ET-1, ET-2 et ET-3 (Nelson et al., 2003). Ce sont de petits peptides de 21 acides aminés contenant dans leur structure deux ponts disulfure entre les acides aminés 1 et 15, et 3 et 11. La perte de ces ponts conduit à une réduction de l'activité biologique (Goraca, 2002). ET-1 et ET-2 diffèrent par 2 acides aminés sur les 21, et ET-3 diffère de ET-1 par six acides aminés.

En dehors de leurs différences de structure chimique, ces isomères diffèrent aussi par leur capacité d'induire une contraction de cellules musculaires lisses. ET-1 possède la plus forte activité vasoconstrictrice des trois tandis que les tensions maximales sont les plus élevées pour ET-2 (Inoue et al., 1989).

Par ailleurs, les ETs démontrent une similarité à certains composés du venin de serpent appelés sarafotoxines (Inoue et al., 1989). Notons aussi l'existence d'une quatrième isoforme d'endothéline découverte sur la muqueuse intestinale de rongeurs. Elle est appelée ET-4 ou encore vasoactive intestinal contractor (Donckier et al., 2004).

1.2.2 Clonage et séquençage des gènes

Chaque endothéline dérive d'un gène différent situé sur un chromosome séparé (Nelson et al., 2003) et présente une fonction et une distribution tissulaire distinctes. Afin d'identifier ces gènes, une banque d'ADN génomique humaine fut construite dans le phage λ EMBL3. Une sonde nucléotidique synthétique encodant une partie de la séquence de l'endothéline servit pour cribler la banque et cloner ces gènes. L'analyse de séquences a révélé trois gènes présentant une forte similarité dans la région encodant les ETs matures (résidus de 21 acides aminés) ; toutefois ces gènes restent distincts l'un de l'autre. Il s'agit du gène de la préproendothéline (PPET), précurseur de l'endothéline « classique » (ET-1), et ceux des précurseurs de ET-2 et de ET-3. Par ailleurs, cette même sonde utilisée en Southern blot a prouvé l'existence de trois loci équivalents au niveau du génome de porc et de rat (Inoue et al., 1989).

1.2.3 Synthèse, sécrétion et élimination de l'endothéline

L'endothéline, contrairement à d'autres facteurs, n'est pas stockée à l'intérieur de granules au sein des cellules endothéliales (Nakamura et al., 1990). Sa synthèse nécessite l'intervention de stimuli déclenchants qui activent la transcription de l'ARNm.

1.2.3.1 Facteurs stimulant la synthèse d'endothéline

Les cellules endothéliales, sous l'action de multiples stimuli, se mettent à fabriquer de l'endothéline (Goraca, 2002 ; Bagnato et Natali, 2004). Ces facteurs comprennent :

- La stimulation mécanique de l'endothélium, l'hypoxie, l'ischémie, la thrombine, les ions Ca^{++} , l'adrénaline, l'angiotensine II, la vasopressine, la dopamine et l'érythropoïétine.
- Des cytokines telles que les interleukines IL-1, IL-1 β et IL-6.
- Des facteurs de croissance : fibroblastique (FGF), épidermique (EGF), insuline-like (IGF) et transforming growth factor beta (TGF β), ainsi que des endotoxines.
- Des lipides : low density lipoprotein (LDL) et high density lipoprotein (HDL).
- Le shear stress.

Les substances inhibant la synthèse de ET sont le monoxyde d'azote (NO), le guanosine monophosphate cyclique (GMPc), le peptide atrial natriurétique (ANP), la prostacycline (PGI2) et la bradykinine.

1.2.3.2 Mécanismes de synthèse de l'endothéline

La synthèse de ET-1 commence par la transcription de l'ARNm en PPET ; celle-ci comporte 203 acides aminés. Des endopeptidases spécifiques clivent 164 acides aminés de la PPET afin de générer un résidu de 39 acides aminés appelé « big endothéline » (Goraca, 2002). Cette forme est sécrétée et circule dans le plasma (Levin, 1995). Ensuite, la big endothéline subit un clivage protéolytique, entre les résidus Trp21 et Val22, pour donner une forme mature de ET d'une longueur de 21 acides aminés (Inoue et al., 1989). Cette étape est catalysée par des métalloprotéases appelées enzymes de conversion de l'endothéline (ECE) (Pinet, 2004). Ces enzymes constituent un site régulateur pour la production d'ET active (**Figure 1.3**).

L'expression des ARNm de la PPET est influencée par divers stimuli chimiques et mécaniques agissant sur les cellules endothéliales. Ceci suggère un rôle important de ET dans la régulation du système cardiovasculaire (Inoue et al., 1989)

1.2.3.3 Clairance de ET

La dégradation de ET-1 circulante se fait majoritairement dans la circulation pulmonaire via un mécanisme dépendant d'un récepteur appelé ET_B (Dupuis et al., 1996). Alors que la clairance de ET-1 est rapide, celle de la big-endothéline est beaucoup plus lente et se produit au niveau du foie et des reins. Elle n'est pas médiée par un récepteur et est indépendante de l'activité de ECE (Burkhardt et al., 2000).

1.2.4 La famille des endothélines

1.2.4.1 ET-1

ET-1 est la forme principale dans le système cardio-vasculaire et la mieux caractérisée des ETs. Elle est produite majoritairement par les cellules endothéliales, épithéliales, mésangiales, hépatiques et musculaires lisses des vaisseaux, et dans une moindre mesure par les astrocytes et les neurones dans le système nerveux central. D'autres types cellulaires en sécrètent également comme les macrophages, les fibroblastes, les leucocytes polymorphonucléaires et des cellules cancéreuses (Donckier et al., 2004). Le temps de demi-vie de ET-1 est d'environ sept minutes (Levin, 1996) et celui de son ARNm se situe entre 15 et 20 minutes (Inoue et al., 1989). Les cellules endothéliales peuvent donc ajuster rapidement la production de ET aux besoins pour la régulation du tonus vasomoteur.

Diverses substances sont capables de stimuler la sécrétion de ET-1 et certaines prostaglandines (Ogpenorth et al., 1996) l'inhibent. ET-1 peut à son tour induire la sécrétion de NO, d'arginine, de vasopressine et de peptide atrial natriurétique, et participer ainsi au contrôle hormonal de la balance hydro-sodée. L'hypoxie et l'ischémie augmentent la sécrétion de ET-1, comme le fait l'insuline ; ceci pourrait jouer un rôle dans les troubles vasculaires du diabète (Levin, 1996). ET-1 augmente la pression sanguine et induit une hypertrophie vasculaire et myocardique (Goraca, 2002).

1.2.4.2

ET-2

La production de ET-2 se fait principalement dans les reins et l'intestin (Goraca, 2002), et accessoirement dans le myocarde et le placenta.

1.2.4.3 ET-3

ET-3 circule également dans le plasma mais on ignore toujours sa source (Yoshimoto et al., 1991). Les taux les plus élevés de ET-3 sont dans le cerveau où elle est probablement impliquée dans la régulation de la fonction neuronale (Goraca, 2002). On la trouve également dans le tractus gastrointestinal, le poumon et le rein (Donckier et al., 2004).

1.2.5 Les récepteurs de ET

Les ETs sont sécrétées à l'extérieur de la cellule. Dès lors, vu leur nature peptidique, elles ne peuvent agir sur les cellules que par l'intermédiaire de récepteurs situés en surface cellulaire. Ces derniers sont présents dans de nombreux organes comme le cœur, les glandes surrénales, les reins, les poumons et le système nerveux central (Goraca, 2002). Il existe deux types de récepteurs : le récepteur de type A (ET_A) et le récepteur de type B (ET_B). Ils sont encodés par deux gènes distincts localisés sur les chromosomes 4 et 13 respectivement. La comparaison de la séquence en acides aminés des deux récepteurs révèle qu'ils sont identiques à 50%, et que chaque type est fortement conservé parmi les espèces de mammifères (85 à 90%)(Levin, 1995). Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ils se situent en surface cellulaire et lient les trois ETs avec différentes affinités (Pinet, 2004).

On décrit plus rarement l'existence d'un troisième récepteur spécifique de ET-3 qu'on appelle récepteur ET_C. On le trouve au niveau des mélanophores dermiques de *Xenopus laevis* (Karne et al., 1993).

1.2.5.1 Récepteur ET_A

Le récepteur ET_A possède une affinité 10 fois plus grande pour ET-1 que pour ET-3 (Arai et al., 1990). Il s'exprime majoritairement en surface des cellules musculaires lisses vasculaires et des cardiomyocytes. Une fois ET-1 fixée, le récepteur est activé et induit un effet vasoconstricteur et mitogène via une chaîne de transduction de signal. Cette voie sera développée dans le chapitre suivant (physiologie des ETs). En plus de stimuler directement la prolifération sur les cellules normales et néoplasiques, le récepteur ET_A potentialise l'effet de facteurs de croissance couramment impliqués dans la croissance tumorale.

1.2.5.2 Récepteur ET_B

Le récepteur ET_B possède une affinité égale envers les trois isoformes de ET. On le trouve en surface des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des macrophages. En condition physiologique, l'activation de ce récepteur au niveau des cellules endothéliales induit une vasodilatation et prévient l'apoptose (Rich et al., 2003 ; Shichiri et al., 1997 ; Ortega Mateo et al., 1997). En conditions pathologiques telles que l'hypertension et la crise cardiaque, les taux de ET-1 sont augmentés. Dans ce cas, ET-1 se lie sur les récepteurs ET_A en surface des cellules musculaires lisses de sorte que ce soit l'effet vasoconstricteur qui l'emporte (Ortega Mateo et al., 1997).

1.2.6 Physiologie des ETs-« l'axe ET »

En se fixant sur leurs récepteurs, les ETs induisent des voies de transduction du signal qui donnent lieu à des processus fondamentaux essentiels pour la cellule et le maintien de l'intégrité de l'organisme. Le système impliquant les ETs, leurs précurseurs, leurs récepteurs et l'enzyme de conversion peut être appelé « l'axe endothéline ». Cet axe participe à de nombreux rôles physiologiques dont les principaux sont la différenciation tissulaire, la réparation et la croissance. Une dérégulation de l'axe ET conduisant à une production élevée de ET-1 ou de son récepteur favorise l'émergence de pathologies telles que des cancers, l'athérosclérose ou l'hypertension pulmonaire.

1.2.6.1 Effet paracrine

Les actions des ETs sont médiées par plusieurs voies de signalisation en aval d'un récepteur de surface cellulaire. Parmi ces voies, l'activation de la phospholipase C (PLC) conduit d'une part à la vasoconstriction via l'inositol trisphosphate (IP_3) et d'autre part à la stimulation de l'activité de la cascade de la mitogen-activated protein kinase (MAPK) via une protéine kinase C (PKC). La MAPK induit la transcription de gènes précoces intervenant dans l'activation du cycle cellulaire.

Comme nous l'avons dit précédemment, ET-1 se fixe majoritairement sur les récepteurs ET_A au niveau des cellules musculaires lisses et y lance, via des protéines G, la voie de transduction de signal qui commence par l'activation de la PLC (**Figure 1.4**). Beaucoup de réponses cellulaires induites par les ETs sont médiées par des changements de concentration en calcium cytoplasmique (Ca^{++}). La PLC coupe le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate membranaire (PIP_2) et conduit à la formation de 2 messagers secondaires : l' IP_3 qui diffuse dans le cytoplasme et le diacylglycérol (DAG) qui reste en membrane plasmique (Simonson et Herman, 1993 ; Neylon, 1999). L' IP_3 agit sur une classe particulière de canaux calciques (appelés récepteurs IP_3) situés sur les citernes du réticulum endoplasmique servant de réservoir au Ca^{++} . L' IP_3 entraîne alors une libération et une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. De plus, ce calcium intracellulaire provoque une entrée supplémentaire de calcium au travers de la membrane plasmique afin de prolonger la réponse cellulaire. Cette voie aboutit à la contraction des cellules musculaires (Simonson et Dunn, 1990).

Par ailleurs, le calcium et le DAG vont induire l'effet mitogénique de ET-1 (Simonson et Herman, 1993 ; Neylon, 1999) par l'activation d'une PKC. Cette voie mitogénique sera détaillée dans le chapitre « endothéline et prolifération ». De plus, ET-1 active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui elle-même active Akt. Cette voie participe au rôle prolifératif et anti-apoptotique de ET-1. Enfin, ET-1 phosphoryle des protéines cellulaires telles que p125FAK et p42.

1.2.6.2 Effet autocrine

ET-1 agit de façon autocrine en se fixant sur les récepteurs ET_B au niveau des cellules endothéliales et déclenchant ainsi une élévation de la concentration cytosolique en Ca^{++} . Cet ion se lie à la calmoduline pour déclencher une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation d'une NOS (NO synthase). Une autre voie dépendant de protéine tyrosine kinase couple aussi le récepteur ET_B à la NOS (Tsukahara et al., 1994). Une production et sécrétion de NO s'ensuivent et le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses où il active une guanylate cyclase. Celle-ci convertit le GTP en GMPc. Ceci aboutit à une

vasodilatation via une production accrue de NO et de prostaglandine dans les cellules musculaires lisses.

1.2.6.3 Rôles physiologiques et physiopathologiques

ET-1 est produite de manière constitutive par les cellules endothéliales et agit essentiellement comme acteur paracrine. En effet, on n'en retrouve qu'une très faible quantité dans le plasma car elle migre préférentiellement vers les cellules musculaires lisses sous-jacentes à la rencontre de récepteurs spécifiques de surface. Septante cinq pour cent de la production de ET suit ce chemin pour induire la contraction des cellules musculaires (Donckier et al., 2004 ; Yoshimoto et al., 1991). Les dosages plasmatiques des ETs et de la big endothéline révèlent des valeurs s'étalant entre 0,3 à 3 pg/ml (Donckier et al., 1991). Ce dosage plasmatique est toutefois utile car, premièrement, il est révélateur de pathologies telles que l'insuffisance cardiaque congestive, et deuxièmement il permet d'estimer la gravité de la maladie et peut servir de facteur pronostique (Yoshimoto et al., 1991). Les concentrations en ET dans les fluides corporels comme la salive, le lait, l'urine, et le liquide cébrospinal dépassent très largement celles du plasma (Donckier et al., 2004).

L'endothéline produit un large spectre d'effets biologiques (**Figure 1.5**). En plus de participer, de façon indispensable, au maintien du tonus vasomoteur et du flux sanguin des vaisseaux périphériques, elle possède des effets vasoconstricteurs (Levin, 1996) et vasodilatateurs locaux (par libération d'éicosanoïdes et/ou de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium), ainsi que des effets bronchoconstricteurs (Battistini et al., 1990), mitogènes (Inoue et al., 1989 ; Komuro et al., 1988), pro-inflammatoires (Teder et al., 2000) et inotropes et chronotropes positifs sur le myocarde (Inoue et al., 1989). Elle possède aussi des effets réno-vasculaires et parenchymateux sur le rein (Levin, 1996) et stimule la production d'hormones telles que le facteur auriculaire natriurétique, l'aldostérone et les catécholamines (Ortega Mateo, 1997 ; Luscher et al., 1995 ; Karne et al., 1993). Plusieurs de ces effets sont liés à une modulation de la libération de noradrénaline par les terminaisons orthosympathiques. De plus, les composants du système ET sont essentiels pour un développement embryonnaire et néonatal normal et pour les processus d'angiogenèse (Pinet, 2004).

Les rôles pathologiques d'ET-1 ont suscité un intérêt particulier auprès des chercheurs. En effet, des études ont pu démontrer une surexpression de l'axe ET dans certaines pathologies telles que l'asthme, l'hypertension pulmonaire et artérielle, l'insuffisance cardiaque congestive, l'infarctus du myocarde, et la fibrose pulmonaire (Levin, 1996). On a également pu démontrer une surexpression de l'axe ET dans toute une série de cancers tels que les cancers prostatique, ovarien, rénal, ou pulmonaire ; le rôle de ET dans le développement des cancers est de plus en plus souvent évoqué.

1.2.7 L'axe endothéline dans les cancers

Des recherches récentes montrent que ET inhibe l'apoptose et favorise la mitogenèse, l'invasion tumorale, l'angiogenèse et la néo-ostéogenèse, et qu'elle participe également à la nociception (**Figure 1.6**). Ces observations largement confirmées suggèrent que l'axe ET joue un rôle important dans les cancers et qu'il pourrait être une cible intéressante en thérapie anti-cancéreuse (Bagnato et Natali, 2004).

1.2.7.1 Endothéline et prolifération

L'endothéline contribue à la prolifération cellulaire sous différentes conditions physiologiques et pathologiques telles que la réparation de blessures, le développement de l'athérosclérose et la glomérulonéphrite (Takuwa et al., 1989). Elle induit la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, des ostéoblastes, des cellules mésangiales glomérulaires, des fibroblastes et des mélanocytes, sans oublier son effet mitogène dans les cellules cancéreuses prostatiques, cervicales et ovariennes (Bagnato et Natali, 2004).

Les effets mitogéniques de ET-1 sont médiés par la stimulation d'une PLC via le récepteur ET_A couplé aux protéines G. Activée, la PKC intervient dans la voie des MAPK, initiée par des facteurs de croissance et résultant en une augmentation rapide des gènes de réponse précoce c-fos, c-jun et c-myc (Neylon, 1999) (**Figure 1.7**). ET-1 potentialise l'effet mitogénique de facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet-derived growth factor), l'EGF (epidermal growth factor), le bFGF (basic fibroblast growth factor), l'insuline, l'IGF (insulin-like growth factor), le TGF (transforming growth factor) et l'IL-6 (Bagnato et Natali, 2004). La fixation du PDGF sur son récepteur crée un point d'arrimage pour d'autres protéines à partir desquelles partent des voies de transduction du signal. Parmi ces protéines, on retrouve la protéine Src, la PLC, la PI3-kinase et Grb2.

La protéine Grb2 fait partie de la voie des MAPK. Elle est attachée à une protéine Sos qui est un facteur d'échange du GTP. Le complexe Grb2-Sos active Ras, une petite protéine G en membrane plasmique liée au GDP. Ras-GTP se trouve dès lors sous sa forme active et interagit avec Raf pour induire la phosphorylation de la MAPK/ERK kinase et de la MAPK (**Figure 1.8**). Cette dernière est une Ser/Thr kinase qui phosphoryle toute une série de substrats, parmi lesquels le facteur de transcription AP-1 et p90, impliqués dans la transcription de gènes et la progression du cycle cellulaire (Neylon, 1999).

La protéine tyrosine kinase Src active, après plusieurs étapes, un facteur de transcription c-myc impliqué dans l'entrée en cycle cellulaire. Une voie de signalisation a également été caractérisée dans laquelle Src relie le récepteur ET-1 à l'induction de la transcription de c-fos. Toutefois, les mécanismes moléculaires impliqués entre le récepteur ET-1 et la transcription des gènes précoces restent flous (Simonson et al., 1996).

La PLC coupe le PIP₂ en IP₃ et DAG. Comme on l'a dit précédemment, IP₃ provoque la libération de Ca⁺⁺ tandis que DAG active la PKC. Cette PKC active une phosphatase qui coupe les phosphates présents dans le domaine de liaison à l'ADN de AP-1. Ce facteur libéré se fixe sur l'ADN et subit des phosphorylations par les MAPK afin de recruter un co-activateur parlant à la machinerie basale de transcription. La PI3-kinase aboutit après quelques étapes intermédiaires à l'activation de la protéine Akt. Celle-ci aura pour effet final la stimulation du facteur de transcription AP-1 impliqué dans l'entrée en cycle cellulaire.

1.2.7.2 Endothéline et apoptose

L'apoptose est un processus biologique qui élimine sélectivement les cellules surnuméraires, vieilles ou endommagées. Au cours de ce processus, les cellules mettent en place un mécanisme de suicide qui se traduit par de nombreux changements morphologiques : la cellule perd contact avec les cellules voisines, la membrane

plasmique bourgeonne pour former des vésicules (appelées corps apoptotiques) dans lesquelles le cytoplasme se répartit, et la chromatine se condense avant d'être dégradée et de former un profil d'« échelle d'ADN ». In vivo, ces corps apoptotiques sont rapidement éliminés par les cellules adjacentes et les macrophages. In vitro, la membrane plasmique finit par se rompre et le contenu cytoplasmique est relargué dans le milieu extracellulaire (**Figure 1.9**).

Deux voies principales amorcent l'apoptose et aboutissent toutes deux à l'activation d'une cascade de caspases (**Figure 1.10**).

1.2.7.2.1 Les caspases

Au nombre de 14, les caspases (Cysteiny Aspartate-Specific Proteinases) sont des protéines qui agissent en cascade en clivant toute une série de substrats. Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes) qui nécessitent des clivages protéolytiques pour les activer. On distingue deux familles de caspases : les caspases initiatrices (8,2,10,1,4,9) et les effectrices (3,6,7,14). Les initiatrices s'activent par auto-catalyse et ont pour rôle de cliver les effectrices. Ces dernières sont alors activées et clivent leurs substrats. Parmi eux des protéines cytoplasmiques et nucléaires sont impliquées dans la réplication et réparation d'ADN, dans la division cellulaire et dans la structure du cytosquelette. Lorsque cette cascade de caspases est déclenchée, elle conduit irrémédiablement à la mort cellulaire.

1.2.7.2.2 Les voies d'initiation de l'apoptose

Deux voies principales initient l'apoptose. La première voie, intrinsèque, est enclenchée par la privation de facteurs de croissance ou par des cytokines, des stress provoquant des dommages à l'ADN (rayons UV), et le détachement de cellules adhérentes. Cette voie est régulée par les membres de la famille Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) et dépend des mitochondries. Celles-ci renferment des molécules à pouvoir pro-apoptotique telles que le cytochrome c (cyt-c) et les pro-caspases 2,3 et 9. Ces molécules, une fois libérées dans le cytoplasme, vont agir sur les caspases ou au niveau de la fragmentation de l'ADN. Ainsi le cyt-c se lie à Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1), qui, en présence d'ATP recrute la pro-caspase 9 au sein de l'apoptosome et l'active. La caspase 9 activée clive les caspases effectrices 3,6 et 7.

La seconde voie, appelée voie extrinsèque, fait appel aux récepteurs de mort situés en membrane plasmique. Les récepteurs de mort font partie de la famille des récepteurs au TNF (TNFR, Tumor Necrosis Factor Receptor) et sont activés par fixation du ligand. Cette voie aboutit à l'activation de caspase 8 qui active directement la caspase 3 sans passer par la mitochondrie.

1.2.7.2.3 Agents pro-apoptotiques

L'étoposide est un agent anti-cancéreux utilisé dans le traitement de cancers du poumon à petites cellules, dans les lymphomes malins et dans les cancers ovariens. Il possède un effet pro-apoptotique par inhibition de la topoisomérase II. Celle-ci provoque des coupures double-brins provisoires au niveau de l'ADN, ce qui permet de maintenir la structure de l'ADN en évitant les phénomènes de surtension occasionnés par la réplication, la transcription et la réparation. L'ADN déroulé se trouve accessible à la machinerie de réplication ou de réparation. Les inhibiteurs des topoisomérases ne

s'intercalent pas dans l'ADN mais se lient au complexe topoisomérase-ADN au stade de clivage et empêche l'étape de religation. Les cassures double-brins ainsi créées au niveau de l'ADN sont définitives et sont perçues comme des dommages à l'ADN. Le facteur de transcription p53 est activé et initie l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer les dégâts occasionnés. Si elle n'y parvient pas, p53 déclenche l'apoptose en induisant l'expression de différentes protéines pro-apoptotiques.

Un autre agent apoptotique et anti-néoplasique fréquemment utilisé pour le traitement de lymphome, du cancer du sein, du cancer du poumon et des sarcomes est la doxorubicine, qui, contrairement à l'étoposide, s'intercale dans l'ADN. Cette substance contient plusieurs noyaux aromatiques condensés, de dimension et de structure telles qu'elles provoquent une distorsion de la molécule d'ADN. Ceci empêche la progression des ARN et ADN polymérase et provoque l'inhibition de la réplication et de la transcription. Les mécanismes cytotoxiques de la doxorubicine s'exercent aussi par la génération de radicaux libres et par sa liaison non dissociable aux topoisomérases qui entraîne des cassures mono- et bi-caténaires. Ces différents processus conduisent la cellule à l'apoptose.

1.2.7.2.4 Rôle de l'endothéline dans l'apoptose

En condition physiologique, elle permet de réguler le nombre de cellules (Shichiri et al., 1997). L'inhibition de l'apoptose peut conduire à des troubles tels que la resténose vasculaire, l'hyperplasie prostatique bénigne et la formation de tumeurs. A l'inverse, l'excès d'apoptose amène à des maladies dégénératives chroniques et à des immunodéficiences (Sanchez-Capelo, 2005). L'endothéline est un agent suppresseur d'apoptose des cellules cancéreuses et participe ainsi à leur survie (Nelson, 2003).

On connaît peu de chose sur la régulation de l'apoptose initiée par ET-1. Des études ont démontré que ET-1 possède à la fois des effets anti- et pro-apoptotiques sur différents types cellulaires mais on ne sait toujours pas si ces effets opposés sont engendrés par des voies identiques ou différentes (Wu-Wong et al., 2000). Les voies apoptotiques initiées par ET-1 font intervenir des kinases telles que la PKC, l'EGF receptor kinase, et la MAPK.

1.2.7.2.5 Rôles de Akt

Dans les carcinomes coliques, ET-1 agit comme un facteur de survie en inhibant l'apoptose induite par le paclitaxel ou par le FAS ligand. Dans les carcinomes ovariens, ET-1 prévient l'apoptose induite par le paclitaxel en déclenchant des signaux anti-apoptotiques par les voies Akt dépendant de Bcl-2 et passant par la PI3-kinase (PI3K). L'apoptose déclenchée par le paclitaxel se déroule via l'augmentation de la phosphorylation de Bcl-2 (Del Bufalo et al., 2002).

Akt, appelée aussi protéine kinase B (PKB), est une sérine/thréonine kinase activée par la PI3K. Akt joue un rôle pivot dans différents processus, à savoir la progression du cycle cellulaire, la différenciation des cellules musculaires lisses, l'angiogenèse, l'inhibition de l'apoptose, la croissance cellulaire et favorise ainsi la croissance tumorale. Plus récemment, on lui attribue un rôle dans la motilité. Son rôle anti-apoptotique se réalise en phosphorylant une série de substrats incluant BAD, la caspase-9, NF- κ B, GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 β) et CREB qui sont tous des protéines pro-apoptotiques. La PI3K génère des phosphatidyl-inositol bi/tri phosphates (PIP₂ et PIP₃) qui recrutent Akt et

PDK₁ (phosphoinositide-dependent protein kinase-1) en membrane plasmique du côté cytosolique. Suite à sa fixation, Akt change de conformation et s'active par phosphorylation grâce à PDK₁. Ensuite, Akt quitte la membrane plasmique et phosphoryle à son tour une série de molécules pro-apoptotiques pour les inactiver et provoquer ainsi la survie des cellules. Les cibles de Akt sont majoritairement cytosoliques (par exemple, Caspase-9, Bad), d'autres sont nucléaires. Certains cancers ne présentent pas une activation constitutive d'Akt alors que d'autres, tel le cancer du sein, en ont une (Okano et al., 2000 ; Sanchez-Capelo, 2005) (**Figure 1.11**).

L'activation de la voie Akt est aussi impliquée dans les cancers et d'autres pathologies thyroïdiennes en favorisant la croissance cellulaire, la survie et la motilité. Cette voie serait activée par différents oncogènes de cancers thyroïdiens, à savoir p21 activé, des réarrangements du gène RET (Vasko et al., 2004), une surexpression ou mutation d'Akt, des altérations de kinases ou phosphatases qui régulent l'action d'Akt, des mutations de Ras, des mutations et/ou surexpression d'une variété de récepteurs tyrosine kinase. Comparés à la thyroïde normale, 80% des cancers folliculaires et 30% des cancers papillaires présentent des taux d'Akt phosphorylé fort élevés (Ringel et al., 2001).

1.2.7.2.6 Rôles de ERK

ERK (extracellular signal-regulated kinases) est une kinase faisant partie d'une voie de signalisation à effet anti-apoptotique. Cette voie ERK1/2 est activée par fixation de ET-1 sur les récepteurs couplés aux protéines G, mais les mécanismes sous-jacents restent mal connus. Ces récepteurs couplés aux protéines G ont un rôle assez controversé puisqu'on leur attribue à la fois des rôles apoptotiques et anti-apoptotiques. Ainsi ET-1 est anti-apoptotique dans les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Par contre ET-1 induit l'apoptose dans des cellules de mélanome humain.

1.2.7.3 Endothéline et métastases osseuses

De nombreux facteurs, dont ET-1, sont impliqués dans le développement et la progression de métastases osseuses. Des métastases osseuses s'observent dans les cancers avancés de la prostate et stimulent les ostéoblastes à la nouvelle formation d'os. ET-1 est un des facteurs intervenant dans ce processus en stimulant la mitogenèse des ostéoblastes et en diminuant l'activité des ostéoclastes.

1.2.7.4 Endothéline et invasion tumorale

Les cancers ovariens présentent des taux élevés de ET-1 plasmatique. Elle participerait à la production de métalloprotéases matricielles (MMPs) qui dégradent la matrice extracellulaire, à la sécrétion de précurseurs d'enzymes protéolytiques et enfin à l'activation enzymatique d'une autre famille de protéases impliquées dans les métastases, le système uPA. Ces actions facilitent le développement de métastases (Bagnato et Natali, 2004). La phosphorylation de FAK et de la paxilline stimulée par ET-1 sont d'autres processus également impliqués dans l'invasion et les métastases.

Par ailleurs, l'invasion tumorale se déroule suite à une communication intercellulaire défectueuse. ET-1 rompt les jonctions intercellulaires et dégrade des connexines liant les cellules à la matrice, notamment Cx43. Ainsi, les cellules se détachent les unes des autres et permettent l'infiltration de cellules tumorales (Bagnato et Natali, 2004).

1.2.7.5 Endothéline et angiogenèse

La néoangiogenèse est un processus qui se déroule en plusieurs étapes incluant la prolifération des cellules endothéliales, la migration, l'invasion, la production de protéase et la formation d'un vaisseau. ET-1 module ces étapes en se fixant sur ses récepteurs. Le récepteur ET_B semble impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales tandis que le récepteur ET_A participe d'une part à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et des péricytes et stimule d'autre part la production de VEGF (vascular endothelial growth factor). Ce facteur provoque la prolifération de cellules endothéliales et augmente la perméabilité vasculaire via HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α), un régulateur de la croissance tumorale et de l'angiogenèse (Bagnato et Natali, 2004).

1.3 Les antagonistes de l'endothéline

1.3.1 Introduction

Suite à la découverte du rôle potentiel de ET dans les pathologies et les cancers, des antagonistes aux récepteurs de ET ont été mis au point. Ils peuvent être de nature peptidique ou non-peptidique et peuvent être sélectifs ou non des récepteurs A et B. Ces antagonistes ont été testés in vitro, d'une part pour élucider le rôle de ET dans différentes pathologies et cancers, d'autre part pour traiter certaines maladies où ET agit comme médiateur. De plus, le fait que les cancers expriment majoritairement le récepteur ET_A amène au développement d'antagonistes sélectifs de ce récepteur afin de comprendre son implication (**Tableau 1**).

Les antagonistes non spécifiques bloquent la vasoconstriction et les effets du peptide sur l'endothélium en bloquant les récepteurs ET_A et ET_B. Les antagonistes sélectifs des récepteurs ET_A ont pour avantage de ne pas empêcher la vasodilatation dépendante de ET via les récepteurs ET_B. Toutefois la vasoconstriction médiée par les récepteurs ET_B n'est pas affectée par ces antagonistes (Luscher et al., 1995).

A partir de 1992, la création des premiers antagonistes peptidiques apparaît tels que le BQ-123, antagoniste sélectif du récepteur ET_A, et le BQ-788 spécifique du récepteur ET_B. Bien que leur usage fut destiné à approfondir le rôle de l'ET dans les processus pathologiques, ils furent rapidement remplacés par des antagonistes non-peptidiques en raison de leur courte durée d'action et d'un manque de biodisponibilité orale. Dans cette nouvelle catégorie d'antagonistes, on peut citer le J-104132 qui bloque les récepteurs ET_A et ET_B avec une affinité 500 et 1000 fois supérieure respectivement par rapport au bosentan, antagoniste non-peptidique non spécifique (Nishikibe et al., 1999).

1.4 Effets d'antagonistes sur les pathologies

L'antagonisme des récepteurs à l'ET s'est montré bénéfique chez les patients présentant une hypertension pulmonaire (Rich et al., 2003). Ainsi, l'administration de bosentan (antagoniste non-spécifique) ou de sitaxentan (antagoniste sélectif du récepteur ET_A) améliore chez les patients leurs symptômes, leur capacité à l'effort, leurs paramètres hémodynamiques et leur évolution (Donckier et al., 2004).

Dans l'hypertension artérielle, les antagonistes empêchent l'hypertension vasculaire et la surcharge du myocarde.

Dans le cas de l'athérosclérose, le fait de bloquer les récepteurs à l'ET permet d'éviter le dysfonctionnement endothélial. Par ailleurs, l'antagonisme de ces récepteurs donne des résultats positifs dans le traitement de l'ischémie du myocarde (Spieker et al., 2001). L'insuffisance cardiaque chronique est caractérisée par des taux élevés de ET-1 plasmatiques. Le bosentan se montre efficace dans le traitement de cette pathologie réduisant la pression artérielle, la pression artérielle pulmonaire et la résistance vasculaire (Kiowski et al., 1995). Cependant, un effet bénéfique sur la mortalité cardiovasculaire n'a pas été démontré dans les études cliniques de phase III. En sachant que les récepteurs ET_A et ET_B participent tous deux à la vasoconstriction chez les patients atteints d'insuffisance cardiaque, l'antagoniste idéal serait celui qui inhiberait les effets vasoconstricteurs des récepteurs ET_A et ET_B en préservant l'effet vasodilatateur du récepteur ET_B endothélial (Love et al., 1996).

1.5 L'atrasentan

Il s'agit d'un antagoniste non-peptidique qui se lie fortement (constante d'affinité $K_i = 34\text{pM}$) et de manière sélective sur le récepteur ET_A ($1862 \times \text{ET}_A > \text{ET}_B$). Par fixation sur ce récepteur, il bloque les voies de transduction de signal conduisant à la prolifération cellulaire et à d'autres processus participant à la croissance tumorale, y compris la néoangiogenèse, le flux sanguin et la néo-ostéogenèse (Carducci et al., 2002).

Les études cliniques de phase II et III de l'atrasentan dans le traitement du cancer prostatique métastatique réfractaire au traitement hormonal ont montré une stabilisation de l'antigène prostatique PSA, et une suppression des marqueurs biochimiques et cliniques de la progression cancéreuse au niveau des os. La firme Abbott a introduit une demande d'autorisation de mise sur le marché de l'atrasentan aux USA sous le nom de XinlayTM. Les doses utilisées dans les études allaient de 10 à 75 mg, mais des effets indésirables sérieux comme des maux de tête importants apparaissent à partir de 60 mg par jour, qui est considérée comme la dose maximale journalière tolérée chez la majorité des patients.

L'atrasentan est pris oralement, il présente une bonne biodisponibilité, est rapidement absorbé de façon passive et possède une pharmacocinétique linéaire proportionnelle à la dose quand il est administré en une dose unique par jour (dans une gamme de dose s'échelonnant entre 10 et 60 mg).

Les concentrations plasmatiques à l'équilibre sont d'environ 360 nM soit au moins 1000 fois supérieures au K_i pour le récepteur ET_A. L'affinité pour le récepteur ET_A est beaucoup plus forte in vitro qu'in vivo (environ 30 fois supérieure) puisque dans cette dernière situation il faut tenir compte de la liaison de la substance au niveau des protéines plasmatiques. Ce taux de liaison aux protéines plasmatiques est élevé (environ 99%) et est indépendant de la dose. Le temps nécessaire pour atteindre une concentration plasmatique maximale (C_{max}) est de 1,5 heures. Son temps de demi-vie étant relativement long, approximativement 24 heures, la valeur de C_{max} augmente de 70 % environ entre le jour 1 et jour 28 de traitement. La concentration plasmatique d'équilibre est atteinte endéans les 7 jours (Carducci et al., 2002). L'atrasentan est fortement métabolisé car on

en retrouve qu'une infime proportion ($<0,1\%$) dans les urines. Le K_m vaut $0,48\text{ }\mu\text{g/ml}$. Son grand volume de distribution ($\sim 6\text{L/Kg}$) s'explique par un retour lent de la substance du tissu vers le plasma. Ce grand volume de distribution et une clearance relativement lente produisent un long temps de demi-vie.

Dans un même temps, les concentrations en ET immunoréactive ont été déterminées. Ces concentrations augmentent linéairement avec celles de l'atrasentan. Ceci conforte dans l'idée que l'atrasentan agit comme antagoniste du récepteur ET_A . Toutefois il reste à déterminer si l'atrasentan augmente les taux plasmatiques de ET-1 par déplacement de ET-1 de son récepteur ou par antagonisme d'un feedback inhibiteur.

Les effets secondaires les plus courants consistent en des maux de tête, des rhinites, de l'asthénie et un œdème périphérique et reflètent l'activité pharmacologique de l'antagonisme spécifique du récepteur ET_A . Les antagonistes spécifiques de ce récepteur produisent une vasodilatation via de multiples mécanismes tels que l'inhibition de l'activité de ET-1 et la production de NO. Cependant l'atrasentan n'a pas montré de toxicité grave jusqu'à présent. Les effets secondaires sont traitables et ne nécessitent pas l'arrêt du traitement dans la plupart des cas, en comparaison avec ceux causés par une chimiothérapie conventionnelle.

1.6 Usage de l'atrasentan et d'autres antagonistes en cancérologie

1.6.1 Cancer ovarien

Les cancers ovariens sont une cause importante de mortalité chez la femme et sont marqués par une surexpression de l'axe ET-1 et du récepteur ET_A . Puisque ces cancers ne possèdent pas de thérapie permettant une survie à long terme, les recherches thérapeutiques se sont penchées sur le ciblage de l'axe ET.

L'antagoniste du récepteur ET_B , le BQ-788, ne s'avère pas efficace bien que les cellules cancéreuses ovariennes expriment les deux récepteurs (Salani et al, 2002). Le BQ-123 inhibe fortement la croissance, la survie cellulaire, la production de VEGF et l'activité de protéase induite par ET-1 ; ces protéases étant impliquées dans l'invasion et la migration (Nelson, 2003). L'atrasentan a été testé in vitro et in vivo seul ou en combinaison avec les taxanes (Rosano et al., 2003). Chez les patients traités à l'atrasentan, on observe une inhibition de la croissance tumorale et de la néoangiogenèse ainsi qu'une activité apoptotique. Un effet apoptotique et antiprolifératif plus important est observé en combinant l'atrasentan avec le paclitaxel, sans induire de toxicité supplémentaire (Bagnato et Natali, 2004).

1.6.2 Cancer prostatique et métastases osseuses

Les cancers prostatiques sont également caractérisés par une surexpression de l'axe ET qui interviendrait dans ce type de cancer comme facteur de croissance et de survie. L'administration d'atrasentan chez ces cancéreux bloque les effets prolifératifs de ET-1 et induit une stabilisation tumorale, en particulier des métastases osseuses, comme démontré dans les études cliniques citées ci-dessus. Des modèles in vitro de co-culture entre des lignées de cellules cancéreuses prostatiques (MDA PCa2b) et des ostéoblastes primaires de souris (PMOs) démontrent que les PMOs induisent la prolifération des cellules MDA. In vivo, l'injection de ces MDA dans l'os de souris immunodéficientes stimule la

formation d'os. Ces résultats suggèrent que des facteurs solubles sécrétés par les PMOs et par les cellules cancéreuses prostatiques sont impliqués dans une boucle paracrine qui résulte en une nouvelle formation d'os et en une croissance du cancer de la prostate. ET-1 jouerait un rôle médiateur prépondérant (Fizazi et al., 2003).

ET-1 produite par les cellules cancéreuses prostatiques est présente à des taux élevés dans la circulation chez la plupart des cancéreux. Deux phénomènes l'expliquent : tout d'abord les lignées cellulaires prostatiques cancéreuses ainsi que les métastases prostatiques expriment des quantités plus importantes d'ET-1. Parallèlement à ce fait, la clairance de ET-1 dans ces mêmes lignées diminue durant la progression cancéreuse: les cellules cancéreuses régulent l'expression d'endopeptidase neutrale, une enzyme de dégradation de l'ET, et aussi la clairance réalisée via les récepteurs ET_B (Carducci et al., 2002). ET-1 est impliquée dans les métastases osseuses par ses effets prolifératifs sur les ostéoblastes et par ses effets sur l'expression de gènes spécifiques d'ostéoblastes (Fizazi et al., 2003).

Toutefois, ET-1 ne serait pas le seul facteur incriminé. Elle agirait de façon concomitante avec d'autres facteurs, dont l'IGF (insulin-like growth factor) et le PSA, pour stimuler la mitogenèse et la différenciation des ostéoblastes et diminuer l'activité de résorption et de motilité des ostéoclastes. Les IGF ont des effets mitogéniques et anti-apoptotiques sur les cellules cancéreuses prostatiques et les ostéoblastes par fixation sur des récepteurs (IGFR). Cette fixation est régulée via l'IGFBP-3 (IGF-binding protein-3), une protéine liant l'IGF et ayant un rôle anti-prolifératif. Les PSA sont reconnus pour avoir une activité protéolytique sur l'IGFBP-3 et ont des taux particulièrement élevés dans les cancers prostatiques, ce qui explique l'atténuation des effets anti-prolifératifs de IGFBP-3 observés dans ces cancers. Il arrive toutefois que certains cancers prostatiques présentent des lésions ostéolytiques plutôt qu'ostéoblastiques : cela dépend du type de cellules cancéreuses. Alors que ET-1 stimule la croissance des ostéoblastes, l'administration seule d'atrasentan in vitro inhibe partiellement cet effet. De plus, dans les modèles de co-culture on observe que ce même agent inhibe en partie l'effet stimulant des cellules cancéreuses sur les ostéoblastes (Fizazi et al., 2003).

Toutes ces découvertes in vitro et in vivo démontrent que, de par ses activités anti-tumorales, l'atrasentan constitue une base essentielle dans le traitement de cancers surexprimant le système ET. Jusqu'ici, le problème majeur rencontré par la chimiothérapie dans le traitement anticancéreux est la résistance des cellules tumorales à la cytotoxicité de l'agent utilisé. Le blocage du récepteur ET_A sensibilise les cellules tumorales à l'apoptose induite par l'agent chimiothérapeutique et permet ainsi une régression tumorale. La combinaison d'un antagoniste du récepteur ET_A, tel l'atrasentan, avec une substance cytotoxique conventionnelle offre des perspectives intéressantes dans les études cliniques évaluant les propriétés de l'antagoniste (Bagnato et Natali, 2004).

1.7 Endothéline et thyroïde

1.7.1 Physiologie

Possédant un lit vasculaire particulièrement bien développé, il fut naturel de se demander si la thyroïde pouvait synthétiser ET. ET-1 fut observée pour la première fois, en 1992, au niveau des cellules folliculaires de rat et de porc. Elle est principalement située dans les cellules épithéliales folliculaires (Colin et al., 1992). Ce n'est qu'en 1993 qu'une production d'endothéline par des thyrocytes humains fut prouvée. La sécrétion de ET-1

dans les cellules thyroïdiennes est stimulée par un récepteur couplé aux protéines G (récepteur sensible à la toxine pertussique). Cette voie est régulée par plusieurs mécanismes de transduction du signal incluant AMPc, Ca^{++} , PKC (Vainio et al., 1996).

On a pu démontrer par après la présence de récepteurs à ET-1 au niveau de thyrocytes humains (Jackson et al., 1992). Les cellules ainsi que les vaisseaux thyroïdiens sécrètent physiologiquement ET-1 mais ses rôles dans la thyroïde restent hypothétiques. On sait que le flux sanguin thyroïdien change fortement dans différentes conditions pathologiques et que ET-1 et NO seraient impliqués (Colin et al., 1995). ET-1 pourrait agir de façon paracrine et/ou autocrine afin de réguler le tonus vasomoteur intra-thyroïdien et certaines fonctions du thyrocyte (Donckier et al., 2004). Une boucle de rétroaction s'installe entre des composés iodés, qui induisent l'expression de ET-1, et celle-ci qui module le métabolisme de l'iode (Isozaki et al., 1993).

ET-1 stimule l'expression de l'ARNm codant pour C-fos ainsi que la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire induite par l'IGF-1 (Miyakawa et al., 1992). Par contre, elle inhibe les effets stimulateurs de la TSH (thyroid stimulating hormone) sur la synthèse d'ADN, la prolifération cellulaire et la production d'AMPc. Ce serait médié par des voies dépendant de kinases C. Tseng et son équipe démontrent que la TSH stimulerait la synthèse d'ET dans la thyroïde humaine. Le TGF- β stimulerait la synthèse d'ET et sa sécrétion (Tseng et al., 1993) et entraînerait une augmentation du nombre de récepteurs à l'ET. Ces observations ne font toutefois pas l'unanimité parmi les chercheurs puisque certains prétendent que la TSH n'exercerait aucune influence sur la sécrétion de ET-1 (Vainio et al., 1996) ; d'autres disent que la TSH diminuerait les taux d'ARNm codant pour ET-1 et la sécrétion de ET-1. Ces derniers auteurs affirment aussi que l'iodure augmenterait ces deux derniers effets (Isozaki et al., 1993) et que ET-1 inhiberait la capture de l'iode induite par la TSH. Ils en déduisent que ET-1 produite par les cellules thyroïdiennes pourrait réguler de façon autocrine et/ou paracrine leur fonction ainsi que le flux sanguin thyroïdien (Tsushima et al., 1994).

L'ET a une action inhibitrice sur la libération de thyroglobuline qui est réalisée par un mécanisme nucléotidique non cyclique (Jackson et al., 1992). On a découvert la présence du peptide auriculaire natriurétique dans les cellules folliculaires. Il agit de manière autocrine en réduisant la synthèse de thyroglobuline in vitro et la sécrétion d'hormone in vivo. ET-1 pourrait donc être impliquée avec d'autres peptides dans le contrôle peptidergique de la thyroïde (Colin et al., 1992).

1.7.2 Pathologies

Si l'axe ET joue un rôle important dans la physiologie de la thyroïde, sa surexpression semble par contre impliquée dans le développement de certains cancers thyroïdiens et thyroïdites comme par exemple les carcinomes papillaire et médullaire et la thyroïdite d'Hashimoto. Dans ces processus pathologiques, ET-1 pourrait induire une prolifération excessive des cellules thyroïdiennes (Donckier et al., 2004).

Au niveau des cellules cancéreuses papillaires et médullaires, on observe une augmentation d'expression de ET-1, de son récepteur ET_A et de l'enzyme de conversion de l'endothéline. Cette hyperactivité de l'axe endothéline favoriserait la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, l'angiogenèse et le développement de métastases osseuses (Donckier et al., 2004).

1.7.2.1 Thyroïdite d'Hashimoto

Dans la thyroïdite d'Hashimoto, ET-1 est présente à des taux surélevés et agit en tant que cytokine (Donckier et al., 2004). Ceci s'explique par l'infiltration de cellules immunitaires. Elles produisent des cytokines qui stimulent l'expression de la prépro-ET-1 et donc stimulent la production de ET-1 par les cellules thyroïdiennes. ET-1 agirait ensuite comme cytokine proinflammatoire et stimulerait la libération d'une série d'autres cytokines telles que IL-1 (Donckier et al., 2003).

1.7.2.2 Goitre

La formation de goître est caractérisée par une hyperplasie et une hypertrophie des cellules folliculaires, par une augmentation rapide du flux sanguin, par une prolifération endothéliale et enfin par une fusion de capillaires (Colin et al., 1992). Durant la formation du goître, la thyroïde exprime de façon contrôlée des gènes de substances vasoactives impliqués dans les changements vasculaires. Ainsi on peut observer une augmentation d'expression des gènes encodant ET-1, les récepteurs ETA et ETB et trois isoformes de NOS. ET-1 agit de concert avec le NO pour favoriser un développement vasculaire et réguler localement le flux sanguin (Donckier et al., 2004 ; Colin et al., 1995).

1.7.2.3 Carcinome papillaire

On peut démontrer par RTQ-PCR et par immunohistochimie une surexpression de l'axe ET-1/récepteur ET_A, notamment dans le cytoplasme des cellules folliculaires, particulièrement abondantes dans le carcinome papillaire, mais aussi au niveau des cellules endothéliales, dans le colloïde de certains follicules et dans les cellules inflammatoires (surtout dans la thyroïdite d'Hashimoto). ET-1 agirait en tant que facteur de croissance et de prolifération sur le cancer et facteur angiogène sur les vaisseaux entourant la tumeur (Donckier et al., 2003).

1.7.2.4 Carcinome médullaire

On observe une surexpression de l'axe ET-1/récepteur ET_B mais une diminution du récepteur ET_B.

2 Buts du mémoire

Au vu des résultats encourageants obtenus suite au traitement à l'atrasentan de patients atteints de cancer de la prostate, on peut se demander si cet antagoniste pourrait contrer aussi l'effet mitogénique de ET-1 au niveau des cancers thyroïdiens. Si les résultats s'avèrent positifs, l'atrasentan constituerait une nouvelle approche thérapeutique efficace dans le traitement de certaines pathologies thyroïdiennes.

Des tests *in vitro* seront réalisés dans le but d'estimer le rôle autocrine de ET-1 dans les cancers papillaires de la thyroïde. Pour cela, une lignée cellulaire sera étudiée. Il s'agit de cellules de carcinome papillaire (TPC-1).

Avant toute chose, on vérifiera sur ce type cellulaire la présence de l'axe ET, c'est-à-dire la présence de récepteurs ET_A ou ET_B, de l'ECE et de la PPET nécessaires pour la synthèse et la sécrétion d'ET sous forme active.

Dans un second temps, nous examinerons l'effet de ET-1 sur les cellules TPC1. Son rôle dans les cancers en général est d'induire une prolifération cellulaire, de bloquer l'apoptose, et de stimuler une néo-angiogenèse et l'invasion. Dès lors, la prolifération, l'apoptose et la motilité cellulaire seront comparées entre les cellules TPC1 traitées ou non à l'atrasentan, antagoniste du récepteur ET_A.

Au cours de ces expériences, nous rechercherons l'implication de ET-1 dans la voie de signalisation médiée par Akt phosphorylé dont on sait qu'elle intervient dans les propriétés cancéreuses conduisant à la survie, la prolifération et l'invasion.

Par ailleurs, un des objectifs futurs sera de s'intéresser à l'effet paracrine de ET-1 sur son stroma environnant. A cette fin, nous étudierons en culture les cellules 3T3, fibroblastes embryonnaires de souris immortalisés. Nous y déterminerons la présence des éléments de l'axe ET. L'influence du milieu de culture des cellules TPC1 sur la prolifération des 3T3 sera finalement observée dans le cadre de ce mémoire.

3 Matériel et méthodes

3.1 Culture cellulaire.

3.1.1 Cellules

Deux types cellulaires sont étudiés dans le cadre de ce mémoire : les cellules TPC1 qui sont des cellules de carcinome papillaire thyroïdien et les cellules 3T3 qui sont des fibroblastes de souris immortalisés.

3.1.2 Repiquage des cellules

Ces trois types cellulaires sont cultivés dans du milieu DMEM (Cambrex) auquel on ajoute 10% de fœtal bovine serum (FBS, Cambrex) et 15mM Hepes (Gibco). Les cellules sont repiquées quand elles atteignent 70 à 80% de confluence.

3.1.2.1 Matériel

- Trypsine-EDTA : solution stérile (Gibco)
- Boîtes de culture (Cell Star[®] Greiner Bio-one)
- Trypan bleu stained 0,4% (Gibco)
- PBS (phosphate buffer saline)
- Hepes 1M (Gibco)
- Le DMEM est conservé à 4°C. Le FBS et la trypsine sont stockés à -20°C. Le milieu de culture est chauffé à 37°C avant utilisation.

3.1.2.2 Méthode

- Ensemencer les cellules dans des boîtes de culture 25cm².
- Aspirer le milieu et rincer 2 fois avec du PBS.
- Détacher les cellules par ajout de PBS-Trypsine-EDTA en incubant 5 minutes à 37°C.
- Arrêter l'action de la trypsine par dilution avec du milieu de culture.
- Centrifuger pendant 8 minutes à 1200 rpm à température ambiante.
- Resuspendre le culot cellulaire dans quelques ml de milieu.
- Compter les cellules à l'aide d'une cellule de Bürker.
- Repiquer les cellules dans les boîtes. Incuber à 37°C avec 5% de CO₂.

3.2 Extraction et quantification d'ARN

3.2.1 Principe

Il s'agit d'extraire l'ARN des cellules utilisées en suivant le mode d'emploi du kit. Cet ARN sera quantifié puis pourra être utilisé en vue de réaliser une RT-PCR.

3.2.2 Matériel

- Kit QIA schredder
- RNeasy mini kit de Qiagen

- Boîte de cellules en culture
- Racloir
- Spectrophotomètre (Pharmacia Gene Quant) pour le dosage de la quantité d'ARN
- Les solutions et le matériel utilisés doivent être RF (RNase-free)

3.2.3 Méthode

Suivre le protocole du kit Qiagen pour obtenir au final un éluat d'ARN.

3.2.4 Quantification d'ARN

- Diluer de façon adéquate chaque éluat dans un volume total de 100µl.
- Lire l'absorbance à 260 et 280 nm au spectrophotomètre pour déterminer la concentration des acides nucléiques.
- Formule utilisée pour convertir la valeur d'absorbance en concentration :
Pour 100µl, une absorbance de 1,000 correspond à 4µg d'ARN.

3.3 Synthèse d'ADNc à partir d'ARN et PCR

3.3.1 Principe

A partir de nos éluats d'ARN, une étape de transcription inverse en ADNc (ADN complémentaire) est nécessaire pour pouvoir amplifier notre fragment d'ADN d'intérêt par PCR. La technique PCR n'est pas quantitative, elle permet seulement de déceler la présence de l'ARNm d'intérêt dans nos échantillons.

3.3.1.1 Transcription inverse

L'ARN est d'abord chauffé à une température qui permet de le dérouler. Une amorce nucléotidique (Random Hexamer) d'une dizaine de paires de bases, les 4 types de nucléotides et une enzyme (reverse transcriptase) sont ajoutés pour synthétiser le brin d'ADN complémentaire à l'ARN.

3.3.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR permet d'amplifier de façon exponentielle un gène d'intérêt au moyen d'amorces qui s'hybrident sur l'ADNc, de part et d'autre de ce gène. Une amorce se fixe sur le brin sens tandis qu'une autre amorce se fixe sur le brin antisens. Ces amorces sont allongées de par leur extrémité 3'-OH grâce à une enzyme ADN polymérase (Taq biotools) qui ajoute des nucléotides au fur et à mesure. Des étapes de dénaturation d'ADN, de fixation d'amorces et d'élongation se succèdent et se répètent un grand nombre de fois pour obtenir une multitude de copies du gène.

3.3.2 Matériel et méthode

3.3.2.1 Transcription inverse

- Mettre 2µg d'ARN dans un tube PCR.
- Dérouler l'ARN 10 min à 70°C puis le déposer sur glace.

- Préparer pendant ce temps le mélange à ajouter à l'ARN pour un total de 20µl :
 - o 4µl Tampon M-MLV Reverse Transcriptase (5× concentré)
 - o 1µl dNTP 10mM
 - o 2µl DTT 0,1M
 - o 1µl Random Hexamer
 - o xµl H₂O pour arriver à un total de 20µl
 - o 1µl enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen)
- Centrifuger 1 min à 13000 rpm et laisser 5 min à température ambiante.
- Mettre 1h à 42°C puis 5 min à 95°C puis à froid.
- Centrifuger 1 min à 13000 rpm et porter le volume à 100µl par tube avec de l'eau RF.
- Mettre les tubes sur glace si on réalise la PCR le jour même, sinon conserver à -20°C.

3.3.2.2 PCR

Composition d'un tube de 20µl :

- 2µl Tampon 10× concentré
- 0,5 µl dNTP 10mM
- 1µl oligo sens 10µM
- 1µl oligo antisens 10µM
- 10µl d'ADNc
- 5µl H₂O RF
- 0,5µl Taq biotools

La machine PCR est ensuite programmée pour enchaîner environ 30 fois 3 étapes successives, cela après avoir porté l'échantillon à 94°C durant 5 min afin de dénaturer l'ADN double brin :

- Dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 30 sec.
- Hybridation des amorces. La température d'hybridation des amorces est calculée par la formule : $T_m(^{\circ}\text{C}) = (\text{nombre de A et T}) \times 2^{\circ}\text{C} + (\text{nombre de G et C}) \times 4^{\circ}\text{C}$. Pour la machine PCR, il faut déduire 4°C de la température d'hybridation la plus basse entre l'oligo sens et antisens. Les amorces utilisées sont reprises dans le **Tableau 3.1**
- Elongation à 72°C
- Les cycles sont terminés par une élongation finale de 7 min à 72°C.

3.4 Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

3.4.1 Principe

Cette technique permet de séparer les fragments d'ADN amplifiés par PCR par migration dans un gel d'agarose soumis à un champ électrique. L'ADN, chargé négativement, est attiré vers la borne positive du système. Cette séparation se fait selon la taille des fragments, les plus lourds migrant moins loin. Le gel contient du bromure d'éthidium qui est un agent s'intercalant entre les bases d'ADN. Cet agent émet de la fluorescence lors de son exposition aux UV (ultraviolets), ce qui permet de déceler la présence des bandes d'ADN.

3.4.2 Matériel

- Gel d'agarose 1%
- Cuve d'électrophorèse

- Tampon TAE (Tris-acetate EDTA : Tris 40mM pH 7,2 ; Acetate de sodium 20mM ; EDTA 1mM)
- Bromure d'éthidium 10mg/ml et 1mg/ml conservés à 4°C et à l'abri de la lumière
- Solution alourdissante
- Marqueur de poids moléculaire : NEB (2-log Ladder, New England biolabs) ou Smart Ladder (Eurogentec).

3.4.3 Méthode

- Dissoudre, en chauffant, 1g d'agarose dans 100ml de TAE.
- Ajouter 10µl de bromure d'éthidium 1mg/ml.
- Couler le gel chaud mais pas bouillant dans un moule en plexiglass.
- Insérer un ou deux peignes puis laisser refroidir $\frac{3}{4}$ h.
- Démouler le gel et le déposer dans une cuve contenant 800ml TAE + 8µl de bromure d'éthidium 10mg/ml.
- Déposer dans un puits 10µl d'un marqueur de poids moléculaire. Déposer dans les autres puits 10µl d'échantillon alourdis par 1/10 de solution alourdissante.
- Faire migrer le gel à 90V, 400mA pendant environ 1h.
- Visualiser les bandes sur un transilluminateur UV 302nm puis photographier le gel.

3.5 Test de prolifération au BrdU (Elisa)

3.5.1 Principe

Cette méthode, qui consiste en un test Elisa, permet de mettre en évidence un processus de synthèse d'ADN. On donne à la cellule la possibilité d'incorporer un précurseur nucléotidique lors de la phase de synthèse d'ADN. Le nucléotide utilisé est le BrdU (5-Bromo-2'-déoxyuridine). Cette molécule est ensuite reconnue par un AC anti-BrdU couplé à une peroxydase.

3.5.2 Matériel

- Kit 'cell proliferation Elisa, BrdU', Roche Applied Science.
- Cellules TPC1 et 3T3 cultivées sur plaques 96 puits.

3.5.3 Méthode

- Cultiver les cellules durant 24h sur plaque 96 puits à 37°C
- Traiter ou non les cellules par différentes concentrations en atrasentan pendant 24h.
- Rincer 3 fois les puits avec du milieu frais et ajouter le BrdU aux cellules pendant 2h à 37°C. La suite des manipulations se fait à température ambiante.
- Aspirer le contenu des puits et ajouter directement du Fix-Denat pendant 30 min. Il s'agit d'un fixateur et dénaturant cellulaire. Le Fix-Denat est enlevé.
- L'AC anti-BrdU couplé à la HRP est incubé sur les cellules pendant 1h30.
- Laver 3 fois avant d'ajouter une solution contenant le substrat de la HRP (TMB : tétraméthyl-benzidine). Placer la plaque sur un agitateur et attendre 5 à 30 min pour que la coloration bleue soit suffisante et uniforme.
- Ajouter H₂SO₄ 1M pour stopper la réaction. Une coloration jaune apparaît.
- Mesurer l'absorbance à 450 nm par un lecteur Elisa endéans les 5 min.

3.6 Test de motilité

3.6.1 Principe

Le test de motilité consiste à déterminer si les TPC1 sont capables de se déplacer afin de recoloniser un espace créé par une blessure. Ces cellules ont subi auparavant un traitement à la mitomycine, agent anti-prolifératif, pour ne pas attribuer l'effet de motilité à des cellules qui proliféreraient. Il aura fallu déterminer la concentration en mitomycine qui diminue la prolifération de ces cellules de plus de 50%.

3.6.2 Matériel

- Boîtes rondes Nunc 8,8 cm²
- Mitomycine C (*Streptomyces caespitosus*), Sigma
- Lame de rasoir
- PAF (paraformaldéhyde) 3% (Sigma)
- Cristal violet 0,05%

3.6.3 Méthode

3.6.3.1 Détermination de la concentration nécessaire en mitomycine

- Ensemencer les TPC1 dans des plaques 96 puits à raison de 750 cellules par puits.
- Après 24h, traiter les cellules par une gamme de concentration en mitomycine (0 à 100µM) pendant 2h. Remettre du milieu overnight.
- Réaliser un test de détection de prolifération au BrdU via le kit Elisa (voir 3.5 test de prolifération au BrdU).
- Déterminer la concentration en mitomycine diminuant la prolifération de 80%.

3.6.3.2 Test de motilité

- Ensemencer les TPC1 à raison de 175000 cellules par puits (boîte 8,8 cm²).
- Laisser les cellules arriver à 95% de confluence dans l'incubateur (37°C).
- Traiter les cellules à la mitomycine pendant 2h dans l'incubateur.
- Passer une lame de rasoir à l'éthanol et racler la moitié de la surface de la boîte. Rincer 3 fois avec du milieu.
- Remettre du milieu et incuber pendant différents temps à 37°C.
- Jeter le milieu, rincer 3 fois avec du PBS et déposer quelques ml de PAF sur les cellules afin de les fixer. Placer 20 minutes en chambre froide.
- Rincer 3 fois avec du PBS et couvrir de cristal violet pendant 1h au moins à température ambiante.
- Rincer avec du PBS et observer les boîtes au microscope.

3.7 Western Blot

3.7.1 Principe

Cette technique permet de détecter la présence d'une protéine d'intérêt au sein de la cellule. Les protéines de la cellule sont récupérées suite à la lyse cellulaire réalisée par un tampon de lyse. Les protéines chargées négativement par le SDS (sodium dodecylsulfate) migrent par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide où elles se séparent selon leur PM (poids moléculaire). Les protéines sont ensuite transférées du gel vers une membrane préalablement rendue perméable. Les protéines des membranes sont colorées au rouge ponceau. Après rinçage, il faut bloquer les sites de liaison aspécifique de l'AC (anticorps) avec une solution de blocage (kit). La recherche de la protéine d'intérêt s'effectue en incubant la membrane avec un AC primaire, lui-même reconnu par un AC secondaire couplé à une HRP (peroxydase de Raifort). La protéine est localisée par ajout de H₂O₂ et de luminol qui, par réaction enzymatique avec la HRP, marquent un film photographique mis en contact avec la membrane.

3.7.2 Matériel

- Kit Amersham Biosciences blotting detection kit.
- Système de migration
- Solution d'acrylamide (Biorad)
- Temed (Biorad)
- Pour l'obtention de deux gels d'acrylamide 12%: couler un premier gel de separation surmonté d'un gel d'empilement, réaliser une solution alourdissante, un tampon de migration et un tampon de transfert (**Tableau 3.2.**)
- Marqueur de taille (ProSieve®, Color protein markers, Cambrex)
- Membranes Polyscreen® PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) (1 par gel)
- Feuilles Whatman 3MM de dimensions: 10 cm sur 6,5 cm (4 par gel)
- Rouge Ponceau (Sigma, 0,1% dans 5% acide acétique).
- Solution de blocage : poudre 2%(Amersham) dans PBS Tween 0,1%.
- Kit de chemiluminescence (Amersham) contenant de l'eau oxygénée et du luminol.
- Les échantillons sont constitués d'extraits protéiques de cellules TPC1 traitées ou non à l'atrasentan. Les cellules ont été lysées au moyen d'un milieu de lyse contenant du tampon de lyse (RIPA) 2× concentré, des inhibiteurs de phosphatases et des inhibiteurs de protéases (Roche, 1 pastille pour 50ml de milieu de lyse).(**Tableau 3.3.**)

3.7.3 Méthode

3.7.3.1 Préparation des échantillons

- Cultiver les cellules dans des boîtes rondes 9,6 cm². Après 24h traiter ou non les cellules à l'atrasentan. Incuber 24h à 37°C.
- Déposer les boîtes sur glace et laver avec du PBS froid.
- Reprendre les cellules dans un peu de PBS et des inhibiteurs de phosphatases, en grattant les boîtes.
- Centrifuger 20 min à 1200 rpm pour obtenir un culot cellulaire.
- Enlever le surnageant et resuspendre les cellules dans 100µl de milieu de lyse.

3.7.3.2 Dépôt des échantillons sur gel de polyacrylamide et migration

- Ajouter à chaque échantillon un volume de solution alourdissante contenant du β -mercaptoéthanol 1%.
- Bouillir les échantillons 3 min au bain-marie puis centrifuger 1 min à 13000 rpm.
- Déposer les échantillons dans les puits sans oublier d'ajouter en parallèle un marqueur de poids moléculaire.
- Placer les gels dans une cuve contenant le tampon de migration.
- Faire migrer à 80 volts jusqu'à ce que le bleu des échantillons soit sorti du gel.

3.7.3.3 Transfert des protéines sur une membrane PVDF

- Placer les membranes 1 min dans du méthanol 100% puis imprégner de solution de transfert ces membranes ainsi que les papiers Whatman pendant 10 min.
- Arrêter la migration des protéines, récupérer les gels et réaliser le montage suivant dans une cuve de transfert : une éponge imbibée de solution de transfert surmontée de 2 papiers 3MM, la membrane, le gel, 2 papiers 3MM et une éponge.
- Réaliser le transfert en soumettant le montage à un champ électrique de 8 volts et 250 mA durant 2h30.

3.7.3.4 Coloration au rouge ponceau

Ce colorant marque de façon réversible l'ensemble des protéines présentes sur la membrane et permet ainsi de comparer les quantités de protéines déposées dans chaque puits.

- Après transfert, récupérer la membrane et la plonger dans le rouge ponceau. Mettre sur l'agitateur pendant 10 min.
- Rincer la membrane à l'eau bidistillée et la scanner.

3.7.3.5 Saturation des sites de liaison non spécifiques des protéines

- Bloquer les sites non spécifiques en incubant la membrane dans la solution de blocage du kit. Laisser sur agitateur pendant une nuit en chambre froide.

3.7.3.6 Ajout des AC primaire et secondaire

- Laver la membrane 2 fois 5 min dans du PBS-Tween 0,1% sur agitateur.
- Diluer l'AC dans la solution de blocage et le mettre en contact de la membrane 1h sur agitateur. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air entre la membrane et la solution.
- Effectuer plusieurs lavages dans du PBS-Tween 0,1% : un rinçage rapide, un lavage de 15 min puis 4 lavages de 5 min.
- Ajouter l'AC secondaire dilué dans la solution de blocage.
- Incuber 45 min à température ambiante sur agitateur.
- Laver au PBS-Tween 0,1% 1 fois 15 min puis 4 fois 5 min.

3.7.3.7 Révélation en chambre noire

- Mélanger une quantité égale des deux réactifs (Kit chemiluminescence Amersham) et placer 5 min au contact de la membrane.
- Mettre la membrane dans une cassette et déposer dessus un film (Kodak) le temps nécessaire. Développer le film.

3.8 Immunofluorescence

3.8.1 Principe

Cette méthode consiste à détecter et localiser un composant cellulaire par émission de fluorescence. Dans notre cas il s'agit de montrer la présence d'une protéine, la caspase 3, active sous forme de dimère dans les processus apoptotiques. La protéine est reconnue spécifiquement par un AC primaire, lui-même reconnu par un AC secondaire couplé à un marqueur. Le marqueur peut être un fluorochrome, qui, lorsqu'il est excité à une certaine longueur d'onde, émet de la fluorescence à une longueur d'onde supérieure. L'analyse des images se fait par un microscope confocal.

3.8.2 Matériel

- Un agent inducteur d'apoptose
- L'AC primaire utilisé est un AC de lapin anti-caspase 3 active humaine (Promega, dilution 1/100).
- L'AC secondaire est un anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome Alexa 488 (Molecular Probes, dilution 1/500).

3.8.3 Méthode

- Ensemencer les cellules dans des plaques 24 puits (Nunc), à raison de 50000 cellules par puits. Déposer au fond de chaque puits une lamelle en verre stérile.
- Après 24h, traiter ou non les cellules par différentes concentrations en agent pro-apoptotique. Laisser agir une nuit.
- Aspirer les milieux et fixer les cellules 10 min par du PBS + 4% de PAF.
- Perméabiliser 5 min dans du PBS + 1% triton X100.
- Rincer 2 fois 5 min dans du PBS puis mettre 30 min en présence de PBS + 3% BSA (Sigma).
- Ajouter l'AC primaire (dilution 1/100 dans PBS + 3% BSA) overnight à 4°C en chambre humide (en retournant la lamelle sur la goutte d'AC déposée sur un parafilm).
- Le lendemain, laver les cellules 3 fois 10 min dans du PBS + 3% BSA puis ajouter l'AC secondaire (dilution 1/500 dans PBS + 3% BSA) pendant 1h en chambre humide à température ambiante (en retournant la lamelle sur la goutte d'AC). Laver 3 fois au PBS.
- Afin de visualiser les noyaux, incuber les cellules 35 min à température ambiante en présence de TO-PRO-3 (Molecular Probes, dilution 1/80 dans du PBS + RNase 2 mg/ml) puis rincer 3 fois au PBS.
- Déposer une goutte de Mowiol (Aldrich) préchauffé sur une lame porte-objet et retourner les lamelles pour les fixer dessus.
- Laisser solidifier une nuit à 4°C les lames à plat.
- Observer au microscope confocal.

3.9 Test d'exclusion au trypan bleu

3.9.1 Principe

Ce test permet d'estimer la survie cellulaire en colorant en bleu les cellules dont la membrane plasmique est altérée. Le trypan bleu ne permet pas de distinguer les cellules en apoptose des cellules mortes par nécrose car il rentre dans ces cellules pour les colorer de bleu.

3.9.2 Matériel

- Trypan bleu (Gibco)
- Doxorubicine (Roche)

3.9.3 Méthode

- Cultiver les cellules dans des plaques 24 puits pendant 24h (50000 cellules/puits).
- Traiter par différentes concentrations en doxorubicine.
- Récolter les cellules par trypsinisation (200 µl trypsine pendant 10 min à 37°C) en prenant soin de récupérer les cellules détachées qui se trouvent dans le milieu de culture. Pour cela, centrifuger le milieu des cellules 5 min à 2000 rpm. Resuspendre le culot avec la suspension de cellules.
- Ajouter 100µl de milieu DMEM + 40% FBS afin d'arrêter l'action de la trypsine.
- Vérifier au microscope qu'il n'y ait plus de cellules dans les puits.
- Chaque échantillon est dilué dans du trypan bleu : 80µl de cellules + 20µl de trypan bleu. Attendre 5 à 15 min avant de réaliser le comptage cellulaire à l'aide d'une cellule de Bürker. Compter les cellules colorées et non colorées au microscope.

3.10 Echelle d'ADN

3.10.1 Principe

Les cellules qui meurent par apoptose présentent des caractéristiques particulières telles que la fragmentation de l'ADN en multiples de 180 pb. En effet, une DNase spécifique est ainsi activée (CAD pour caspase activated DNase) lors de l'apoptose et clive l'ADN entre les nucléosomes. La migration de ces fragments sur gel d'agarose révèle un profil en « échelle d'ADN ». A l'inverse, les cellules qui meurent par nécrose ont leur ADN dégradé en fragments de tailles diverses et leur migration sur gel ne les fait pas apparaître.

3.10.2 Matériel

- Tampon de lyse (voir composition **Tableau 3.4.**).
- Phénol : Chloroforme : Isoamylalcool 24 : 25 : 1 saturé avec 10mM Tris pH8 ; 1mM EDTA (Sigma).
- Chloroforme, isopropanol.
- TE (Tris-EDTA) pH8, 2µl Rnase A (40mg/ml)
- Gel d'agarose 1,5% ; tampon TBE (Tris-Borate EDTA)

3.10.3 Méthode

- Ensemencer les TPC1 dans des boîtes rondes 56,7 cm² (Nunc) : 500000 cellules/boîte.
- 24h plus tard, traiter les cellules par un agent inducteur d'apoptose et incuber overnight.
- Le lendemain, récupérer le milieu de culture de chaque boîte dans des falcons et centrifuger 10 min à 800 rpm, pour récupérer les cellules détachées et les corps apoptotiques. Dans un même temps, reprendre les cellules à l'aide d'un racloir dans du PBS froid et les transvaser dans des nouveaux tubes. Centrifuger 10 min à 800 rpm afin d'obtenir un culot cellulaire.
- Enlever tous les surnageants et mettre 1ml de tampon de lyse sur les cellules récoltées à partir du milieu de culture centrifugé. Resuspendre les culots et les transférer dans les culots cellulaires correspondants. Bien homogénéiser avec une pipette.
- Incuber 4h à 56°C.
- Ajouter 1ml de la solution phénol : chloroforme : isoamylalcool. Bien mélanger.
- Centrifuger quelques secondes à 1000 rpm puis reprendre la phase aqueuse en y ajoutant 1 volume de chloroforme. Centrifuger de nouveau à 1000 rpm.
- Reprendre la phase aqueuse dans un eppendorf et y ajouter de l'isopropanol (0,7 vol.). Laisser agir une nuit à -20°C.
- Centrifuger les eppendorfs 20 min à 13000 rpm à 4°C.
- Décanter puis ajouter 800µl d'éthanol 70%. Centrifuger 4 min à 13000 rpm.
- Décanter, sécher au speedvac 3 min, resuspendre dans 100µl de TE + 2µl Rnase A (40 mg/ml). Laisser 2h dans un bain à 37°C.
- Faire migrer sur un gel d'agarose 1,5% en déposant environ 15µl d'ADN par puits en ayant ajouté aux échantillons une solution alourdissante. Ajouter un marqueur de poids moléculaire.

4 Résultats

Introduction

Les expériences réalisées au cours de ce mémoire se focalisent sur les effets que pourrait avoir l'atrasentan, un antagoniste sélectif des récepteurs ET_A de l'endothéline, sur les cellules cancéreuses thyroïdiennes humaines TPC1. Ceci permet d'étudier l'effet autocrine de la forme principale de l'endothéline, ET-1. Trois types d'expériences sont prévus dans le but de rechercher les effets de l'atrasentan sur la prolifération, sur la motilité et sur l'apoptose des TPC1.

L'atrasentan, reçu de la firme Abbott sous forme lyophilisée, a été solubilisé à une concentration de 50mM dans de l'éthanol. Une dilution primaire (1/100) dans du PBS a ensuite été effectuée afin d'obtenir des aliquots d'atrasentan à 500µM. Lors des expériences, l'atrasentan 500 µM est dilué de façon adéquate dans du milieu de culture. En partant du fait qu'un pourcentage en éthanol de 0,1% possède un effet négligeable sur les cellules, les expériences utilisant l'atrasentan à une concentration inférieure à 50 µM (0,1 % éthanol) ne nécessiteront pas de contrôle contenant de l'éthanol. Par contre toute concentration supérieure ou égale à 50 µM, un contrôle éthanol adéquat sera ajouté.

Quant au choix de la gamme de concentrations en atrasentan à utiliser, nous nous sommes basés sur des modèles de culture cellulaire in vitro (Fizazi et al., 2003 ; Rosano et al., 2003).

Afin de travailler dans des conditions optimales de synthèse de l'ET-1 par les cellules TPC1, nous avons pris la décision de cultiver et de manipuler les cellules dans du milieu de culture avec sérum (DMEM + 10% FBS), tout en sachant que ces mêmes expériences réalisées dans du milieu sans sérum pourraient donner des résultats différents.

4.1 RT-PCR

4.1.1 But de l'expérience

Afin de démontrer une action potentielle de l'atrasentan sur les voies de signalisation initiées par ET-1 via son récepteur ET_A, il faut avant tout vérifier la présence de l'axe ET dans les cellules TPC1. Il s'agit, après extraction de l'ARN des cellules et retranscription en ADNc, de montrer la présence des récepteurs ET_A et ET_B, de la pré-pro-endothéline (PPET) et de l'enzyme de conversion (ECE).

Etant donné que des co-cultures seront envisagées entre les cellules TPC1 et les cellules fibroblastiques murines 3T3, dans le but d'analyser un effet paracrine de ET, il faut également vérifier la présence de l'axe ET dans ce dernier type cellulaire.

4.1.2 Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc

Les cellules ont été récoltées à partir de boîtes de culture de 25 cm² dans lesquelles se trouvent environ 1,5 millions de cellules. Par le kit d'extraction de Qiagen, nous avons obtenu un éluat d'ARN contenant 0,72 et 0,50 µg d'ARN/µl pour les TPC1 et les 3T3 respectivement. Pour la transcription inverse en ADNc, 2 µg d'ARN ont été utilisés.

4.1.3 Détection des ARNm des récepteurs ET_A et ET_B, de PPET et ECE

Une RT-PCR a été réalisée sur les ADNc des deux types cellulaires en utilisant les amorces correspondant aux gènes à amplifier. La GAPDH, enzyme ubiquiste, a également été amplifiée pour s'assurer de la présence et de la qualité de l'ADNc préparé. Le contrôle négatif est quant à lui réalisé en remplaçant l'ADNc par de l'eau. Il permet de détecter une éventuelle contamination extérieure.

On peut observer que les cellules TPC1 et 3T3 expriment l'ARNm du récepteur ET_A, de la PPET et de l'ECE. En revanche, le récepteur ET_B n'est pas détectable bien que différentes conditions de PCR aient été réalisées (**Figure 4.1.**). Les bandes obtenues correspondent aux tailles attendues.

L'absence du récepteur ET_B dans ces cellules n'est pas attribuée à un mauvais choix d'amorces. En effet, des PCR réalisées auparavant avec les amorces utilisées pour les TPC1 avaient révélé la présence du récepteur ET_B dans les cellules FTC133 issues de cancer folliculaire thyroïdien humain. De même que les amorces utilisées pour les 3T3 ont révélé la présence de ce récepteur dans les MEF, qui sont des fibroblastes embryonnaires de souris (**Figure 4.1.**).

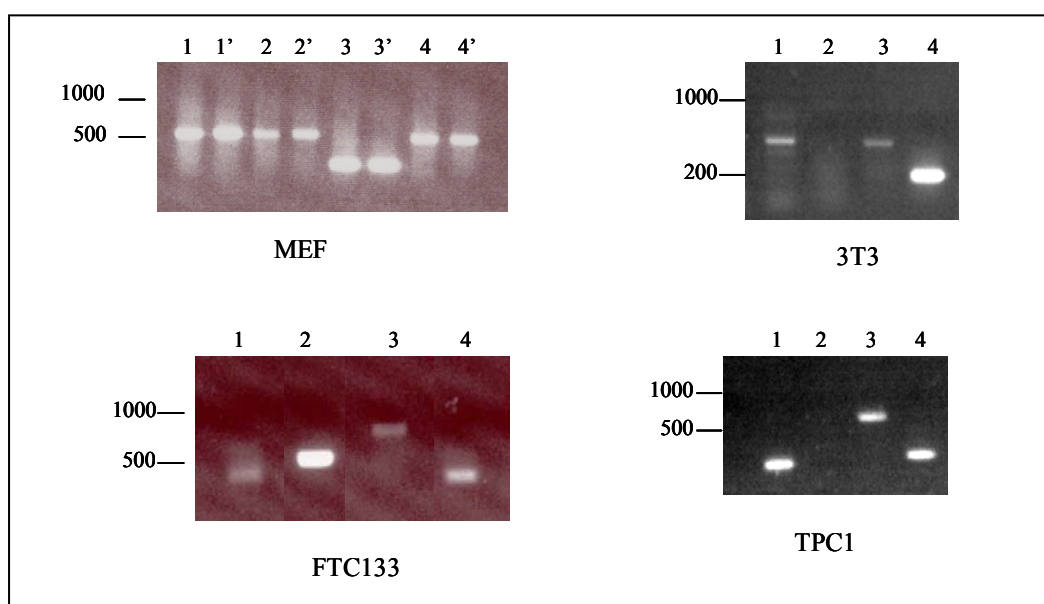


Figure 4.1. RT-PCR de l'axe ET dans différents types cellulaires. 1= récepteur ET_A ; 2= récepteur ET_B ; 3= pré-pro-ET ; 4= enzyme de conversion ECE ; les ' sont des duplicats.

On peut donc conclure que les MEF et les FTC133 expriment l'entièreté de l'axe ET tandis que les 3T3 et les TPC1 n'expriment pas le récepteur ET_B. Le fait que ce récepteur soit absent des cellules TPC1 facilite les conclusions que l'on peut tirer de nos expériences. En effet, bien que ce soit le récepteur ET_A qui joue un rôle prépondérant dans les cancers, on ne peut négliger, dans certains cancers, l'influence du récepteur ET_B.

Toutefois la RT-PCR ne fait que révéler la présence des ARNm. Cette technique n'est pas suffisante pour affirmer que ET1 se fixe sur son récepteur. Dans une expérience réalisée lors d'un mémoire précédent (Wittemans, 2004), la présence du récepteur ET_A avait été confirmée par Western Blot au moyen d'un anticorps polyclonal commercial. On peut donc conclure que les éléments du système ET sont présents et nous font penser que ET-1 pourrait être sécrétée sous forme active par l'intermédiaire de l'ECE et qu'elle pourrait potentiellement se fixer sur ses récepteurs (ET_A dans les TPC1 et les 3T3, ET_A et ET_B dans les MEF et les FTC133) pour induire un effet. La présence de l'axe ET étant confirmée dans les 3T3 et les TPC1, des expériences de co-culture pourront être envisagées ultérieurement entre ces types cellulaires.

4.2 Test de prolifération au BrdU (Elisa)

4.2.1 But de l'expérience

L'endothéline possède un pouvoir mitogénique sur de nombreux types cellulaires. La surexpression de l'axe ET dans le cancer papillaire thyroïdien qui a été découverte par le professeur Donckier et ses collaborateurs (2003) permet de penser que ET-1 pourrait y agir comme facteur mitogénique endogène. Bien qu'un effet prolifératif de ET-1 exogène sur les TPC1 n'ait pas pu être démontré (Wittemans, 2004), nous nous sommes intéressés à l'effet de l'atrasentan sur la prolifération des cellules TPC1.

Des tests de prolifération ont également été réalisés sur les cellules 3T3 en présence d'atrasentan ou en présence du milieu de culture des TPC1. Les cellules TPC1 et les 3T3 sont toutes deux capables de sécréter de l'ET.

4.2.2 Réalisation pratique

Le test Elisa utilisé permet une mesure quantitative de la prolifération cellulaire. Il se base sur l'incorporation d'un précurseur nucléotidique (le BrdU) par des cellules en cours de prolifération qui synthétisent de l'ADN.

Dans notre cas, les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à raison de 1250 cellules/puits pour les TPC1 et 1000 cellules/puits pour les 3T3. Le choix du nombre de cellules à ensemenecer et le temps d'exposition au BrdU ont été déterminés lors d'expériences préliminaires afin de se trouver dans un cadre de lecture du signal optimal. Après 24h, les cellules TPC1 et 3T3 sont mises en présence de concentrations croissantes en atrasentan : 0 (le contrôle), 1, 10 et 100 µM, et cela durant 24h. Un contrôle supplémentaire contenant 0.2 % d'éthanol est ajouté et sert de référence pour le test à l'atrasentan 100 µM. Quatre réplicats sont prévus pour chacune des conditions afin de diminuer la variabilité. Sept expériences sont réalisées sur les TPC1 et cinq sur les 3T3.

Pour les 3T3 une condition supplémentaire est ajoutée : il s'agit de traiter ces cellules par du milieu de culture fraîchement prélevé des boîtes de culture des cellules TPC1 afin de voir l'effet des composants de ce milieu, contenant entre autres de l'ET, sur la prolifération des 3T3.

4.2.3 Effet de l'atrasentan sur les TPC1

4.2.3.1 Résultats

Afin de faciliter l'analyse statistique des résultats et de pouvoir comparer l'effet des différentes concentrations entre elles, il serait plus facile de comparer chaque concentration en atrasentan par rapport à un contrôle unique. Pour cela il faut s'assurer que l'éthanol 0,2 % résultant de l'ajout d'atrasentan à 100 μ M (concentration finale) n'engendre pas d'effet propre sur la prolifération. Ainsi avons-nous testé l'effet d'un contrôle contenant 0,2 % d'éthanol sur les TPC1 par rapport à un contrôle sans éthanol, cette expérience étant réalisée 4 fois (**Figure 4.2.**). Les valeurs d'absorbance obtenues sont paires pour chaque expérience et analysées par un test t de Student pairé. Ce test ne révèle pas de différence significative entre les contrôles avec ou sans éthanol. Dans la suite des événements, les résultats seront donc comparés au contrôle sans éthanol.

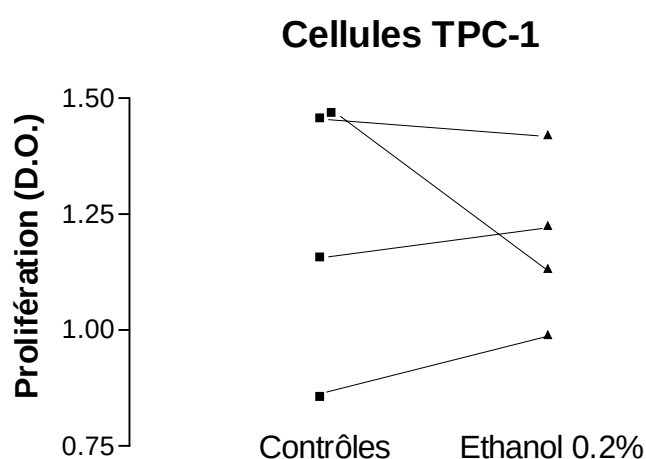


Figure 4.2. Effet de l'éthanol 0,2 % sur la prolifération des TPC1 dans des expériences paires. Les résultats sont donnés en valeur d'absorbance. Le test t de Student pairé ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle.

Concernant l'effet de l'atrasentan sur la prolifération des TPC1, trois concentrations croissantes (de 1 à 100 μ M) ont été testées. Cette prolifération est quantifiée par des valeurs d'absorbance pour chaque condition et comparée au contrôle. Les valeurs d'absorbance obtenues (non montrées) pour chacune des 7 expériences représentent la moyenne de 4 réplicats.

Ces valeurs ont été ensuite converties en pourcentage de prolifération en prenant, dans chaque expérience, la valeur obtenue pour le contrôle comme une prolifération de 100 %. Les histogrammes de la **Figure 4.3** représentent les pourcentages de prolifération pour

chacune des concentrations en atrasentan, ces pourcentages représentant la moyenne $\pm$ ESM obtenue pour 7 expériences.

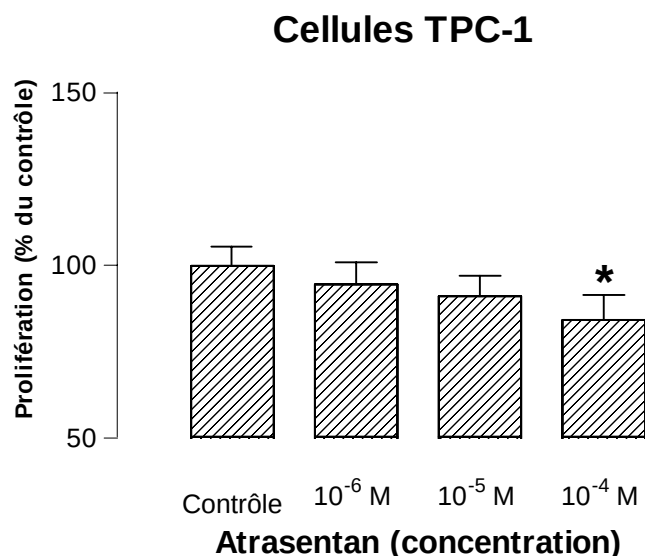


Figure 4.3. Effet de concentrations croissantes en atrasentan sur la prolifération des TPC1 exprimée en % du contrôle. Les moyennes $\pm$ ESM sont représentées graphiquement. La variabilité du contrôle a été calculée sur les valeurs absolues. * = $p < 0,05$ par rapport au contrôle (ANOVA avec mesures répétées suivi du test de Dunnet)

On constate d'emblée que l'atrasentan tend à diminuer la prolifération des TPC1, mais de façon modérée. Cet effet est d'autant plus marqué que la concentration en atrasentan est importante.

Une analyse statistique utilisant l'ANOVA avec mesures répétées montre un effet significatif de l'atrasentan ($P < 0,05$) pour l'ensemble des données. L'analyse s'est poursuivie par un test post-hoc de comparaison multiple par rapport au contrôle (test de Dunnet), lequel révèle que seule la concentration en atrasentan de 100 μ M donne des résultats différant de manière significative du contrôle ($P < 0,05$).

4.2.3.2 Commentaires

Au vu de ces résultats, on peut dire que ET-1 sécrétée de façon endogène, sans stimulant autre que le sérum, est un facteur mitogénique autocrine in vitro sur les cellules TPC1 via le récepteur ET_A . Le blocage spécifique de ce récepteur par l'atrasentan inhibe partiellement l'effet de ET-1.

Dans la littérature, les concentrations en atrasentan utilisées in vitro dépassent rarement 10 μ M. Dès lors, nous n'avons pas testé de gamme de concentrations supérieures à 100 μ M, bien que l'effet obtenu était partiel. In vivo, chez l'homme, la concentration plasmatique tolérée d'atrasentan est d'environ 360 nM (Carducci et al., 2002).

4.2.4 Effet de l'atrasentan sur les 3T3

4.2.4.1 Résultats

Nous avons suivi exactement le même cheminement que pour les TPC1. Les 3T3 ont été soumises aux mêmes concentrations en atrasentan afin de pouvoir comparer l'effet de ET-1 endogène sur les deux types cellulaires pris séparément. Au préalable, un test a été réalisé pour comparer l'effet d'un contrôle contenant de l'éthanol 0,2% sur la prolifération des 3T3 par rapport à un contrôle sans éthanol. Nous avons réalisé 5 fois ce test. Les valeurs d'absorbance sont paires pour chacune des 5 expériences et analysées par un test t de Student (**Figure 4.4.**). Aucune différence significative n'est perçue entre le contrôle sans éthanol et celui qui en contient. Par la suite nous nous référerons uniquement au contrôle sans éthanol.

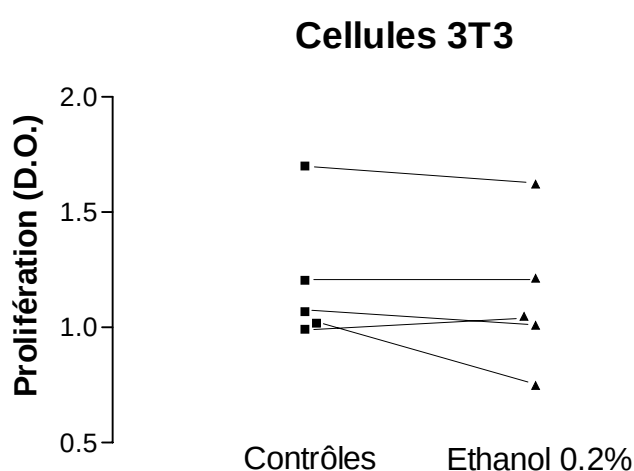


Figure 4.4. Effet de l'éthanol 0,2% sur la prolifération des 3T3 dans des expériences paires. Résultats donnés en valeurs d'absorbance. Le test t de Student pairé ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle.

Ensuite les cellules 3T3 ont été mises en présence de concentrations croissantes en atrasentan. L'expérience a été réalisée 5 fois, chacune en 4 réplicats pour lesquels une moyenne d'absorbance est calculée. Ces valeurs d'absorbance ont été converties en pourcentage de prolifération où le contrôle se voit attribué un pourcentage de 100 %. Les histogrammes de la **Figure 4.5** représentent la moyenne $\pm$ ESM de 5 expériences pour chacune des concentrations utilisées.

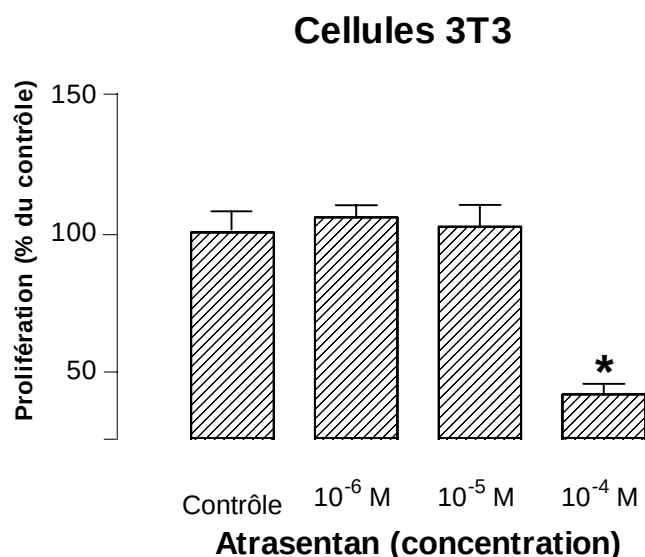


Figure 4.5. Effet de concentrations croissantes en atrasentan sur la prolifération des 3T3 exprimée en % du contrôle. Les moyennes $\pm$ ESM sont représentées graphiquement. La variabilité du contrôle a été calculée sur les valeurs absolues. * = $p < 0,01$ par rapport au contrôle (ANOVA avec mesures répétées suivi du test de Dunnett)

Les histogrammes révèlent un effet biphasique de l'atrasentan c'est-à-dire que pour les concentrations les plus faibles en atrasentan (1 et 10 μ M) la prolifération des 3T3 n'est pas diminuée (elle pourrait même paraître légèrement supérieure au contrôle, mais ces différences ne sont pas significatives), tandis que l'atrasentan à 100 μ M engendre une forte inhibition de prolifération (près de 50 %). L'atrasentan à 100 μ M provoque une diminution de prolifération beaucoup plus importante dans les 3T3 que dans les TPC1.

Les données ont été analysées par ANOVA avec mesures répétées et révèlent une différence hautement significative pour l'ensemble des données ($p < 0,0001$). Puis le test de comparaisons multiples de Dunnett montre que, seuls les résultats de l'atrasentan 100 μ M diffèrent de ceux du contrôle, et cela de manière hautement significative ($p < 0,01$).

4.2.4.2 Commentaires

On peut conclure que ET-1 endogène participe à la prolifération des 3T3 en stimulant une voie dépendant du récepteur ET_A . Il est étonnant de n'observer un effet radical de l'antagoniste ET_A sur la prolifération qu'à partir de 100 μ M. Puisque l'effet de l'atrasentan est médié par un récepteur, on s'attendrait à obtenir une courbe dose-réponse traditionnelle en fonction de la saturation des récepteurs. Or l'effet observé semble plutôt de type tout ou rien. On pourrait donc penser que la concentration d'ET-1 dans le milieu est telle qu'il faille des taux très élevés d'atrasentan pour l'antagoniser partiellement. Cette hypothèse est toutefois impossible à défendre étant donné que le K_i de l'atrasentan est de 34 pM (Opgenorth et al., 1996). Il est à noter que nous n'avons pas testé de concentrations d'atrasentan supérieures à 100 μ M, pour les raisons signalées ci-dessus.

4.2.5 Effet du milieu de culture de cellules TPC1 sur les 3T3

4.2.5.1 Résultats

Les cellules 3T3 ont été cultivées seules pendant 24 h sur plaques 96 puits avant que leur milieu de culture ne soit remplacé par du milieu de culture de cellules TPC1. Dans le but de tester un éventuel effet paracrine de ET-1 produite par les cellules cancéreuses sur les cellules interstitielles, nous avons comparé la prolifération des 3T3 en présence ou en absence (contrôle) du milieu des cellules TPC1. Les valeurs d'absorbance sont obtenues à partir de 5 expériences, chacune réalisée en 4 réplicats. Ces valeurs sont converties en pourcentage de prolifération en prenant le contrôle comme 100 %. Les histogrammes de la **Figure 4.6** représentent la moyenne $\pm$ ESM des 5 expériences.

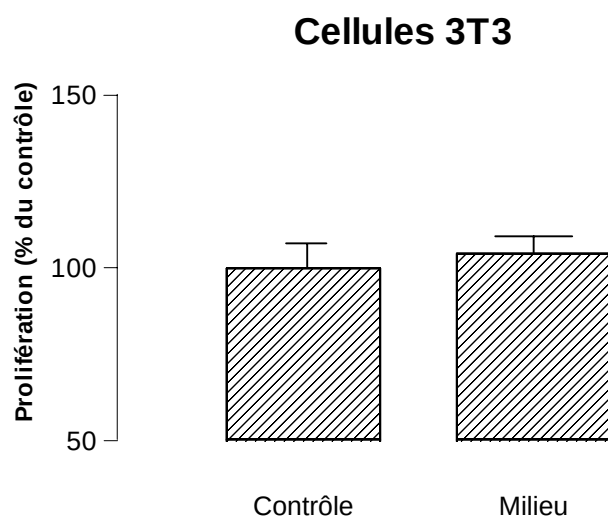


Figure 4.6. Effet du milieu des cellules TPC1 sur la prolifération des 3T3 exprimée en % du contrôle (moyenne $\pm$ ESM). Le test t de Student pairé ne permet pas de rejeter l'hypothèse nulle.

Au premier abord, le milieu des cellules TPC1 ne semble pas conférer un avantage de prolifération aux 3T3.

4.2.5.2 Commentaires

Même si le milieu de culture des TPC1 fraîchement prélevé contient ET-1, celle-ci possède un temps de demi-vie relativement court qui ne lui permet d'engendrer qu'un effet prolifératif momentané (Levin et al., 1996). Ce milieu mis au contact des 3T3 durant 24 h n'a pas été renouvelé au cours de l'incubation. De plus, on ne connaît pas la quantité d'ET-1 mise au contact des 3T3 ; pour cela il faudrait réaliser un dosage de ET-1.

Par ailleurs, l'effet prolifératif de ET-1 observé sur les 3T3 pourrait être sous-estimé. En effet, avant d'ajouter ET-1, il faut aspirer le milieu de culture des 3T3. Or ce milieu contient tous les composants nécessaires à leur croissance. Même si ET-1 possède un effet mitogène, celui-ci s'exerce probablement en synergie avec d'autres facteurs de croissance, dont ceux qui seraient sécrétés par les 3T3.

Dans le cadre de mon mémoire nous nous consacrons à l'étude des cellules cancéreuses par elles-mêmes. Il serait judicieux, dans des expériences ultérieures, d'exploiter des systèmes de co-culture entre les TPC1 et les 3T3 permettant d'examiner leur influence réciproque dans des conditions qui seront de cette manière plus proches de leur environnement naturel.

4.3 Motilité

4.3.1 But de l'expérience

Certaines cellules cancéreuses sont caractérisées par un pouvoir invasif, c'est-à-dire qu'elles acquièrent la capacité de se détacher du centre tumoral pour envahir les tissus avoisinants ou pour métastaser à distance via le sang. Par ailleurs on sait que ET-1 intervient comme facteur majeur dans la motilité et l'invasion de cellules cancéreuses (Rosano et al., 2001). Nous avons cherché à déterminer in vitro si, d'une part, les TPC1 sont capables de se déplacer et si, d'autre part, l'atrasentan peut perturber ce processus en supposant que ET-1 participe à la motilité des cellules TPC1.

4.3.2 Réalisation pratique

Les TPC1 sontensemencées dans des boîtes rondes de 56,7 cm² et mises en culture pour atteindre une confluence de 95%. Elles sont alors traitées durant 2 h par un agent anti-prolifératif, la mitomycine, à une concentration choisie pour réduire la prolifération des cellules de plus de 50 %, ceci afin de ne pas attribuer un effet de motilité à des cellules en prolifération. La concentration optimale en mitomycine (50 µM) a été déterminée auparavant en réalisant un test Elisa de prolifération.

Une blessure est ensuite créée dans la culture cellulaire à l'aide d'une lame de rasoir appliquée au centre de la boîte et en raclant la moitié de la surface de cette boîte. Les cellules sont alors incubées durant 24 h en présence d'atrasentan. Du PAF 3 % est ensuite ajouté 20 min en chambre froide pour fixer les cellules avant leur coloration au cristal violet. Les boîtes sont observées au microscope et 10 champs environ sont analysés par boîte. Deux méthodes ont été utilisées pour calculer le pourcentage de cellules ayant franchi la ligne de coupure. La première consiste à compter directement les cellules en prenant les cellules contrôles comme référence. La seconde utilise un programme informatique qui compare le pourcentage de surface occupée par des cellules de part et d'autre de la ligne de coupure.

4.3.3 Résultats

4.3.3.1 Détermination de la concentration optimale en mitomycine

Un test de prolifération a été réalisé en suivant le protocole du kit Elisa, de la même façon que précédemment. Vingt-quatre heures après les avoirensemencées, les cellules sont traitées durant 2 h par des concentrations en mitomycine de 0, 25, 50 et 100 µM. Après ce temps d'incubation, le milieu de traitement est remplacé par du milieu de culture pendant une nuit avant de procéder au test Elisa lui-même.

Une courbe dose-réponse est établie sur base des valeurs d'absorbance (**Figure 4.7.**). Par convention, on attribue aux cellules contrôles non traitées un pourcentage de prolifération de 100 %. Les cellules traitées présentent une nette diminution de prolifération par rapport aux cellules contrôles et ce d'autant plus que la concentration en mitomycine augmente. A 25 μM l'effet anti-prolifératif est fort marqué mais par sécurité nous avons choisi une concentration de 50 μM pour réaliser les tests de motilité ultérieurs.

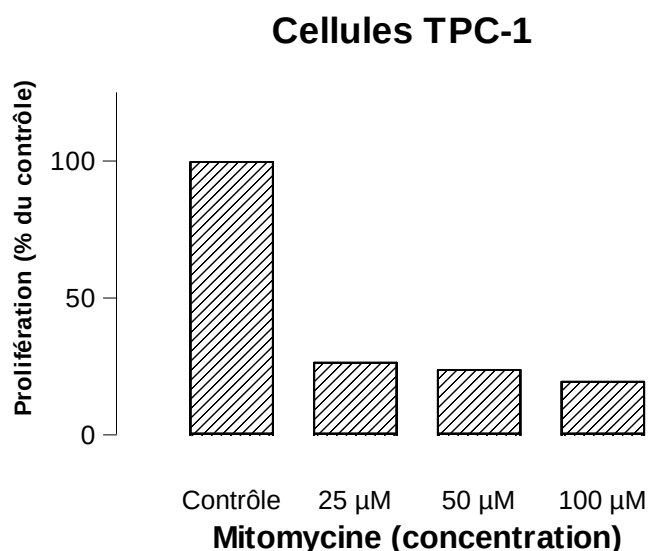


Figure 4.7. Mesure de la prolifération des cellules TPC1 en présence de concentrations croissantes en mitomycine, par rapport au contrôle indiqué comme 100 %.

4.3.3.2 Motilité des cellules TPC1

Les cellules sont observées au microscope, elles apparaissent à l'écran en gris sur fond blanc. Toutefois ce contraste n'est pas toujours bien marqué d'une boîte à l'autre ; de plus, ces cellules ont tendance à se chevaucher et à former des petits amas. Tout cela rend la méthode de comptage direct des cellules trop aléatoire.

Nous nous sommes dès lors tournés vers une autre méthode basée sur un programme informatique pour calculer le pourcentage de cellules franchissant la ligne de coupure. Pour chaque boîte, un seuil de détection de gris du cytoplasme cellulaire par rapport au fond de la boîte est fixé (en tenant compte d'une marge d'erreur de 1 %). Tout pixel plus sombre sera compté par le programme comme appartenant à une cellule. Ensuite une région d'intérêt est sélectionnée en amont de la ligne de coupure ; cette surface est suffisamment grande pour être représentative de la population cellulaire, qui peut légèrement varier d'une expérience à l'autre. La même surface sera reportée en aval de la ligne de coupure pour calculer le pourcentage de cellules ayant franchi la ligne, pourcentage qui traduit la motilité des cellules. Un exemple est montré à la **Figure 4.8.**

L'observation des cellules TPC1 au microscope montre qu'elles possèdent une motilité basale modérée par rapport à d'autres types cellulaires cancéreux qui ont été observés au

laboratoire. En moyenne, 30 % des cellules ont franchi la ligne de coupure en 24 h. Toutefois, ce déplacement n'est pas homogène : les cellules TPC1 ont tendance à se déplacer par vagues en petits groupes, voire en amas.

A la fin des expériences, nous n'avons pas observé de différence de motilité apparente entre les diverses conditions opérées (contrôle, atrasentan 10 et 100 μ M, éthanol 0,2 % ; test statistique ANOVA avec mesures répétées) (**Figure 4.9**).

4.3.4 Commentaires

Le temps d'incubation (24h) a été choisi en fonction du contrôle. En effet, il fallait permettre aux cellules contrôles de franchir suffisamment la ligne de coupure. Deux autres temps d'incubation ont été testés au préalable, à savoir 6 et 8h, mais à ce stade les cellules contrôles n'avaient pas franchi la ligne. Il serait dès lors impossible d'y comparer les cellules traitées à l'atrasentan, en supposant que cet agent réduise la motilité de nos cellules.

La méthode de mesure de motilité choisie s'est révélée fiable et reproductible, mais elle n'a pas montré d'effet particulier de l'atrasentan. En d'autres termes, la sécrétion endogène de ET-1 ne semble pas intervenir dans la motilité des cellules TPC1 car le blocage spécifique du récepteur ET_A ne fait pas apparaître de différence de motilité. Il se pourrait qu'une voie de signalisation soit activée de manière constitutive dans les TPC1 pour aboutir à la motilité mais que cette voie ne soit pas régulée majoritairement par ET-1 endogène.

4.4 Western Blot pour Akt et Akt phosphorylé

4.4.1 But de l'expérience

Parmi les nombreuses fonctions attribuées à Akt dans différentes voies de signalisation, une attention particulière est portée sur son rôle anti-apoptotique. Comme nous l'avons mentionné, Akt dépend de la PI3K pour son activation. Une fois activée, Akt phosphoryle toute une série de protéines pro-apoptotiques en vue de les inactiver. Nous avons envisagé de déterminer l'état de phosphorylation de Akt dans les extraits protéiques de TPC1 traitées ou non à l'atrasentan. ET-1 est connue pour modifier l'état de phosphorylation de Akt et une surexpression de la voie PI3K/Akt phosphorylé pourrait participer au développement des propriétés cancéreuses en empêchant l'apoptose.

4.4.2 Résultats

Avant de rechercher la présence de notre protéine d'intérêt dans les lysats de cellules contrôles ou traitées à l'atrasentan, nous avons estimé la quantité de protéines dans chacun des échantillons au moyen d'un bleu de Coomassie hypersensible (BioSafe Coomassie, BioRad). Une quantité semblable de protéines a été déposée sur gel d'acrylamide. Nous avons réalisé des duplicats pour chaque condition.

Deux Westerns Blots ont été réalisés pour comparer l'état de phosphorylation de Akt dans des cellules contrôles et traitées à l'atrasentan 10 μ M. Deux quantités différentes de chaque échantillon ont été déposées sur chaque gel. D'une part nous avons recherché la présence d'Akt total au moyen d'un anticorps primaire anti-Akt total (1/10.000) (Cell Signaling), lui-même reconnu par un anticorps secondaire anti-lapin (1/40.000). D'autre part, Akt phosphorylé a été mis en évidence grâce à un anticorps primaire anti-Akt phosphorylé (1/10.000) reconnu par le même anticorps secondaire anti-lapin (1/40.000) (**Figures 4.10. et 4.11.**)

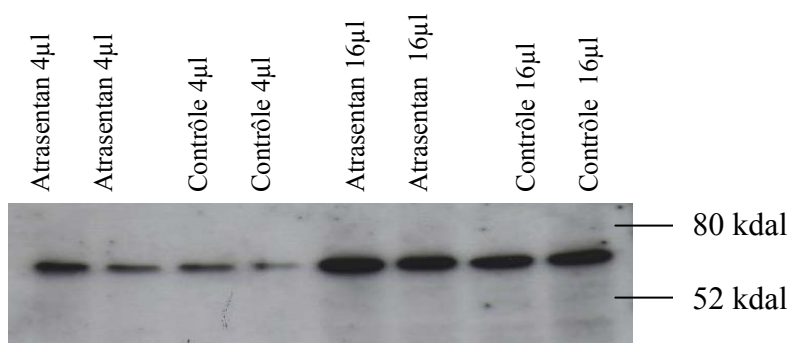


Figure 4.10. Analyse en Western Blot de Akt phosphorylé dans les cellules TPC1, en présence ou non d'atrasentan 10 μ M pour deux quantités différentes d'extraits cellulaires.

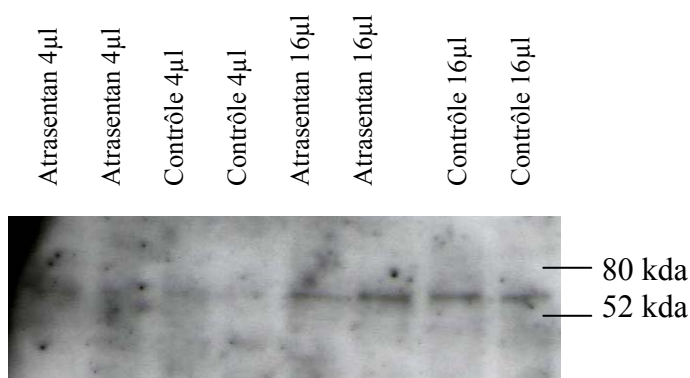


Figure 4.11. Analyse en Western Blot de Akt total dans les cellules TPC1, en présence ou non d'atrasentan 10 μ M pour deux quantités différentes d'extraits cellulaires.

La taille attendue pour Akt est d'environ 55kDa. Pour Akt total, on observe des bandes de faible intensité qui sont comparables entre elles pour chaque quantité d'échantillon (4 μ l ou 16 μ l). Akt semble donc présent en proportion égale dans les cellules contrôles et dans les cellules traitées. Pour Akt phosphorylé, les bandes sont globalement plus intenses mais on ne remarque toujours pas de différence d'intensité entre les cellules contrôles et les cellules traitées, et cela pour chaque volume d'échantillon déposé. La faible intensité de bande obtenue pour Akt total est probablement due à une spécificité moindre de l'AC anti-Akt total par rapport à l'AC anti-Akt phosphorylé.

4.4.3 Commentaires

Pour rappel, les cellules TPC1 sont issues d'un cancer papillaire thyroïdien et on sait, de par la littérature, que 30 % de ces cancers présentent une forte phosphorylation d'Akt (Ringel et al., 2001). La culture in vitro de cellules TPC1 semble appartenir à cette catégorie puisque Akt est très facilement détectable à l'état phosphorylé dans les cellules contrôles. L'activation de Akt pourrait participer à l'inhibition de l'apoptose de ces cellules cancéreuses.

Par ailleurs, on sait que ET-1 prévient l'apoptose dans certains cancers par activation de la voie PI3K/Akt phosphorylé (Del Bufalo et al., 2002). L'atrasentan ne semble pas bloquer ce phénomène puisque Akt est révélé sous sa forme phosphorylée dans les cellules traitées. Dans un mémoire précédent, l'ajout de ET-1 aux cellules TPC1 n'induit pas non plus d'effet évident sur l'état de Akt (Wittebans, 2004). Un autre antagoniste spécifique du récepteur ET_A (BQ123) n'a pas non plus montré de différence sur l'état de phosphorylation de Akt.

Ces données nous amènent à penser que ET-1 ne semble pas influencer la voie PI3K/Akt dans les cellules TPC1. Que l'on bloque ou non le récepteur ET_A par un antagoniste, Akt est présent en permanence sous sa forme phosphorylée dans les cellules TPC1. Cette phosphorylation constitutive n'est pas étonnante si l'on s'en réfère à un article récent de Melillo et al. (2005) où l'on montre que les cellules TPC1 possèdent une mutation du gène *ret* induisant une suractivation de la voie ras-raf-MEK-ERK et une phosphorylation de Akt qui participerait au développement de ce cancer thyroïdien en prévenant l'apoptose.

4.5 Tests de l'apoptose

4.5.1 But des expériences

Jusqu'à présent, le rôle de ET-1 dans l'apoptose n'a pas été clairement défini car on lui reconnaît à la fois des effets anti- et pro-apoptotiques selon le type cellulaire (Wu-Wong et al., 2000). De plus les mécanismes de régulation de l'apoptose initiée par ET-1 ne sont pas encore élucidés. En revanche des études ont pu démontrer que, sur certains types cellulaires cancéreux, ET-1 prévient l'apoptose induite par la privation de sérum ou des agents chimiques tels le paclitaxel (Del Bufalo et al., 2002).

Les expériences d'apoptose réalisées sur les TPC1 veulent, dans un premier temps, établir un contrôle positif d'apoptose. Pour cela nous allons traiter les TPC1 par un agent chimique connu pour avoir des effets apoptotiques et anti-néoplasiques. Le fait de pouvoir combiner un agent anti-cancéreux (tel la doxorubicine ou le paclitaxel) à un antagoniste d'un récepteur (l'atrasentan par exemple) pourrait être d'un avantage considérable dans le traitement de certains cancers. Trois types de manipulations sont utilisées à cette fin : un test d'exclusion au trypan bleu, un test de fragmentation de l'ADN et un test de marquage par immunofluorescence. Une fois ce contrôle établi, il s'agira d'observer l'influence de l'atrasentan seul ou en combinaison avec l'agent pro-apoptotique sur les TPC1.

4.5.2 Effets de la doxorubicine

4.5.2.1 Test de l'apoptose par exclusion au trypan bleu

4.5.2.1.1 But de l'expérience

La doxorubicine fait partie de la famille des anthracyclines et s'intercale dans l'ADN en perturbant l'action de la topoisomérase II. De plus, elle est capable de former des radicaux libres qui induisent une cytotoxicité cellulaire. Elle est utilisée dans la chimiothérapie de nombreux cancers. Nous voulons dans un premier temps déterminer si cette substance est capable d'induire l'apoptose sur les TPC1.

Le trypan bleu colore en bleu les cellules dont la membrane plasmique est altérée. C'est une technique simple qui permet de se faire une idée globale de l'effet recherché, c'est-à-dire estimer le pourcentage de mortalité cellulaire dans les cellules traitées ou non par des concentrations croissantes en doxorubicine. Le but, rappelons le, est de trouver une substance qui nous serve de contrôle positif pour l'apoptose. Il est à noter que cette technique ne permet pas de distinguer les cellules mortes des cellules en apoptose.

4.5.2.1.2 Résultats

Les TPC1 sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 50.000 cellules/puits. Après 24 h, elles sont traitées une nuit par une gamme de concentrations croissantes en doxorubicine : 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30 et 40 μM . Le pourcentage de mortalité cellulaire est estimé par comptage des cellules colorées et non colorées sur une cellule de Bürker. Les cellules vivantes ne sont pas colorées. Dans le cas présent, le contrôle (0 μM en doxorubicine) ne contient aucune cellule bleue. Quant à la perte cellulaire, elle est calculée pour chacune des expériences par rapport au contrôle, défini comme 0 % de perte. Le tableau ci-dessous reprend les moyennes pour l'ensemble des expériences (**Tableau 4.1**). Les ESM n'ont pas été indiquées car le nombre d'expériences variait de 2 à 4.

[doxorubicine] μM	Mortalité cellulaire (%)	Perte cellulaire (%)
0	0	0
1	2	45
3	5	41
5	1	35
10	2	41
20	2	33
30	0	53
40	20	64

Tableau 4.1. Mortalité cellulaire (en %) et perte cellulaire (en %) par puits en fonction de la concentration en doxorubicine sur les TPC1 après 17 h d'incubation. Les résultats sont donnés en % du contrôle.

On constate que, jusqu'à une concentration de 30 μM en doxorubicine, le pourcentage de survie cellulaire reste élevé, pour tomber brusquement aux alentours de 40 μM . En revanche, et de façon surprenante, on remarque que tout traitement à la doxorubicine, même à faible dose, s'accompagne d'une perte de cellules en comparaison au nombre de cellules présentes dans le contrôle et que cet effet est considérable pour une concentration de 40 μM . Entre 1 et 20 ou 30 μM , cette perte cellulaire reste stable. Dans tous les cas, cette perte est confirmée lors de l'observation des puits au microscope (**Figure 4.12.**). La doxorubicine induit un détachement des cellules de leur support, et ce d'autant plus que la concentration augmente. On observe également au microscope une vacuolisation des cellules qui est proportionnelle à la concentration en doxorubicine.

4.5.2.1.3 Commentaires

Il est difficile à ce stade d'expliquer la perte de cellules induite par le traitement à la doxorubicine, puisque, d'une part, la mortalité cellulaire évaluée par le trypan bleu reste négligeable jusqu'à 30 μM de doxorubicine, et d'autre part la manipulation est conçue pour récupérer à la fois les cellules adhérentes au support et les cellules (apoptotiques ou non) qui s'en détacheraient. Une hypothèse est émise : la doxorubicine n'induit peut-être pas l'apoptose mais plutôt une mort cellulaire accélérée de sorte que ces cellules se détachent et éclatent rapidement. Dès lors ces cellules ne seraient pas comptées et le nombre de cellules par puits sous-estimé.

Cette technique du trypan bleu, aussi grossière soit-elle, nous donne une idée globale de l'effet toxique de la doxorubicine sur nos cellules mais n'est toutefois pas spécifique de l'apoptose. Nous ne pouvons pas établir de contrôle positif d'apoptose à partir de ces données.

4.5.2.2 Test de l'apoptose par mise en évidence de l' « échelle d'ADN »

4.5.2.2.1 But de l'expérience

Comme mentionné dans l'introduction, les cellules apoptotiques se caractérisent par un clivage internucléosomal de l'ADN. Les fragments obtenus sont des multiples de 180 pb et leur migration sur un gel d'agarose fait apparaître un profil en échelle. A l'inverse, les cellules mourant de nécrose présentent un clivage d'ADN non régulier ; les fragments obtenus sont de tailles très diverses et n'apparaissent pas sur le gel. Cette expérience consiste à s'assurer de l'effet inducteur d'apoptose de la doxorubicine dans nos cellules.

4.5.2.2.2 Résultats

Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes rondes de 56,7 cm^2 à raison de 500.000 cellules/boîte pendant 24 h. Elles sont alors incubées une nuit en présence de doxorubicine à 0, 3 et 40 μM . Après lyse des cellules, extraction et purification de l'ADN, 15 μl d'échantillon sont déposés sur gel d'agarose ainsi que 15 μl du marqueur de poids moléculaire Smart Ladder. On obtient le résultat suivant (**Figure 4.13.**).

Les cellules contrôles présentent une seule bande de forte intensité de plus de 10.000 pb : les cellules non traitées n'ont pas d'activation spécifique de DNase et leur ADN n'est donc pas clivé. Pour les cellules ayant reçu un traitement à la doxorubicine 3 ou 40 μM , une seule bande apparaît au même niveau que celle du contrôle. Le profil en échelle d'ADN n'apparaît pas. Ces résultats suggèrent que la doxorubicine n'induit pas l'apoptose dans les TPC1.

Par ailleurs, l'intensité de la bande décroît de façon proportionnelle à la dose de doxorubicine. Cette diminution d'intensité reflète une quantité moins importante d'ADN dans les tests et s'expliquerait par une chute de la quantité de cellules. L'observation des cellules au microscope après le traitement à la doxorubicine confirme cette impression. La recherche de l'« échelle d'ADN » conforte donc les résultats obtenus avec les expériences de trypan bleu, à savoir que la doxorubicine n'induit pas d'apoptose mais une mort cellulaire très rapide sur les TPC1. Les cellules se détacheraient du support, la membrane plasmique éclaterait rapidement et l'ADN se dégraderait.

4.5.2.2.3 Commentaires

Au terme de ces expériences, le contrôle positif d'apoptose n'a pas été obtenu. Il se pourrait toutefois que l'apoptose nous ait échappé parce que les conditions optimales (temps d'incubation, concentration) n'étaient pas réunies. Ainsi, il faut rappeler que les expériences de trypan bleu et d'échelle d'ADN ont été réalisées pour un temps d'incubation de doxorubicine de 1 nuit. Cette durée d'exposition, choisie par référence à différents articles utilisant d'autres types cellulaires, ne convient peut-être pas pour les TPC1. Il se pourrait aussi que la gamme de concentrations en doxorubicine testée soit trop élevée pour ce temps d'incubation ou même encore que l'agent inducteur d'apoptose, à savoir la doxorubicine, ne soit pas le plus approprié pour ce type cellulaire.

On peut rapprocher de nos observations les données publiées par Müller et al. (1997) concernant les mécanismes cytotoxiques induits par la doxorubicine : sur le type cellulaire étudié, des cellules issues de leucémie lymphoïde aigue (MOLT-4), la doxorubicine ne provoque l'apoptose que dans une gamme étroite de concentrations (de 0.5 à 3 μM , avec un pic à 1 μM). Au-delà de 3 μM , les stimuli apoptotiques sont déclenchés mais l'apoptose ne peut être accomplie car la synthèse de protéines nécessaires à l'apoptose est inhibée au niveau transcriptionnel. Pour des concentrations très élevées, la cytotoxicité de la doxorubicine se traduit alors par des dégâts oxydatifs sur l'ADN conduisant à la mort cellulaire sans passer par l'apoptose.

Cette théorie pourrait élucider les phénomènes rencontrés dans nos cellules TPC1. Ainsi les concentrations en doxorubicine utilisées pour l'échelle ADN sont peut-être déjà trop élevées que pour induire l'apoptose et des mécanismes cytotoxiques de mort cellulaire seraient enclenchés sans passer par l'apoptose. Les expériences ultérieures joueront dès lors sur différents paramètres : des temps d'exposition plus courts à l'agent pro-apoptotique, de plus faibles concentrations en doxorubicine (<10 μM) ou l'utilisation d'un autre agent anti-néoplasique inducteur d'apoptose, par exemple l'étoposide. De plus, nous avons décidé de nous tourner directement vers une technique plus sensible pour détecter l'apoptose, à savoir l'immunofluorescence.

4.5.2.3 Test de l'apoptose par immunofluorescence

4.5.2.3.1 But de l'expérience

Elle a pour but de détecter la présence de caspase 3 active au moyen d'AC. Cette caspase est activée uniquement lors de l'apoptose où elle se retrouve sous forme dimérique active dans le cytoplasme cellulaire. Cette forme est reconnue par un AC spécifique, lui-même reconnu par un AC couplé à un fluorochrome. En d'autres termes, les cellules en apoptose auront leur cytoplasme marqué lors de l'observation au microscope confocal.

Le premier objectif reste le même que pour les expériences précédentes, à savoir démontrer l'induction ou non de l'apoptose par la doxorubicine ou par un autre agent chimique sur les TPC1. Le deuxième objectif est de voir si l'atrasentan, en bloquant le récepteur ETA, induit l'apoptose. Le dernier objectif consiste, par combinaison des deux substances, à déterminer une éventuelle implication de l'atrasentan sur les mécanismes induits par la doxorubicine.

Une gamme de faibles concentrations en doxorubicine (de 0,5 à 5 μ M) sera testée sur les cellules TPC1 de même que différents temps d'incubation à la doxorubicine ou à l'étoposide.

4.5.2.3.2 Résultats

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (50.000/puits) en ayant pris soin de déposer une lamelle en verre au fond de chaque puits. Après 24 h, les cellules sont soumises à différents traitements. Après les différentes étapes d'incubation, de fixation, de perméabilisation et de lavage, l'anticorps primaire est mis au contact des cellules. Il s'agit d'un anticorps anti-caspase 3 active humaine produite chez le lapin (dilution 1/100 ; Promega). Cette caspase ne se trouve sous sa forme active que dans les cellules en apoptose, où elle remplit le cytoplasme. L'anticorps secondaire utilisé est un anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa 488. Un marquage supplémentaire au TOPRO-3 permet de mettre en évidence le noyau des cellules en le colorant de bleu. Les résultats sont présentés à la **Figure 4.14**.

Expérience 1 :

Cette première expérience consiste à utiliser différents temps d'incubation de la doxorubicine (1, 4, 6 et 8 h) pour une concentration de 5 μ M. De plus, l'effet de la doxorubicine combinée à l'atrasentan 100 μ M a été analysé pour les 8h d'incubation.

On remarque que l'apoptose n'est induite dans aucune condition, ni dans les contrôles ni dans les cellules traitées à la doxorubicine avec ou sans atrasentan (Résultats non montrés). Il se peut que la concentration ne soit pas adéquate, dès lors nous allons tester des concentrations amoindries en doxorubicine avec un temps d'incubation plus long.

Expérience 2 :

Cette expérience consiste à montrer l'effet de deux concentrations en doxorubicine, incubées une nuit en présence des TPC1, par rapport au contrôle. Les conditions suivantes ont été réalisées en duplicat :

- Un contrôle.
- Doxorubicine 0,5 μM .
- Doxorubicine 1 μM .

Les cellules sont très confluentes aussi bien dans le contrôle que dans les groupes traités. On remarque quelques cellules en apoptose dans les contrôles (de 0 à 1 par champ). La doxorubicine à 0,5 et 1 μM ne montre pas plus de cellules apoptotiques. Ces concentrations ne permettent donc pas de définir un contrôle positif d'apoptose.

Expérience 3 :

Dans ce cas, l'expérience consiste tout d'abord à déterminer l'effet de l'atrasentan seul à 10 et 100 μM pendant 1 nuit sur les TPC1, par rapport à un contrôle simple et un contrôle éthanol à 0,2 % (concentration présente dans le puits qui reçoit 100 μM d'atrasentan). Dans un deuxième temps on testera l'effet de l'atrasentan en combinaison avec la doxorubicine pendant une nuit. Dans ce cas, les conditions suivantes sont réalisées :

- Doxorubicine 0,5 μM + atrasentan 100 μM .
- Doxorubicine 1 μM + atrasentan 100 μM .

On observe que très peu de cellules apoptotiques sur l'ensemble des champs analysés où la confluence est normale. De plus l'éthanol 0,2 % à lui seul n'induit pas d'apoptose et ne provoque pas de perte cellulaire.

Pour l'atrasentan, aucune des deux concentrations utilisées n'induit d'apoptose dans les TPC1. Par ailleurs, les cellules y sont aussi nombreuses que dans les contrôles.

La combinaison doxorubicine 0,5 μM -atrasentan 100 μM ne montre pas non plus de différence par rapport à la doxorubicine seule. En revanche, la combinaison doxorubicine 1 μM -atrasentan 100 μM semble mettre en avant un effet d'amplification de l'apoptose.

Expérience 4 :

A ce stade, seule la combinaison « doxorubicine 1 μM - atrasentan 100 μM » semble induire l'apoptose mais ce signal reste toutefois très faible que pour affirmer que l'atrasentan amplifie l'effet de la doxorubicine. Nous nous sommes dès lors tournés vers un autre agent afin de tester son pouvoir apoptotique sur les TPC1.

Nous avons choisi l'étoposide comme agent inducteur d'apoptose. Les cellules sont incubées une nuit avec différentes concentrations d'étoposide : 25, 50, 100 et 150 μM . Un contrôle est ajouté.

Dans le contrôle, on observe que les cellules sont confluentes avec de temps à autre une cellule en apoptose. Par la suite on constate que tout traitement à l'étoposide induit légèrement l'apoptose mais qu'il s'accompagne d'une chute progressive du nombre de cellules en fonction de la concentration. A 25 μM , on aperçoit quelques cellules en apoptose de manière ponctuelle. A 50 μM , on observe 2 à 3 cellules apoptotiques par

champ, malgré une perte non négligeable de cellules. Pour les concentrations de 100 et 150 μM , quelques cellules apoptotiques sont observables, mais à ce stade la perte de cellules est considérable.

Nous pouvons conclure que l'étoposide induit une certaine apoptose dans les cellules TPC1, mais pas suffisamment que pour servir de contrôle positif. De plus, cet effet est plus faible que la combinaison « doxorubicine 1 μM - atrasentan 100 μM ».

Expérience 5 :

Puisque l'étoposide induit légèrement l'apoptose, il se pourrait que sa combinaison avec l'atrasentan amplifie ce phénomène. Dans ce but, nous avons comparé l'effet de l'étoposide seul à celui de l'étoposide combiné à l'atrasentan. Sur base des expériences précédentes, nous avons choisi une concentration en étoposide de 50 μM avec ou sans atrasentan 100 μM .

On observe alors pratiquement pas de cellules en apoptose dans les contrôles. L'étoposide seul provoque une chute de la quantité cellulaire et on voit apparaître environ une cellule apoptotique par champ. Par ailleurs, on ne remarque pas d'effet additif de l'atrasentan sur l'effet de l'étoposide ni de perte plus importante de cellules que l'étoposide seul. L'atrasentan n'amplifie donc pas le peu d'apoptose induite par l'étoposide.

4.5.2.3.3 Commentaires

En résumé, les expériences d'immunofluorescence sont les seules à mettre en évidence directement l'apoptose dans nos cellules TPC1, en présence de concentrations de doxorubicine ou d'étoposide choisies de façon à ne pas générer trop de dégâts nécrotiques. Toutefois, cette induction reste faible. La condition à retenir pour induire une apoptose détectable est la combinaison doxorubicine 1 μM -atrasentan 100 μM . Par contre, le signal apoptotique généré par l'étoposide seul à 50 μM , ou en combinaison avec l'atrasentan, reste plus faible.

L'atrasentan seul ne provoque pas d'apoptose. Donc, la voie de signalisation médiée par ET-1 endogène ne serait pas le facteur responsable de la résistance à l'apoptose dans les TPC1 puisque le blocage de son récepteur par l'atrasentan ne fait pas apparaître d'apoptose. Par ailleurs, le fait que l'atrasentan amplifie quelque peu l'effet de la doxorubicine laisse penser que ET-1 pourrait toutefois participer à ce processus d'apoptose en renforçant d'autres voies de signalisation. Malheureusement cette expérience n'a pu être réalisée qu'une fois et nous n'en tirerons pas de conclusions prématurées.

5 Discussion et perspectives

Ce mémoire avait pour objectif d'étudier l'effet autocrine de la principale forme d'endothéline endogène, ET-1, sur la prolifération, la motilité et l'apoptose de cellules thyroïdiennes cancéreuses humaines, TPC1, et secondairement de cellules interstitielles, 3T3, grâce à l'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs ET_A, l'atrasentan. Le temps étant compté, ces objectifs ont été partiellement atteints, et des résultats intéressants se dégagent qui permettent d'envisager une suite à ce travail.

5.1 Prolifération

5.1.1 Concernant les TPC1

Au vu des résultats, on peut dire que ET-1 endogène agit modérément in vitro comme facteur mitogénique sur les TPC1 en se fixant sur le récepteur ET_A puisque le blocage spécifique de ce récepteur par l'atrasentan inhibe partiellement l'effet de ET-1.

Les cellules papillaires thyroïdiennes cancéreuses TPC1, qui sont un modèle typique des cancers thyroïdiens les plus fréquents, rejoignent ainsi un ensemble de lignées cancéreuses différentes (carcinomes ovariens, prostatiques et cervicaux) dans lesquelles ET-1 agit via une boucle autocrine pour stimuler la prolifération cellulaire. Des études précédentes s'étaient d'ailleurs penchées sur le récepteur ET_A comme cible thérapeutique anticancéreuse. Ainsi, dans les carcinomes ovariens, divers antagonistes de ce récepteur tels que le BQ123 (Bagnato et al., 1999) et l'atrasentan (Rosano et al., 2003) se sont révélés efficaces pour inhiber fortement la prolifération cellulaire. De même, dans des cancers cervicaux induits par HPV (human papilloma virus), le BQ123 diminue l'effet de ET-1 endogène sur la prolifération des kératinocytes infectés par HPV (Venuti et al., 2000).

Toutefois, pour les TPC1, l'inhibition de la prolifération n'est que partielle et laisse supposer que d'autres facteurs de croissance sont impliqués dans les voies de signalisation conduisant à la prolifération des TPC1. Rappelons que nos expériences ont été effectuées en présence de sérum et que celui-ci contient divers facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF et l'IGF mais aussi de l'endothéline supplémentaire. ET-1 est réputée pour agir principalement de façon co-mitogénique avec ces facteurs de croissance (Kopetz et al., 2002 ; Bagnato et al., 1997) et la présence d'ET-1 dans le sérum pourrait théoriquement masquer l'effet réel d'ET-1 autocrine.

Rappelons que lors d'un mémoire réalisé auparavant dans le laboratoire (Wittemans, 2004), aucun effet significatif de ET-1 ajouté dans le milieu de culture n'avait pu être démontré sur la prolifération des cellules TPC1 en absence de sérum. Le sérum quant à lui augmentait très largement la prolifération de ces cellules. Dès lors il serait utile de quantifier ET-1 présente dans le milieu et de la mettre en relation avec la diminution de prolifération observée. Des kits de dosage de ET-1 par Elisa sont commercialement disponibles.

Il pourrait aussi s'avérer utile de tester des temps d'incubation des TPC1 en présence d'atrasentan plus longs que 24h. Dans les cancers ovariens, l'atrasentan 1 μ M a été mis en contact des cellules cancéreuses jusqu'à 5 jours. On observe une diminution de prolifération significative à partir de 3 jours ($p < 0,05$), qui s'accroît aux 4^{ème} et 5^{ème} jours ($p < 0,001$) en comparaison avec le contrôle (Rosano et al., 2003). Dans des modèles

in vitro de métastases osseuses, des cellules cancéreuses prostatiques ont été co-cultivées avec des ostéoblastes. On y a testé l'effet de l'atrasentan sur les fibroblastes. L'atrasentan à 10 μ M a été mis au contact des fibroblastes pendant 48h, avec ou sans cellules cancéreuses, avant que de l'atrasentan frais ne soit ajouté de nouveau pour 48h.

5.1.2 Concernant les 3T3

Les cellules 3T3 sont sensibles à ET-1 endogène puisque le blocage du récepteur ET_A peut induire une inhibition importante de leur prolifération, bien qu'à des concentrations très élevées.

Les 3T3 constituent dans la littérature un modèle pour l'étude de croissance cellulaire car elles possèdent un large répertoire de récepteurs et de messagers secondaires. Ces cellules possèdent notamment des récepteurs de haute affinité pour ET-1, laquelle y amplifie la prolifération stimulée par d'autres facteurs de croissance tels que le PDGF, le FGF ou l'insuline (Kusuhara et al., 1989).

L'expérience réalisée par mise en contact du milieu des TPC1 sur les 3T3 voulait simplement nous donner une idée de l'effet paracrine que peut avoir le milieu de culture des TPC1 sur son environnement « naturel », à savoir des fibroblastes. C'est un préliminaire avant de passer à un système idéal de co-culture. Les interactions entre le stroma (contenant entre autres des fibroblastes) et les cellules épithéliales sont essentielles pour le développement correct d'un organe. Une perturbation de ces interactions, suite à la transformation maligne des cellules épithéliales par exemple, peut contribuer au développement tumoral et à l'invasion (Mueller et al., 2002). Des systèmes de co-culture se sont révélés d'une grande utilité pour l'étude des interactions stroma-épithélium participant au développement de diverses tumeurs (Olumi et al., 1999).

On sait que différents types de cellules cancéreuses sont capables de sécréter des quantités non négligeables d'ET-1, comme les cancers ovariens, mammaires, pancréatiques et coliques mais aussi les cancers papillaires thyroïdiens. ET-1 sécrétée par ces cellules cancéreuses pourrait jouer un rôle régulateur sur la croissance des cellules du stroma environnant, elles-mêmes agissant en retour sur la tumeur (Kusuhara et al., 1990 ; Patel et al., 1997). Ces idées feront l'objet d'expériences ultérieures.

5.2 Motilité

La motilité est un caractère essentiel des cellules cancéreuses. En examinant la littérature, il nous a semblé intéressant d'étudier l'influence autocrine de ET-1 sur ce paramètre, en évoquant plus particulièrement la voie PI3K/Akt phosphorylé. Certes, la motilité est un processus complexe faisant intervenir différentes voies de signalisation dont celles situées en aval de l'EGFR telles que la PI3K/Akt, la MAPK et la PKC (Kruger et al., 2003). Cependant, la plupart des cancers thyroïdiens, notamment les carcinomes papillaires, présentent des taux élevés d'Akt phosphorylé par rapport à des tissus normaux (Ringel et al., 2001). Les cellules TPC1 étudiées au cours de ce mémoire présentent à l'état basal cette hyperphosphorylation d'Akt, comme cela a été montré dans un mémoire précédent (Wittebans, 2004). Le rôle potentiel d'Akt phosphorylé s'étend à la carcinogenèse et à l'invasion tumorale (Mandal et al., 2005 ; Vasko et al., 2004).

La voie PI3K/Akt a fait l'objet d'un ciblage thérapeutique pour lequel différents inhibiteurs de la PI3K ont été proposés, tels la wortmannine et le LY294002. Plus récemment, le KP372-1, un inhibiteur de Akt, s'est montré encore plus efficace pour bloquer la voie PI3K/Akt. On lui confère des propriétés anti-prolifératives et apoptotiques sur les cellules de cancer thyroïdien, et ce produit fera l'objet d'études cliniques d'ici peu (Mandal et al., 2005). Des expériences de co-culture entre des TPC1 et des leucocytes ont démontré que l'activation de ERK, initiée par des protéines oncogènes, peut également intervenir dans l'invasion des TPC1 (Melillo et al., 2005).

Malgré ces recherches, aucune étude à ce jour n'a mis en évidence un rôle de ET-1 dans l'invasion des cancers thyroïdiens, bien que ce rôle lui ait été reconnu dans les cancers ovariens. Dans ce dernier cas, ET-1 induit la phosphorylation de p125FAK et de la paxilline dont on pense qu'elles induisent des signaux impliqués dans l'invasion. De plus, l'antagoniste peptidique de ET_A, le BQ123, bloque l'invasion des cancers ovariens in vitro (Rosano et al., 2001 ; Vacca et al., 2000).

La conclusion des expériences que nous avons menées sur la motilité des TPC1 est qu'aucun effet autocrine de ET-1 ne peut être démontré au moyen de l'atrasentan, malgré le caractère bien motile et invasif de ces cellules (Melillo et al., 2005).

Il serait dès lors intéressant de passer à un système de co-culture entre des TPC1 et des cellules stromales, en présence ou non d'atrasentan, afin d'identifier les facteurs présents dans le milieu qui pourraient participer à l'invasion des cellules cancéreuses. Dans ce même système, on pourrait observer l'influence de l'ajout d'ET-1 sur l'invasion des TPC1 comme cela a été réalisé pour des cancers du sein (Grimshaw et al., 2004).

5.3 Apoptose

Les expériences préliminaires effectuées en vue d'établir un contrôle positif d'apoptose ne sont pas concluantes car nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet apoptotique majeur suite au traitement à la doxorubicine ou à l'étoposide. Or la doxorubicine induit l'apoptose dans une série de cellules cancéreuses. Les tumeurs qui répondent le plus à cet agent anti-tumoral sont principalement les carcinomes du sein et de l'œsophage, les ostéosarcomes, le sarcome de Kaposi et le lymphome de Hodgkin (Singal et al., 1998). De même, l'étoposide possède une activité anti-tumorale envers une grande variété de néoplasies incluant les cancers pulmonaires, les leucémies, le sarcome de Kaposi et les neuroblastomes.

Par ailleurs, nos résultats suggèrent que ET-1 endogène n'est pas le seul facteur responsable de la survie des TPC1 puisque le blocage de son récepteur par l'atrasentan seul n'induit pas d'apoptose. Toutefois on ne peut exclure l'hypothèse que ET-1 pourrait y contribuer par des signaux intracellulaires qui rejoindraient des voies apoptotiques. Par ailleurs, l'ajout de ET-1 sur des cellules cancéreuses est connu pour avoir des effets anti-apoptotiques et pour protéger de l'apoptose induite par des agents chimiques. Aussi, un mémoire précédent avait mis en évidence (test de trypan bleu) un effet inhibiteur significatif de ET-1 exogène sur l'apoptose induite à la doxorubicine (Wittebans, 2004).

Au terme de nos essais d'apoptose, il nous est impossible de conclure avec certitude que l'atrasentan amplifie l'apoptose induite par un agent chimique, mais ce n'est pas exclu au vu des résultats de la combinaison « doxorubicine 1 μ M - atrasentan 100 μ M »). Toutes les conditions ne sont peut-être pas réunies pour permettre une induction suffisante.

Il faut impérativement tenter d'obtenir un contrôle positif d'apoptose en jouant par exemple sur les paramètres de temps d'incubation et de concentration en doxorubicine. Si ce contrôle peut être obtenu, un kit de détection de l'apoptose (Elisa) pourra être utilisé afin de quantifier celle-ci et mettre en évidence un effet de l'atrasentan. Le cas échéant différentes voies restent à explorer.

Il serait par exemple intéressant de pouvoir étudier l'effet d'un autre agent anti-néoplasique sur les TPC1. Mais de toute façon, il faut garder à l'esprit que ce modèle cellulaire n'est peut-être pas le mieux adapté pour l'étude de l'apoptose et pour l'effet de l'ET endogène sur ce phénomène. Les TPC1 sont issues d'une lignée cellulaire cancéreuse immortalisée et pourraient avoir acquis des mécanismes de résistance à l'apoptose. Dans ce cas, une étude sur des cultures primaires pourrait révéler d'autres résultats.

Par ailleurs, l'effet de l'ET endogène pourrait être examiné sur un autre type de cancer thyroïdien, par exemple les cellules folliculaires FTC133 ou médullaires TT, bien que ce dernier type cellulaire présente un taux de doublement assez faible. Pour les TT ce temps de dédoublement est de 83h alors que celui des TPC1 est d'environ 20h. Selon la littérature, les cellules FTC133 pourraient constituer un bon modèle d'apoptose. En effet elles se sont montrées sensibles à l'action de la doxorubicine (0,5 et 1 μ M pendant 24h) dont l'effet cytotoxique semblait médié par le Fas (Massart et al., 2004). Toutefois il ne faut pas oublier que, contrairement aux TPC1, elles expriment aussi le récepteur ET_B qui intervient dans une moindre mesure dans l'action de ET-1.

6 Conclusions

Un cancer se développe lorsqu'un facteur perturbe l'équilibre entre le taux de prolifération et celui de l'apoptose, cet équilibre assurant l'homéostasie de l'organisme. Les cancers présentent ainsi une forte élévation de leur taux de prolifération et une diminution nette de leur mort cellulaire programmée. Le rôle de ET-1 endogène dans le développement des cancers papillaires est difficile à déterminer précisément puisqu'elle n'est impliquée que partiellement dans la prolifération et dans l'apoptose et qu'elle n'est pas responsable de la motilité des cellules.

Bien que son action autocrine ne soit pas prépondérante, il ne faut toutefois pas exclure l'hypothèse qu'elle puisse agir principalement comme acteur paracrine et/ou en synergie avec d'autres facteurs. Dans cette optique, ET-1 sécrétée par les cellules cancéreuses papillaires thyroïdiennes agirait *in vivo* comme acteur paracrine sur les cellules du stroma, celles-ci en retour contribueraient au développement tumoral. ET-1 pourrait également agir en synergie avec d'autres facteurs de croissance pour amplifier leurs effets.

Une question qui n'est toujours pas élucidée est le lien qui existe entre ET-1 et Akt. Les données de la littérature et les résultats obtenus jusqu'à présent démontrent une

phosphorylation constitutive de Akt indépendante de ET-1 dans les cellules TPC1. Un article récent démontre que ces cellules sont caractérisées par une mutation du gène *ret* qui active une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de ERK et de Akt et qui résulte finalement en une prolifération et une motilité cellulaire (Melillo et al., 2005). Cette piste Akt fait d'ailleurs l'objet de recherches actuelles dans le traitement des cancers thyroïdiens. Néanmoins la piste ET-1 ne doit pas être abandonnée et des recherches doivent être poursuivies quant à son éventuelle implication dans la régulation de la cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation d'Akt.

L'effet autocrine de ET-1 n'a été étudié que pour les TPC1 et les données obtenues ne sont pas généralisables à l'ensemble des cancers thyroïdiens mais cet axe ET mérite d'être étudié dans d'autres types de cancer thyroïdien. Les cancers médullaires seraient d'ailleurs une belle piste puisqu'ils sont réputés pour être invasifs et ne disposent pas de traitement efficace en cas de métastases. L'atrasentan quant à lui constitue toujours un bon outil de recherche dans l'implication de ET-1 endogène dans les cancers puisqu'il bloque sélectivement le récepteur ET_A et s'avère être beaucoup plus stable qu'un antagoniste peptidique.

Références bibliographiques

- Arai, H., Hori, S., Aramori, I., Ohkubo, H. & Nakanishi, S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, **348**, 730-732 (1990)
- Bagnato, A. & Natali, P. G. Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med*, **2**, 16 (2004)
- Bagnato, A., Salani, D., Di Castro, V., Wu-Wong, J. R., Tecce, R., Nicotra, M. R., Venuti, A. & Natali, P. G. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer Res*, **59**, 720-727 (1999)
- Bagnato, A., Tecce, R., Di Castro, V. & Catt, K. J. Activation of mitogenic signaling by endothelin 1 in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, **57**, 1306-1311 (1997)
- Battistini, B., Sirois, P., Braquet, P. & Filep, J. G. Endothelin-induced constriction of guinea pig airways: role of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol*, **186**, 307-310 (1990)
- Burkhardt, M., Barton, M. & Shaw, S. G. Receptor- and non-receptor-mediated clearance of big-endothelin and endothelin-1: differential effects of acute and chronic ETA receptor blockade. *J Hypertens*, **18**, 273-279 (2000)
- Carducci, M. A., Nelson, J. B., Bowling, M. K., Rogers, T., Eisenberger, M. A., Sinibaldi, V., Donehower, R., Leahy, T. L., Carr, R. A., Isaacson, J. D., Janus, T. J., Andre, A., Hosmane, B. S. & Padley, R. J. Atrasentan, an endothelin-receptor antagonist for refractory adenocarcinomas: safety and pharmacokinetics. *J Clin Oncol*, **20**, 2171-2180 (2002)
- Colin, I., Berbinschi, A., Denef, J. F. & Ketelslegers, J. M. Detection and identification of endothelin-1 immunoreactivity in rat and porcine thyroid follicular cells. *Endocrinology*, **130**, 544-546 (1992)
- Colin, I. M., Nava, E., Toussaint, D., Maiter, D. M., vanDenhove, M. F., Luscher, T. F., Ketelslegers, J. M., Denef, J. F. & Jameson, J. L. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the thyroid gland: evidence for a role of nitric oxide in vascular control during goiter formation. *Endocrinology*, **136**, 5283-5290 (1995)
- Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Varmi, M., Salani, D., Rosano, L., Trisciuglio, D., Spinella, F. & Bagnato, A. Endothelin-1 protects ovarian carcinoma cells against paclitaxel-induced apoptosis: requirement for Akt activation. *Mol Pharmacol*, **61**, 524-532 (2002)
- Donckier, J., Michel, L., Delos, M., Van Beneden, R. & Havaux, X. Endothelin axis expression in medullary thyroid carcinoma: a potential therapeutic target. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **61**, 282-284 (2004)
- Donckier, J. E., Hanet, C., Berbinschi, A., Galanti, L., Robert, A., Van Mechelen, H., Pouleur, H. & Ketelslegers, J. M. Cardiovascular and endocrine effects of endothelin-1 at pathophysiological and pharmacological plasma concentrations in conscious dogs. *Circulation*, **84**, 2476-2484 (1991)
- Donckier, J. E., Michel, L., Van Beneden, R., Delos, M. & Havaux, X. Increased expression of endothelin-1 and its mitogenic receptor ETA in human papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **59**, 354-360 (2003)
- Dupuis, J., Stewart, D. J., Cernacek, P. & Gosselin, G. Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1. *Circulation*, **94**, 1578-1584 (1996)
- Durick, K., Gill, G. N. & Taylor, S. S. Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Mol Cell Biol*, **18**, 2298-2308 (1998)
- Fizazi, K., Yang, J., Peleg, S., Sikes, C. R., Kreimann, E. L., Daliani, D., Olive, M., Raymond, K. A., Janus, T. J., Logothetis, C. J., Karsenty, G. & Navone, N. M.

- Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res*, **9**, 2587-2597 (2003)
- Goraca, A. New views on the role of endothelin (minireview). *Endocr Regul*, **36**, 161-167 (2002)
- Grimshaw, M. J., Hagemann, T., Ayhan, A., Gillett, C. E., Binder, C. & Balkwill, F. R. A role for endothelin-2 and its receptors in breast tumor cell invasion. *Cancer Res*, **64**, 2461-2468 (2004)
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. & Masaki, T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2863-2867 (1989)
- Isozaki, O., Tsushima, T., Miyakawa, M., Emoto, N., Demura, H., Sato, Y., Shizume, K. & Arai, M. Iodine regulation of endothelin-1 gene expression in cultured porcine thyroid cells: possible involvement in autoregulation of the thyroid. *Thyroid*, **3**, 239-244 (1993)
- Jackson, S., Tseng, Y. C., Lahiri, S., Burman, K. D. & Wartofsky, L. Receptors for endothelin in cultured human thyroid cells and inhibition by endothelin of thyroglobulin secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, **75**, 388-392 (1992)
- Jameson, L., Weetman, A. P. Disorders of the thyroid gland: in Principles of internal medicine. Braunwald, Fauci, Kasper, Hauser, Longo, Jameson: editors. *Harrison's*, **330**, 2060-2083 (2001)
- Karne, S., Jayawickreme, C. K. & Lerner, M. R. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, **268**, 19126-19133 (1993)
- Kimura, E. T., Nikiforova, M. N., Zhu, Z., Knauf, J. A., Nikiforov, Y. E. & Fagin, J. A. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res*, **63**, 1454-1457 (2003)
- Kiowski, W., Sutsch, G., Hunziker, P., Muller, P., Kim, J., Oechslin, E., Schmitt, R., Jones, R. & Bertel, O. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *Lancet*, **346**, 732-736 (1995)
- Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Yoshizumi, M., Takaku, F. & Yazaki, Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, **238**, 249-252 (1988)
- Kopetz, E. S., Nelson, J. B. & Carducci, M. A. Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs*, **20**, 173-182 (2002)
- Kruger, J. S. & Reddy, K. B. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res*, **1**, 801-809 (2003)
- Kusuhara, M., Yamaguchi, K., Nagasaki, K., Hayashi, C., Suzaki, A., Hori, S., Handa, S., Nakamura, Y. & Abe, K. Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res*, **50**, 3257-3261 (1990)
- Kusuhara, M., Yamaguchi, K., Ohnishi, A., Abe, K., Kimura, S., Oono, H., Hori, S. & Nakamura, Y. Endothelin potentiates growth factor-stimulated DNA synthesis in Swiss 3T3 cells. *Jpn J Cancer Res*, **80**, 302-305 (1989)
- Levin, E. R. Endothelins. *N Engl J Med*, **333**, 356-363 (1995)
- Levin, E. R. Endothelins as cardiovascular peptides. *Am J Nephrol*, **16**, 246-251 (1996)
- Los, M., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity*, **10**, 629-39 (1999)

- Love, M. P. Vasodilator effects of endothelin-converting-enzyme inhibitor and endothelin ETA Receptor blockade in chronic heart failure patients treated with ACE inhibitors. *Circulation*, **94**, 2131-2137 (1996)
- Luscher, T. F. & Wenzel, R. R. Endothelin and endothelin antagonists: pharmacology and clinical implications. *Agents Actions Suppl*, **45**, 237-253 (1995)
- Mandal, M., Kim, S., Younes, M. N., Jasser, S. A., El-Naggar, A. K., Mills, G. B. & Myers, J. N. The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br J Cancer*, **92**, 1899-1905 (2005)
- Massart, C., Barbet, R., Genetet, N., Gibassier, J. Doxorubicin induces Fas-Mediated apoptosis in human thyroid carcinoma cells. *Thyroid*, **14**, 263-270 (2004)
- Melillo, R. M., Castellone, M. D., Guarino, V., De Falco, V., Cirafici, A. M., Salvatore, G., Caiazzo, F., Basolo, F., Giannini, R., Kruhoffer, M., Orntoft, T., Fusco, A. & Santoro, M. The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*, **115**, 1068-1081 (2005)
- Miyakawa, M., Tsushima, T., Isozaki, O., Demura, H., Shizume, K. & Arai, M. Endothelin-1 stimulates c-fos mRNA expression and acts as a modulator on cell proliferation of rat FRTL5 thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **184**, 231-238 (1992)
- Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. Tumor-stroma interactions directing phenotype and progression of epithelial skin tumor cells. *Differentiation*, **70**, 486-497 (2002)
- Muller, I., Jenner, A., Bruchelt, G., Niethammer, D. & Halliwell, B. Effect of concentration on the cytotoxic mechanism of doxorubicin--apoptosis and oxidative DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun*, **230**, 254-257 (1997)
- Nakamura, S., Naruse, M., Naruse, K., Demura, H. & Uemura, H. Immunocytochemical localization of endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Histochemistry*, **94**, 475-477 (1990)
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. & Nisen, P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 110-116 (2003)
- Neylon, C. B. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 149-153 (1999)
- Nishikibe, M., Ohta, H., Okada, M., Ishikawa, K., Hayama, T., Fukuroda, T., Noguchi, K., Saito, M., Kanoh, T., Ozaki, S., Kamei, T., Hara, K., William, D., Kivlighn, S., Krause, S., Gabel, R., Zingaro, G., Nolan, N., O'Brien, J., Clayton, F., Lynch, J., Pettibone, D. & Siegl, P. Pharmacological properties of J-104132 (L-753,037), a potent, orally active, mixed ETA/ETB endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **289**, 1262-1270 (1999)
- Okano, J., Gaslightwala, I., Birnbaum, M. J., Rustgi, A. K. & Nakagawa, H. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J Biol Chem*, **275**, 30934-30942 (2000)
- Olumi, A. F., Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Carroll, P. R., Tlsty, T. D. & Cunha, G. R. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, **59**, 5002-5011 (1999)
- Opgenorth, T. J., Adler, A. L., Calzadilla, S. V., Chiou, W. J., Dayton, B. D., Dixon, D. B., Gehrke, L. J., Hernandez, L., Magnuson, S. R., Marsh, K. C., Novosad, E. I., Von Geldern, T. W., Wessale, J. L., Winn, M. & Wu-Wong, J. R. Pharmacological characterization of A-127722: an orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **276**, 473-481 (1996)
- Ortega Mateo, A. & de Artinano, A. A. Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*, **36**, 339-351 (1997)
- Patel, K. V., Sheth, H. G. & Schrey, M. P. Stimulation of endothelin-1 secretion by human breast cancer cells through protein kinase A activation: a possible novel paracrine loop

- involving breast fibroblast-derived prostaglandin E2. *Mol Cell Endocrinol*, **126**, 143-151 (1997)
- Pinet, F. [What is the role of endothelin system?]. *Med Sci (Paris)*, **20**, 339-345 (2004)
- Rich, S. & McLaughlin, V. V. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*, **108**, 2184-2190 (2003)
- Ringel, M. D., Hayre, N., Saito, J., Saunier, B., Schuppert, F., Burch, H., Bernet, V., Burman, K. D., Kohn, L. D. & Saji, M. Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res*, **61**, 6105-6111 (2001)
- Rosano, L., Spinella, F., Salani, D., Di Castro, V., Venuti, A., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Bagnato, A. Therapeutic targeting of the endothelin a receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res*, **63**, 2447-2453 (2003)
- Rosano, L., Varmi, M., Salani, D., Di Castro, V., Spinella, F., Natali, P. G. & Bagnato, A. Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, **61**, 8340-8346 (2001)
- Salani, D., Rosano, L., Di Castro, V., Spinella, F., Venuti, A., Padley, R. J., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Bagnato, A. ABT-627, a potent endothelin receptor A antagonist, inhibits ovarian carcinoma growth in vitro. *Clin Sci (Lond)*, **103 Suppl 48**, 318S-321S (2002)
- Sanchez-Capelo, A. Dual role for TGF-beta1 in apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, **16**, 15-34 (2005)
- Santoro, M., Carlomagno, F., Hay, I. D., Herrmann, M. A., Grieco, M., Melillo, R., Pierotti, M. A., Bongarzone, I., Della Porta, G., Berger, N. & et al. Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest*, **89**, 1517-1522 (1992)
- Santoro, M., Chiappetta, G., Cerrato, A., Salvatore, D., Zhang, L., Manzo, G., Picone, A., Portella, G., Santelli, G., Vecchio, G. & Fusco, A. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the RET/PTC1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*, **12**, 1821-1826 (1996)
- Shichiri, M., Kato, H., Marumo, F. & Hirata, Y. Endothelin-1 as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension*, **30**, 1198-1203 (1997)
- Simonson, M. S. & Dunn, M. J. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *Faseb J*, **4**, 2989-3000 (1990)
- Simonson, M. S. & Herman, W. H. Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, **268**, 9347-9357 (1993)
- Simonson, M. S., Wang, Y. & Herman, W. H. Nuclear signaling by endothelin-1 requires Src protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, **271**, 77-82 (1996)
- Singal, P.K., Iliskovic, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, **339**, 900-905 (1998)
- Spieker, L. E., Noll, G. & Luscher, T. F. Therapeutic potential for endothelin receptor antagonists in cardiovascular disorders. *Am J Cardiovasc Drugs*, **1**, 293-303 (2001)
- Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Bagnato, A. Endothelin-1 decreases gap junctional intercellular communication by inducing phosphorylation of connexin 43 in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, **278**, 41294-41301 (2003)
- Sulman, C. & Carpentier, P. Cancers: évaluation, traitement et surveillance. *Document Medespace*, (1999)
- Takuwa, Y., Yanagisawa, M., Takuwa, N. & Masaki, T. Endothelin, its diverse biological activities and mechanisms of action. *Prog Growth Factor Res*, **1**, 195-206 (1989)

- Teder, P. & Noble, P. W. A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **23**, 7-10 (2000)
- Tseng, Y. C., Lahiri, S., Jackson, S., Burman, K. D. & Wartofsky, L. Endothelin binding to receptors and endothelin production by human thyroid follicular cells: effects of transforming growth factor-beta and thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab*, **76**, 156-161 (1993)
- Tsukahara, H., Ende, H., Magazine, H. I., Bahou, W. F. & Goligorsky, M. S. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective ETB receptor in endothelial cells. Receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, **269**, 21778-21785 (1994)
- Tsushima, T., Arai, M., Isozaki, O., Nozoe, Y., Shizume, K., Murakami, H., Emoto, N., Miyakawa, M. & Demura, H. Interaction of endothelin-1 with porcine thyroid cells in culture: a possible autocrine factor regulating iodine metabolism. *J Endocrinol*, **142**, 463-470 (1994)
- Vacca, F., Bagnato, A., Catt, K. J. & Tecce, R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, **60**, 5310-5317 (2000)
- Vainio, M., Saijonmaa, O., Fyhrquist, F. & Tornquist, K. Purinergic agonists stimulate the secretion of endothelin-1 in rat thyroid FRTL-5 cells. *J Cell Physiol*, **169**, 538-543 (1996)
- Vasko, V., Saji, M., Hardy, E., Kruhlak, M., Larin, A., Savchenko, V., Miyakawa, M., Isozaki, O., Murakami, H., Tsushima, T., Burman, K. D., De Micco, C. & Ringel, M. D. Akt activation and localisation correlate with tumour invasion and oncogene expression in thyroid cancer. *J Med Genet*, **41**, 161-170 (2004)
- Venuti, A., Salani, D., Manni, V., Poggiali, F. & Bagnato, A. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *Faseb J*, **14**, 2277-2283 (2000)
- Wittemans, V., Etude in vitro des effets de l'endothéline-1 sur des cellules cancéreuses thyroïdiennes. Mémoire biologie, FUNDP Namur (2004)
- Wu-Wong, J. R., Chiou, W. J. & Wang, J. Extracellular signal-regulated kinases are involved in the antiapoptotic effect of endothelin-1. *J Pharmacol Exp Ther*, **293**, 514-521 (2000)
- Yanagisawa, M. & Masaki, T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci*, **10**, 374-378 (1989)
- Yoshimoto, S., Ishizaki, Y., Sasaki, T. & Murota, S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke*, **22**, 378-383 (1991)