Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude in vitro des effets de l'endothéline-1 sur des cellules cancéreuses thyroïdiennes

Wittemans, Virginie

Award date:
2004

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.

Download date: 02. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

Etude in vitro des effets de l'endothéline-1 sur des cellules cancéreuses thyroïdiennes

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

Virginie WITTEMANS
Septembre 2004

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)81.72.4420
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Etude in vitro des effets de l'endothéline sur des cellules cancéreuses thyroïdiennes.

WITTEMANS Virginie

Résumé

L'endothéline (ET), en particulier la forme ET-1, peut agir comme facteur de croissance autocrine et paracrine ou comme facteur antiapoptotique dans de nombreux cancers humains. Le peptide ET-1 et son récepteur ET_A, présents dans la thyroïde normale, ont montré une surexpression dans le carcinome thyroïdien papillaire. Pour rechercher l'influence de cette molécule sur le développement des cancers thyroïdiens, la prolifération, l'apoptose et la signalisation apoptotique ont été étudiées sur une lignée cancéreuse de carcinome papillaire humain TPC1, exposée ou non à ET-1. Le système complet de l'endothéline (précurseur, enzyme de conversion et récepteur ET_A) a été détecté dans cette lignée. L'ajout de ET-1 au milieu de culture n'augmente pas la synthèse d'ADN chez ces cellules privées de sérum. Les cellules TPC1 sont sensibles à l'apoptose induite par la doxorubicine; et cet effet est partiellement inhibé en présence de ET-1 à 10nM. ET-1 provoque une élévation de calcium intracellulaire.
En conclusion, ET-1 n'induit pas de prolifération dans cette lignée de carcinome thyroïdien papillaire, mais semble agir comme facteur de résistance à l'apoptose induite par un agent chimique. Des études ultérieures pourraient déterminer avec plus de précision les mécanismes impliqués et les effets d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs à l'endothéline.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2004

Promoteur: B. Flamion

Co-promoteur: J. Mertens

En quelques mots, je tiens à exprimer ma gratitude à toutes les personnes qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

Je remercie plus particulièrement toute l'équipe du laboratoire de physiologie et pharmacologie pour leur aide et leur sympathie, mais surtout :
Un tout grand merci à B. Flamion d'avoir accepté d'être mon promoteur et de m'avoir conseillée tout au long de ce mémoire ;
Un très grand merci à ma co-promotrice J. Mertens pour son aide précieuse, sa disponibilité et sa patience ;
Un grand merci à J. Lacremans et C. Daelman pour leur aide et conseils techniques ;
Un grand merci à Cécile pour son organisation, ses coups de main et ses conseils, à Laurence pour ses avis éclairés, à Sophie et à Kris pour avoir partagé leur aide, leur bureau et leur sympathie ; et à Guy pour sa bonne humeur.
Tout cela ne serait rien sans les moments de détentes partagés autour d'un café Douwegberg!

Bien sûr merci à Philippe, mon camarade de labeur, sans qui la joie et l'humour n'auraient pas été si présents. Merci à Fanfan pour ses coups de vents salutaires et son amitié. Merci à Christian pour sa foi en moi depuis tant d'années. Merci à tous mes amis de toujours.

Je tiens aussi à remercier ma famille, et surtout mes parents, pour leur soutien moral, leur écoute leur générosité et une grande patience !
De tout mon cœur, je remercie Raphaël pour ses encouragements, son calme et sa présence soutenue dans les moments les plus difficiles.

Enfin, je dédicace ce travail à trois personnes qui resteront à jamais dans mon cœur et grâce auxquelles j'ai trouvé ma voie ; à Françoise pour son « Carpe Diem » et à Joseph et Marcelle pour toujours.

Virginie

Table des abréviations

λ	Longueur d'onde
°C	Degré Celcius
A	Ampère
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosine
CTL	Contrôle
dATP	2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytidine-5'- triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulphoxide
dNTP	deoxynucleoside triphosphate
DO	Densité optique
dTTP	2'-desoxythymidine-5'-triphosphate
ECE	Enzyme de conversion de l'endothéline
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethyleneglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N' tetraacetic acid
ERK	Extracellularly regulated kinase
ET	Endothéline
ET 1	Endothéline-1
ET_A	Récepteur A à l'endothéline
ET_B	Récepteur B à l'endothéline
FAK	Focal adhesion kinase
FBS	Foetal bovine serum
Fura-2 AM	1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-amino-benzofuran-5-oxyl]-2-(2'-amino-5'methylphenoxy)-ethane- N,N,N',N'-tetraacetic acid-pentaacétoxy-methylester
G	Guanine
GAPDH	Glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horse-radish peroxidase
IgG	ImmunoglobulineG
IHC/ICC	Immunohistochimie/cytochimie
K_d	Constante de dissociation
kDa	Kilo Dalton
LDH	Lactate déshydrogénase
M	Molaire
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Map/ERK Kinase
NAD^+	Nicotinamide adénine dinucléotide, oxydé

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, réduit
NO	Nitric Oxide
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate buffered salin
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PKB	Protéine kinase B, aussi appelée Akt
PKC	Protein kinase C
PP-ET	Pré-pro-endothéline
RF	Rnase-free
RNase	Ribonuclease
Rpm	Rotations par minute
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
T	Thymine
TAE	Tris-acetate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TGFβ	Transforming growth factor β
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amino-methane
Tris-HCl	Forme acide du tris(hydroxymethyl)-aminométhane
TSH	Thyroid stimulating hormone ou thyrotropine
U	Unités
UV	Ultraviolet
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WB	Western blots

Table des matières

1. Introduction 1

1.1. L'endothéline 1

1.1.1. Famille des endothélines 1
1.1.1.1. Types d'endothélines 1
1.1.1.2. Structure 1
1.1.1.3. Synthèse et sécrétion des endothélines 2
1.1.1.4. Régulation de la production d'endothéline 2
1.1.2. Récepteurs à l'endothéline 3
1.1.2.1. Types de récepteurs 3
1.1.2.2. Signalisation 3
1.1.3. Physiologie normale de ET-1 3
1.1.3.1. Effets vasculaires et cardiaques 4
1.1.3.2. Effets rénaux 4
1.1.3.3. Système nerveux central 5
1.1.3.4. Fonctions pulmonaires 5
1.1.3.5. Effets endocrines 5
1.1.3.6. Effets sur le développement embryonnaire 5
1.1.4. Endothéline et pathologies 5
1.1.4.1. Généralités 5
1.1.4.2. Maladies rénales 6
1.1.4.3. Maladies vasculaires 6
1.1.4.4. Maladies cardiaques 6
1.1.4.5. Hypertension pulmonaire primaire 7
1.1.4.6. Maladies vasculaires cérébrales 7
1.1.4.7. Migraine 7
1.1.4.8. Rôle dans l' inflammation 7
1.1.4.9. Ostéoarthrite 7
1.1.5. Endothéline et cancers 8
1.1.5.1. Expression de l'endothéline dans les cancers 8
1.1.5.2. Récepteurs de l'endothéline et cancers 8
1.1.5.3. Actions de l'endothéline dans le cancer 8
1.1.5.3.1. Rôle mitogénique 9
1.1.5.3.2. Rôle anti-apoptotique 9
1.1.5.3.3. Rôle angiogénique 9
1.1.5.3.4. Rôle dans la progression tumorale et les métastases 10
1.1.5.3.5. Résumé 10
1.1.5.4. Essais cliniques des antagonistes de l'endothéline dans les cancers 10

1.2. Cancers de la thyroïde 11

1.2.1. Généralités 11
1.2.2. Carcinome papillaire de la thyroïde (CPT) 11
1.2.3. Carcinome folliculaire de la thyroïde (CFT) 11
1.2.4. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT) 12
1.2.5. Endothéline et thyroïde 12

1.2.5.1. Endothéline et thyroïde normale 12
1.2.5.2. Endothéline et carcinomes thyroïdiens 12

1.3. Apoptose 13

1.3.1. L'apoptose physiologique 13
1.3.2. Mécanismes de l'apoptose 13
1.3.3. Apoptose pathologique 15
1.3.4. Caractéristiques des cellules apoptotiques 15
1.3.5. Endothéline et apoptose 15

2. But du mémoire 17

3. Matériel et méthodes 18

3.1. Culture cellulaire. 18

3.1.1. Cellules 18
3.1.2. Repiquage des cellules FTC133 et TPC1 18
3.1.2.1. Matériel 18
3.1.2.2. Méthode 18

3.2. Western Blot 19

3.2.1. Principe 19
3.2.2. Matériel 19
3.2.3. Méthode 19
3.2.3.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (méthode de Laemmli) 19
3.2.3.2. Dépôt des échantillons 19
3.2.3.3. Migration 20
3.2.3.4. Transfert semi-sec des protéines sur membrane Polyscreen® PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) 20
3.2.3.5. Coloration au rouge Ponceau 20
3.2.3.6. Saturation des sites de liaison non spécifiques des protéines 20
3.2.3.7. Ajout de l'anticorps primaire 20
3.2.3.8. Ajout de l'anticorps secondaire 20
3.2.3.9. Visualisation des protéines 21

3.3. Méthodes relatives à l'ADN et l'ARN 21

3.3.1. Extraction d'ARN 21
3.3.1.1. But 21
3.3.1.2. Matériel 21
3.3.1.3. Méthode 21
3.3.1.4. Mesure de la quantité d'ARN contenu dans l'extrait cellulaire 21
3.3.2. Electrophorèse d'ARN et d'ADN en gel d'Agarose 21
3.3.2.1. Principe 21
3.3.2.2. Matériel 22
3.3.2.3. Méthode 22

3.4. RT-PCR 22

3.4.1. Principe 22
3.4.1.1. Transcription inverse 22
3.4.1.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) 22
3.4.2. Matériel et méthode 23
3.4.2.1. Transcription inverse 23
3.4.2.2. PCR 23

3.5. Dosage de la Lactate Déshydrogénase 23

3.5.1. But de la manipulation 23
3.5.2. Matériel 24
3.5.3. Méthode 24

3.6. Test de prolifération au BrdU 24

3.6.1. Principe 24
3.6.2. Matériel 24
3.6.3. Méthode 24

3.7. Test d'exclusion au Trypan Bleu 25

3.7.1. Principe 25
3.7.2. Matériel 25
3.7.3. Méthode 25

3.8. Etude de survie cellulaire avec le test Cell Counting Kit-8 25

3.8.1. Principe 25
3.8.2. Matériel 26
3.8.3. Protocole 26

3.9. Marquage par immunocytochimie 26

3.9.1. Principe 26
3.9.2. Matériel 26
3.9.3. Méthode 26

3.10. Mesure du calcium cytosolique au spectrofluorimètre 27

3.10.1. Principe 27
3.10.2. Matériel 27
3.10.3. Méthode : 27
3.10.3.1. Chargement des cellules 27
3.10.3.2. Mesure de la fluorescence 27
3.10.3.3. Formule pour calculer le calcium intracellulaire : 28

4. Résultats 29

4.1. RT-PCR 29

4.1.1. But de l'expérience 29
4.1.2. Extraction d'ARN total 29
4.1.3. Détection des ARNm de PP-ET, ECE, ET_A et ET_B 29

4.2. Western blot pour le récepteur ET_A 31

4.3. Test de viabilité cellulaire 32

4.3.1. But de l'expérience 32
4.3.2. Résultats 32
4.3.3. Interprétation 33

4.4. Test de prolifération au BrdU 33

4.4.1. But de l'expérience 33
4.4.2. Réalisation pratique 33
4.4.3. Résultats 34
4.4.4. Commentaires 36

4.5. Test de l'apoptose par exclusion au trypan bleu 36

4.5.1. But des expériences 36
4.5.2. Effet de la doxorubicine 37
4.5.3. Effet de l'endothéline sur l'apoptose induite par la doxorubicine 38
4.5.4. Confirmation de l'effet de l'endothéline sur l'apoptose induite par la doxorubicine 39

4.6. Test de l'apoptose par analyse de fragmentation internucléosomale de l'ADN 41

4.6.1. But de l'expérience 41
4.6.2. Expérience 41
4.6.3. Résultats 41

4.7. Mesure du calcium intracellulaire 41

4.7.1. But des expériences 41
4.7.2. Résultats 41
4.7.3. Commentaires 45

4.8. Phosphorylation de Akt 45

4.8.1. But de l'expérience 45
4.8.2. Résultats du Western Blot 45
4.8.3. Résultat de l'immunocytochimie 47

5. Discussions et perspectives 49

5.1. Tests relatifs à la prolifération 49

5.1.1. Discussion 49

5.1.2. Perspectives 49

5.2. Tests relatifs à l'apoptose 50

5.2.1. Discussion 50
5.2.2. Perspectives 50

5.3. Tests relatifs à la signalisation cellulaire 50

5.4. Considérations générales 51

6. Bibliographie 53

Introduction

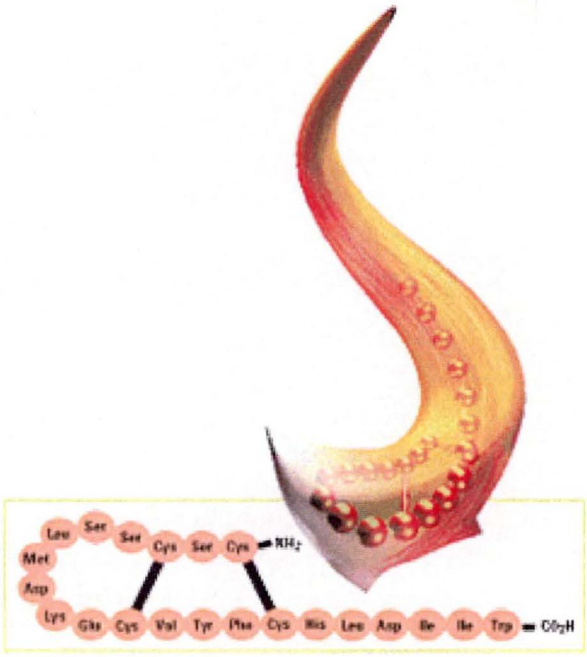


Figure 1.1. Structure de ET-1 (d'après Miyauchi *et al*, 1999 ;www.endothelinscience.COM/endothelin.cfm.).

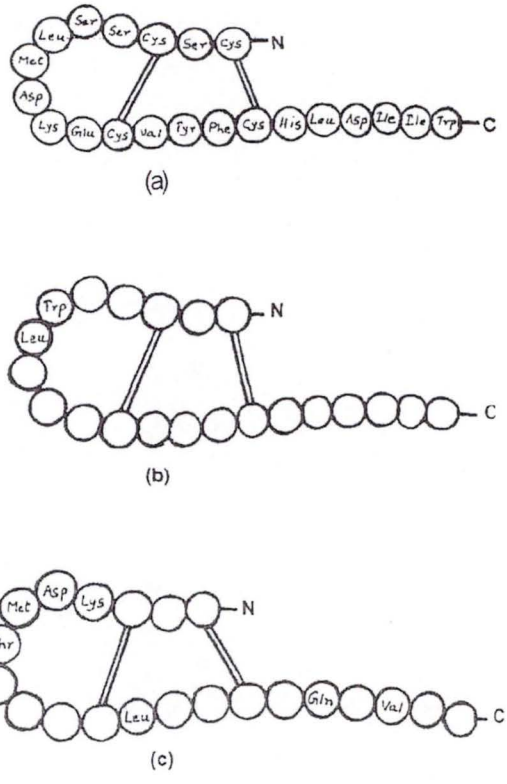


Figure 1.2. Comparaison des structures de ET-1, ET-2 et ET-3 (d'après Balakrishnan *et al*, 1997). Dans les deux dernières, seuls les acides aminés différents de ceux de ET-1 sont indiqués.

1. Introduction

1.1. L'endothéline

1.1.1. Famille des endothélines

En 1988, des chercheurs japonais ont découvert dans le milieu de culture de cellules endothéliales porcines un petit peptide de 21 acides aminés qu'ils ont isolé, séquencé, cloné et nommé endothéline-1 (ET-1). Ce peptide se révéla être un puissant vasoconstricteur (Yanagisawa *et al,* 1988). Rapidement, il est aussi apparu comme un facteur de croissance et un produit de sécrétion de nombreuses lignées de cellules cancéreuses (Kusuhara *et al,* 1990). Après détection d'ET-1 dans un modèle in vitro, sa sécrétion in vivo par l'endothélium fut confirmée. Notons que sa mise évidence in vivo est plus difficile qu'in vitro, à cause de ses concentrations extrêmement faibles et de sa sécrétion très lente. En quelques années, ET-1 et sa famille, les endothélines (ETs), sont devenus des acteurs hormonaux de premier plan en physiologie et en physiopathalogie.

1.1.1.1. Types d'endothélines

Chez les mammifères, les ETs forment une famille de trois petits peptides (ET-1, ET- 2 et ET-3) de structure fort similaire et proche de celles des sarafotoxines présentes dans le venin des vipères aspics. Les gènes qui encodent les ETs ont été localisés sur les chromosomes humains 6, 1 et 20 respectivement.
ET-1 est l'isoforme prédominante, principalement synthétisée par les cellules endothéliales. Cette isoforme est la plus puissante substance vasoconstrictrice de l'organisme humain.
ET-2 a une efficacité vasoconstrictrice similaire à ET-1 et semble être synthétisé de manière prédominante dans les reins et l'intestin, ainsi que dans le placenta, l'utérus et le myocarde (Howard *et al,* 1992 ; Firth *et al,* 1992).
ET-3 est l'isopeptide possédant le plus faible effet vasoconstricteur. ET-3 n'est pas synthétisé par les cellules endothéliales, mais il est détecté dans le plasma et dans des tissus. Sa concentration est élevée dans le cerveau. De plus, son ARNm est détectable dans le système nerveux central, les poumons, les reins, le pancréas et la rate (Howard *et al,* 1992 ; Firth *et al,* 1992 ; Haynes *et al,* 1993).

Si les cellules endothéliales vasculaires sont la principale source d'endothéline, d'où le nom du peptide, ce dernier est aussi produit par une large variété de cellules dont l'épithélium tubulaire rénal, le mésangium glomérulaire, les myocytes cardiaques, les cellules gliales, les cellules de l'hypophyse, les hépatocytes, les macrophages, les mastocytes, ainsi que des cellules cancéreuses (Haynes *et al,* 1993).

1.1.1.2. Structure

Chaque isoforme de ET possède 21 acides aminés dont 15 en une boucle fermée par deux ponts disulfure **(Figure 1.1).** Ceci leur confère une structure rigide apparemment nécessaire pour les actions des ETs. En effet, modifier la position des ponts et du domaine C-terminal provoque une perte importante de l'activité biologique des isopeptides (Randall *et al,* 1989). ET-1 a un poids moléculaire de 2492 daltons ; ET-2 en diffère par 2 acides aminés et ET-3 par 6 acides aminés **(Figure 1.2).**

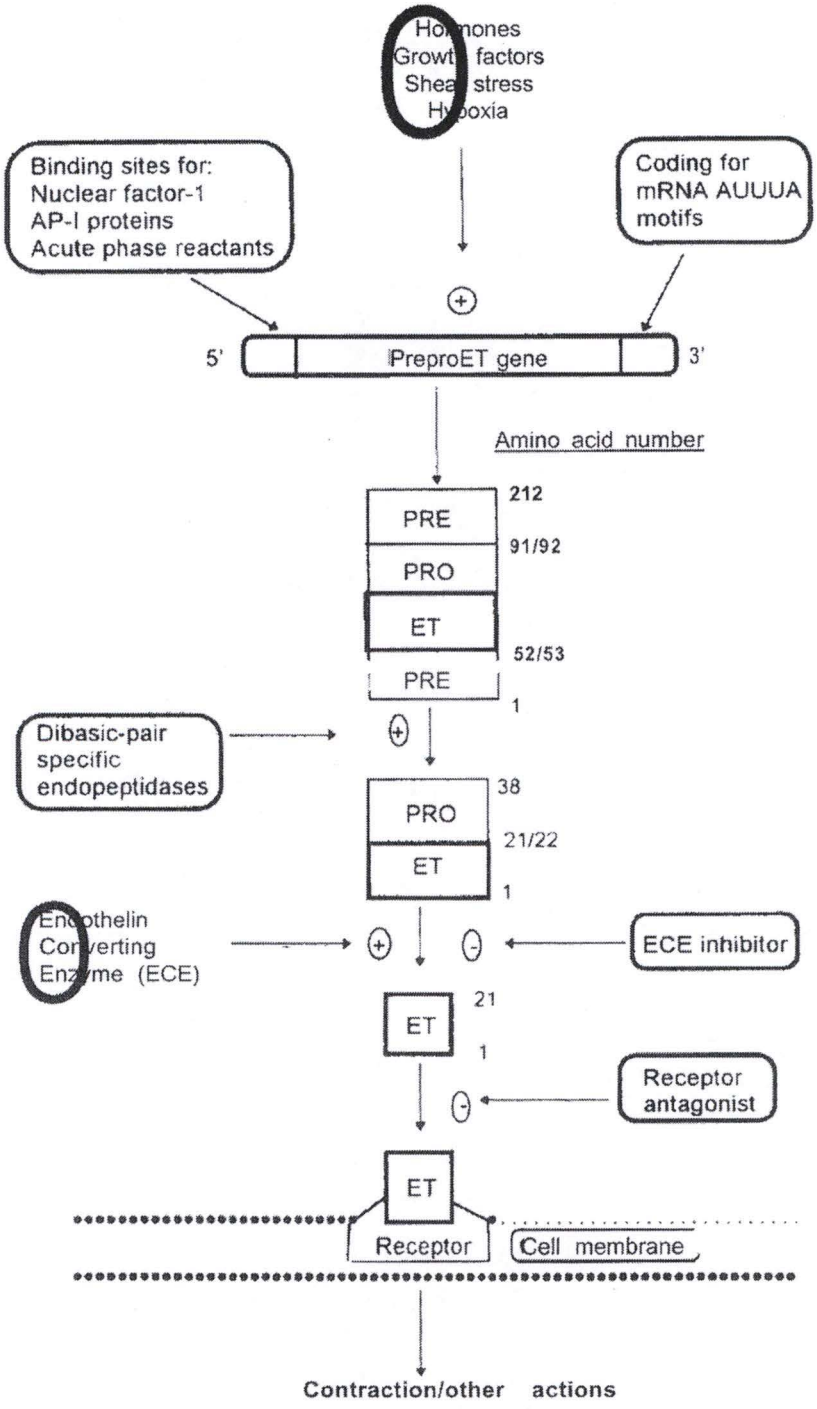


Figure 1.3. Biosynthèse de ET-1 (d'après Balakrishnan *et al,* 1997).

1.1.1.3. Synthèse et sécrétion des endothélines

Le gène de ET-1 humain code pour une pré-pro-endothéline de 212 acides aminés soumise à un processing qui n'est pas complètement élucidé (**Figure 1.3**).
La synthèse de ET dans les cellules endothéliales humaines se fait comme suit : la pré-pro-endothéline est clivée par une protéase en des pro-endothélines de 39 acides aminés (ou « big endothélines ») biologiquement inactives.
Ensuite, la génération de ET active est réalisée par un clivage enzymatique de la pro-endothéline. Ce passage à la forme mature se fait par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE).
Jusqu'à prèsent, deux types de ECE ont été identifiés: ECE-1 et ECE-2. ECE-1 est une métalloprotéase dont au moins quatre isoformes liée à la membrane ou intracellulaires ont été caractérisées. Elle clive la pro-endothéline extracellulaire et intracellulaire en ET-1 à pH neutre ; elle est donc reliée aux endopeptidases « neutres ». Quant à ECE-2, elle possède un optimum d'activité à pH acide ; elle agit probablement comme une enzyme intracellulaire sur l'endothéline endogène synthétisée dans le Golgi où le pH est acide.

ET-1 est sécrété par voie constitutive, mais de récentes expériences suggèrent que dans certaines cellules l'endothéline peut être sécrétée par une voie régulée via des granules sécrétoires. La libération continue de ET-1 par les cellules endothéliales produit une vasoconstriction intense de la couche musculaire lisse sous-jacente et le maintien du tonus vasculaire endogène. ET-1 est aussi libéré par des granules de stockage spécifiques des cellules endothéliales (corps de Weibel-Palade) en réponse à des stimuli physiologiques ou peut-être pathologiques.Ainsi ET-1 fonctionne davantage comme une hormone paracrine plutôt que circulante. Les concentrations plasmatiques de ET sont très variables et comprennent généralement 65% de big-ET-1, 25% de ET-1 et 10% de ET-3. Aucune trace de ET-2 n'est retrouvée dans le plasma.

1.1.1.4. Régulation de la production d'endothéline

La sécrétion de ET est stimulée par une grande variété de substances, parmi lesquelles les catécholamines, la thrombine, l'angiotensine, l'arginine vasopressine (AVP), des lipoprotéines de haute et de faible densité, le TGFβ, l'insuline et plusieurs cytokines (**Figure 1.4**). L'hypoxie et l'ischémie sont d'importants stimuli physiologiques pour la production de ET-1.
L'inhibition de la production de ET-1 est réalisée par diverses substances vasoactives comme l'oxyde nitrique (NO), le peptide auriculaire natriurétique (ANP), les prostacyclines et la prostaglandine E2. Inversement, ET-1 stimule la sécrétion du NO, de l'AVP, de l'ANP, de l'aldostérone et des prostaglandines. Au vu des ces interactions, il apparaît que les ETs participent de façon dynamique au contrôle hormonal de la balance hydrosodée et au tonus vasculaire.

De plus, puisque les ETs sont de puissants peptides régulateurs, il semble évident que les concentrations locales et circulantes doivent être fortement contrôlées. Cette régulation passe par des mécanismes tels que le clivage par les endopeptidases neutres, la dégradation par les lysosomes, et la recapture de ET circulante dans les poumons.

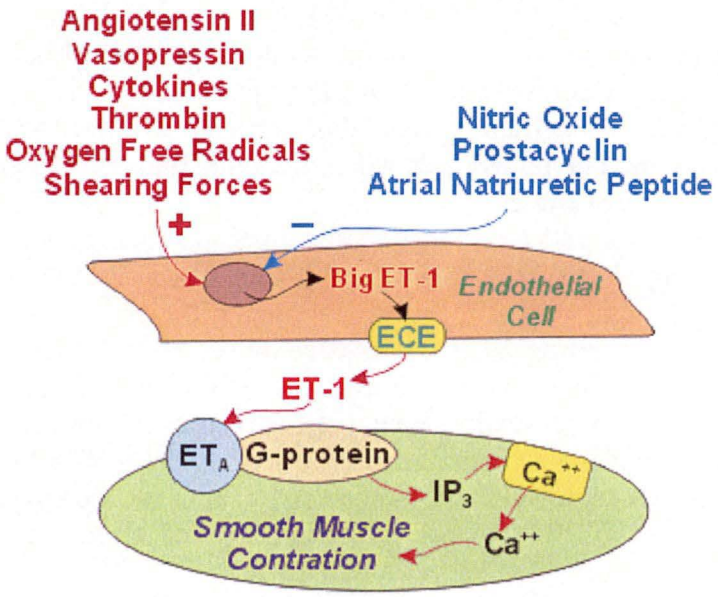


Figure 1.4. Régulation de la production d'ET-1 dans les cellules musculaires lisses (d'après Richard E. Klabunde ; www.oucom.ohiou.edu/CVPhysiology/BF012.htm)

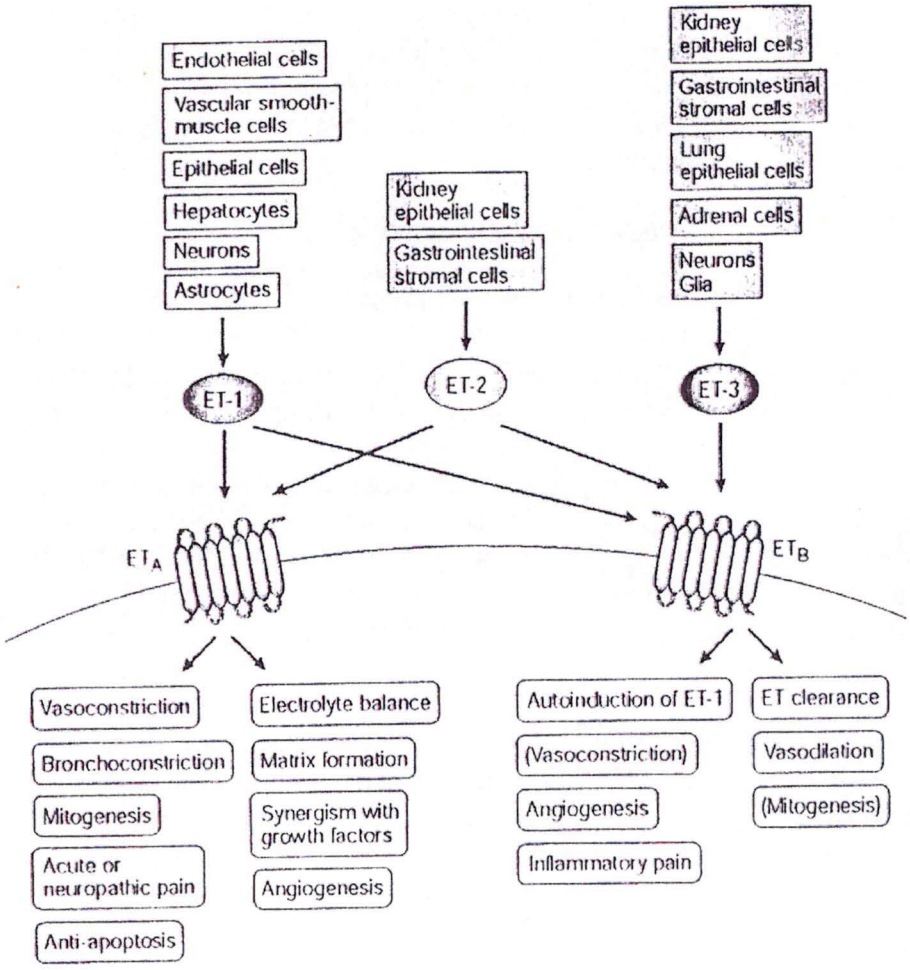


Figure 1.5. Les récepteurs de ET, leur localisation et leurs effets (d'après Nelson *et al,* 2003). Les effets entre parenthèse sont ceux rarement rencontrés avec ET_B.

1.1.2. Récepteurs à l'endothéline

1.1.2.1. Types de récepteurs

Dans les tissus humains, les ETs exercent leurs effets en se liant à leurs récepteurs, ET_A et ET_B, tous deux couplés aux protéines G. Plusieurs types de protéines G ont été impliquées, mais Gq est la forme prédominante. Ces récepteurs sont largement exprimés dans tous les tissus humains conformément au rôle physiologique des ETs (Kedzierski *et al,* 2001).
Le récepteur ET_A est principalement présent dans les muscles lisses vasculaires et le muscle cardiaque ; il participe à la vasoconstriction (Filep *et al,* 1995) et à l'inflammation (Filep *et al,* 1995). Il possède une affinité dix fois plus grande pour ET-1 ou ET-2 que pour ET-3.
Le récepteur ET_B lie les trois isoformes avec la même affinité. Il est exprimé de manière prédominante sur la membrane des cellules endothéliales, et de manière très importante à travers tout le rein, le foie et l'utérus. Ce récepteur est aussi le plus abondant dans le cerveau où il est principalement localisé sur les astrocytes. Bien qu'intervenant aussi dans la vasoconstriction, la liaison au récepteur ET_B entraîne en premier lieu une vasodilatation transitoire liée au NO. De plus, si la forme circulante de ET-1 est rapidement enlevée du plasma, ceci serait grâce au récepteur ET_B. En effet, ce récepteur prend part à la clearance de ET-1 en conditions normales et pathologiques. Une des hypothèses avancée pour cette clearance est l'adressage de ET_B vers les lysosomes (Bremnes *et al,* 2000).

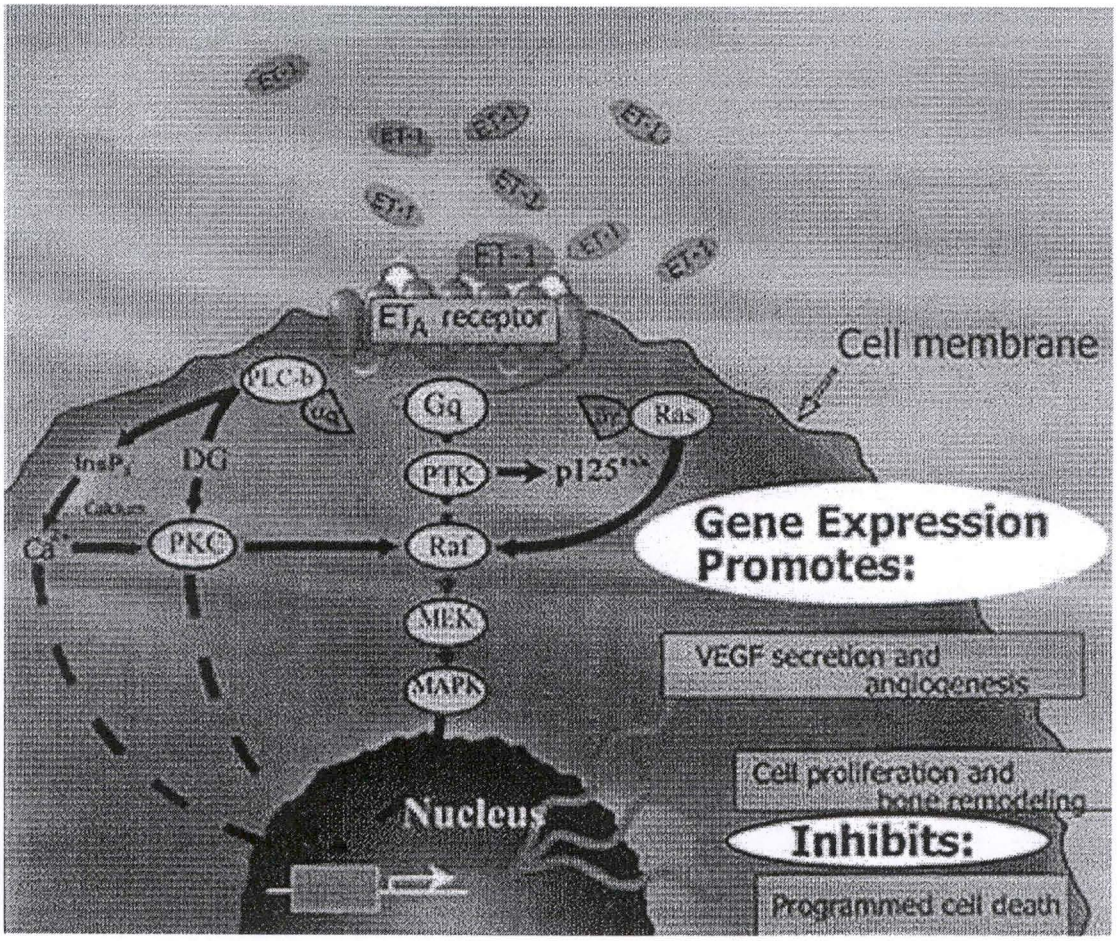
Les interactions des différentes ETs avec leurs récepteurs déclenchent des processus fondamentaux de différenciation, de réparation et de croissance tissulaire qui sont résumés à la **Figure 1.5.**

1.1.2.2. Signalisation

Les signaux intracellulaires induits par la liaison de ET au récepteur ET_A **(Figure 1.6)** aboutissent à l'activation de la phospholipase C, qui produit de l'inositol triphosphate et du diacylglycérol membranaire. L'inositol triphosphate libère le calcium de ses stocks intracellulaires; calcium et diacylglycérol contribuent à l'activation de la protéine kinase C (PKC), ainsi qu'à une activation de protéines tyrosines kinases (PTKs) et de Ras qui aura pour conséquence d'enclencher la voie Raf/MEK/MAKP.
Ainsi, les activations de PKC et MAPK induiront la transcription de différents gènes dont des proto-oncogènes.
De plus, ET-1 active la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui elle-même active Akt. Cette voie participe au rôle anti-apoptotique de ET-1. Enfin, ET-1 participe aussi à la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines cellulaires parmi lesquelles $p125^{FAK}$ et p42.
Les mécanismes de signalisation diffèrent quelque peu entre les récepteurs ET_A et ET_B.

1.1.3. Physiologie normale de ET-1

Les ETs sont des peptides hormonaux d'une extrême diversité d'actions dont les rôles sont paracrines, autocrines et endocrines, ce qui complique leur étude.
Beaucoup d'effets paracrines ont été décrits : les ETs jouent le rôle de facteurs de croissance et de neurotransmetteurs. Elles seraient de puissants mitogènes *(voir pathologie)*. Les effets autocrines comportent également des actions mitogènes, par exemple sur les cellules mésangiales ou les myocytes qui sécrètent des ETs et y répondent.


ET-1
ET-1
ET-1

Les effets endocrines de ET-1 (probablement d'origine endothéliale dans ce cas) sont suggérés par les observations suivantes : les taux circulants de ET-1 s'élèvent de deux à cinq fois dans certaines conditions physiologiques extrêmes telles que la haute altitude, et dans de nombreuses situations pathologiques.

1.1.3.1. Effets vasculaires et cardiaques

ET-1 est la substance endogène la plus vasoconstrictrice de l'organisme ; mole à mole, elle est dix fois plus puissante que l'angiotensine-II et cent fois plus que la noradrénaline. Ses principaux effets biologiques sont liés aux récepteurs ET_A. Les deux effets cardiovasculaires les plus importants sont la vasoconstriction et des effets mitogènes.
La vasoconstriction est connue depuis longtemps : elle est démontrée notamment par la perfusion de doses croissantes de ET chez des animaux (Donckier *et al,* 1991). On constate une légère hypotension suivie d'hypertension. L'hypotension résulte de la stimulation des récepteurs ET_B localisés sur les cellules endothéliales, car ceux-ci ont pour conséquence une vasodilatation via la libération de NO et de prostacycline. L'hypertension quant à elle provient de l'activation des récepteurs ET_A à effet vasoconstricteur.

Une inhibition des ECE ou des récepteurs ET_A dans les vaisseaux des avant-bras de volontaires humains sains augmente partiellement le flux sanguin, suggérant que la génération de ET-1 endogène contribue au maintien du tonus vasculaire basal chez des êtres humains en bonne santé (Haynes *et al,* 1994). On sait maintenant qu'en conditions normales, les cellules endothéliales produisent une quantité constante de ET-1 qui contribue au maintien du tonus vasculaire. Ce tonus résulte d'un équilibre entre les substances vasoconstrictrices (principalement ET-1 et thromboxane) et les vasodilatatrices (NO et prostacycline).

D'autres expériences sur des sujets humains en bonne santé ont prouvé que l'administration de faibles doses de ET-1 produit une modeste élévation de la pression sanguine, une veinoconstriction et une augmentation de l'action d'autres vasoconstricteurs ainsi que des mécanismes neuroendocrines. Par exemple, ET-1 augmente la conversion d'angiotensine-I en angiotensine-II et la synthèse d'adrénaline et d'aldostérone par les glandes surrénaliennes. En conséquence, la sécrétion endothéliale de ET-1 et l'activation de l'axe rénine-angiotensine-aldostérone peuvent se potentialiser mutuellement et augmenter en synergie la vasoconstriction.

Ainsi ET-1 est un puissant vasoconstricteur à effet long pour le maintien du tonus vasomoteur et de la pression artérielle.

Sur le coeur, ET-1 possède des effets mitogènes responsables d'une hypertrophie des parois myocardiques ainsi que des effets inotropes et chronotropes positifs. Dans certaines conditions, ET-1 induit une prolifération vasculaire notamment par ses actions mitogènes sur les fibroblastes de la média.

1.1.3.2. Effets rénaux

Les vaisseaux rénaux sont environ dix fois plus sensibles aux effets vasoconstricteurs de ET-1 que les autres lits vasculaires.
ET-1 touche à la fois les artérioles afférentes et efférentes (Edwards *et al,* 1990) ; il diminue ainsi la filtration glomérulaire et le débit plasmatique rénal.
Une injection intraveineuse de faibles doses de ET-1 a un effet anti-natriurétique sans changement significatif du flux plasmatique rénal ou de la filtration glomérulaire. Donc, en

situation normale, ET-1 n'est pas un régulateur important de l'hémodynamique rénale. Mais ce peptide joue un rôle étiologique important dans la décompensation rénale causée par l'ischémie réno-vasculaire (Chan *et al,* 1994). ET-1 libère aussi des prostaglandines à effet vasodilatateur qui évitent une ischémie rénale excessive.

1.1.3.3. Système nerveux central

ET-1, et encore plus ET-3, ainsi que les récepteurs ET sont présents à travers tout le cerveau. Les peptides sont produits dès les premières étapes de la vie fœtale et jouent un rôle dans le développement du cerveau. ET-1 et ET-3 sont connus pour activer le transporteur sodium-potassium-chlore des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Cet effet participe au maintien d'un environnement pauvre en potassium dans le système nerveux central, élément important pour permettre la dépolarisation des neurones et la conduction des impulsions nerveuses entre les neurones.
ET-1 augmente la pression sanguine par la stimulation du système nerveux central sympathique et par la production de vasopressine.

1.1.3.4. Fonctions pulmonaires

ET-1 induit une bronchoconstriction in vivo. Celle-ci semble être due à la stimulation de la production de thromboxane qui active les cellules musculaires lisses des bronches.

1.1.3.5. Effets endocrines

ET-1 augmente la conversion de l'angiotensine-I en angiotensine-II, et augmente la synthèse par la glande surrénale aussi bien d'adrénaline que d'aldostérone.
Chez le rat, ET-3 stimule l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien en augmentant la libération de CRH (corticotrophin releasing hormone) et d'ACTH (adrenocorticotrophic hormone) ; la production des corticostéroïdes s'accroît.
ET-1 stimule aussi la sécrétion de diverses hormones de l'hypophyse (Lovin 1995). ET-1 stimule la production de l'ANP dans des cultures de myocytes de l'oreillette et in vivo.

1.1.3.6. Effets sur le développement embryonnaire

On a remarqué que ET-1 est impliqué dans la fermeture du canal artériel à la naissance.
D'autres données montrent que des souris homozygotes déficientes en ET-1 présentent de graves malformations des tissus cranio-faciaux dérivant du premier arc pharyngial et meurent de déficience respiratoire à la naissance (Balakrishnan *et al,* 1997).
De plus, des données impliquent ET-1 dans la différenciation et le développement des tissus dérivant des crêtes neurales embryonnaires. Une forme héréditaire de la maladie de Hirschsprung chez l'homme est associée à une mutation du gène du récepteur ET_B (Balakrishnan *et al,* 1997).

1.1.4. Endothéline et pathologies

1.1.4.1. Généralités

Depuis la découverte des ETs, de nombreuses preuves se sont accumulées non seulement vis-à-vis de la vasoconstriction qu'elles induisent, mais aussi en faveur de leur rôle de mitogènes et de médiateurs inflammatoires. Par ces trois effets, ET est impliquée dans de nombreuses pathologies, telles que l'hypertension, l'athéromatose, l'insuffisance rénale, les vasospasmes

cérébraux et les maladies coronaires entre autres (Rubanyi *et al,* 1994). Les effets mitogéniques ont été démontrés d'une part dans les cellules normales (telles que les cellules musculaires lisses vasculaires, les cellules mésangiales, les fibroblastes) et d'autre part dans des lignées cellulaires cancéreuses.
Puisque ET voit son expression augmentée dans de nombreux cancers (prostate, ovaires, colon, etc), il est intéressant d'en comprendre les mécanismes afin d'envisager de recourir à un traitement par antagonistes (Grant *et al,* 2003).

1.1.4.2. Maladies rénales

Beaucoup d'études ont montré que ET-1 joue un rôle dans la pathogenèse de l'insuffisance rénale aiguë après une ischémie rénale ; par exemple, des niveaux plasmatiques augmentés de ET-1 ont été observés chez des patients en insuffisance rénale aiguë.
La néphrotoxicité à la cyclosporine (un immunosuppresseur) est occasionnée en partie par une production augmentée de ET-1. La cyclosporine est toxique pour les vaisseaux rénaux ; ceux-ci, lésés, libèrent ET-1. La cyclosporine augmente aussi la densité des récepteurs rénaux à ET-1 et l'excrétion de ET dans l'urine.
De plus, certaines formes de décompensation rénale induites expérimentalement peuvent être prévenues par un pré-traitement avec des antagonistes aux récepteurs ET_A (Chan *et al,* 1994).

1.1.4.3. Maladies vasculaires

Dans les modèles expérimentaux, ET-1 produit une puissante vasoconstriction et une élévation prolongée de la pression sanguine pouvant aller jusqu'à l'hypertension véritable. Mais les relations entre les taux plasmatiques de ET-1 et la sévérité de l'hypertension n'est pas aussi simple chez les êtres humains: en effet dans la plupart des études, les taux de ET circulante sont normaux chez des patients hypertendus.
La réponse vasoconstrictrice à ET est plus forte dans les vaisseaux athérosclérosés, peut-être à cause de leur incapacité à augmenter leur production de NO. Notons que l'athérosclérose est un risque majeur pour l'infarctus du myocarde.

1.1.4.4. Maladies cardiaques

Des taux plasmatiques augmentés de ET-1 ont été découverts sur des modèles animaux de défaillance cardiaque chronique, ainsi que chez les patients atteints de cette maladie. Chez les malades, ces taux élevés sont fortement corrélés avec le degré de diminution de la fonction cardiaque. Ainsi, les taux les plus élevés prédisent une plus grande probabilité de décès ou de besoin de transplantation.
Dans la défaillance cardiaque, la production de ET-1 par les cellules endothéliales vasculaires est augmentée par l'angiotensine II, la vasopressine, la noradrénaline et par des facteurs mécaniques comme les forces de cisaillement.

Dans des études humaines, les taux plasmatiques de ET-1 et de big ET-1 sont augmentés dans les infarctus graves du myocarde. Les plus hauts taux de ET-1 présagent les plus mauvais pronostics. En utilisant différents outils pharmacologiques (anticorps monoclonaux, inhibiteur de ECE ou antagonistes de ET_A) qui bloquent les actions biologiques de ET-1, l'ischémie myocardique s'est vue réduite dans des modèles expérimentaux animaux. Cette réduction s'est faite aussi bien en terme de la taille finale de l'infarctus que d'une amélioration de la performance du myocarde et du flux coronaire (Pernow *et al,* 1997).

1.1.4.5. Hypertension pulmonaire primaire

Dans l'hypertension pulmonaire primaire, il y a prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et dommage endothélial. Il a été observé que selon l'état du tonus vasomoteur, les isopeptides de ET peuvent causer soit une vasodilatation pulmonaire soit une vasoconstriction. La réponse constrictive passe par les récepteurs ET_A, tandis que la vasodilatation se fait par les récepteurs ET_B.
ET-1 stimule aussi la synthèse d'ADN et la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires.
Le premier antagoniste de ET qui est utilisé en thérapeutique humaine, le bosentan, a reçu comme indication l'hypertension pulmonaire primaire.

1.1.4.6. Maladies vasculaires cérébrales

ET-1 joue un rôle dans l'apparition de vasospames qui suivent les hémorragies sous-arachnoïdiennes. Ceci est vérifié dans les modèles expérimentaux, où les taux de ET-1 se trouvent augmentés, et où l'injection de ET-1 exogène reproduit ces vasospasmes. Les antagonistes des récepteurs ET_A réduisent les vasospames (Clozel *et al,* 1993). On constate aussi une élévation des taux plasmatiques de ET-1 chez des patients juste après une hémorragie sous arachnoïdienne, et les taux les plus hauts sont atteints chez des malades qui développent des vasospasmes.
Les concentrations plasmatiques de ET-1 s'élèvent de manière très marquée après un infarctus ischémique cérébral aigu.
Les antagonistes ET_A ont montré leur utilité contre la dégénérescence neuronale induite par l'ischémie cérébrale et ce dans de nombreuses études (Rubanyi *et al,* 1994).

1.1.4.7. Migraine

Des taux élevés de ET ont été observés pendant les céphalées migraineuses (Clozel *et al,* 1993). La vasoconstriction associée à la première phase de la migraine pourrait être attribuée en partie à la libération de substances vasoconstrictrices telles que les ETs.

1.1.4.8. Rôle dans l' inflammation

Des études dévoilent le rôle de ET-1 dans le processus inflammatoire, par exemple dans certaines formes de cardiomyopathies chez la souris et chez l'homme, dans les maladies pulmonaires (Teder & Noble, 2000), la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse (Murch *et al,* 1992), et la thyroïdite d'Hashimoto (Donckier *et al,* 2003).
Dans ce dernier cas, les cellules immunes produisent des cytokines qui sont connues pour stimuler l'expression de la pré-pro-endothéline et pourraient ainsi induire la production de ET-1 par les cellules thyroïdiennes. ET-1 pourrait alors fonctionner comme un agent pro-inflammatoire et stimuler la libération de nombreuses autres cytokines telles que l'interleukine-1 (Teder & Noble, 2000).

1.1.4.9. Ostéoarthrite

ET-1 exerce un rôle catabolique dans les cartilages en cas d'ostéoarthrite via l'augmentation des métalloprotéases matricielles MMP-1 et MMP-13. L'équilibre est ainsi déplacé vers une dégradation accrue du collagène.

1.1.5. Endothéline et cancers

Dès le début, ET a été soupçonnée comme agent favorisant la progression de plusieurs types de cancers. Dans ce contexte, les travaux les plus marquants ont été réalisés dans les tumeurs de la prostate comme le souligne un article princeps de 1995 (Nelson *et al*, 1995).

1.1.5.1. Expression de l'endothéline dans les cancers

Des taux plasmatiques élevés de ET-1 ont été mis en évidence chez des patients présentant des tumeurs solides graves telles que les tumeurs hépatocellulaires (Nakamuta *et al*, 1993), les cancers gastriques (Ferrari-Bravo *et al,* 2000), les cancers primaires du colon (Shankar *et al*, 1998) et de la prostate (Nelson *et al,* 1995). Il est à noter que ce sont les cancers avec métastases qui présentent les taux sanguins de ET-1 les plus élevés.
En ce qui concerne les lignées cellulaires, beaucoup de lignées cancéreuses humaines synthétisent ET-1 in vitro ; citons les lignées cancéreuses du colon, du sein, de l'estomac, de la prostate et celles du glioblastome.
In vivo, une immunoréactivité plus élevée à ET-1 dans les tissus pathologiques par rapport aux tissus normaux a été montrée dans de nombreux types de cancers, notamment le carcinome ovarien (Bagnato *et al*, 1999), le cancer du sein (Yamashita *et al,* 1991 ; Alanen *et al,* 2000), le cancer hépatocellulaire (Suzuki *et al,* 1998).

D'autres études ont permis de souligner un changement dans l'expression des composants du système ET lorsque le tissu débute sa transformation néoplasique.
Ainsi, la RT-PCR a mis à jour une augmentation de l'expression des ARNm de la pré-pro-ET-1 et de l'ECE dans les adénomes colorectaux par rapport au colon normal (Egidy *et al*, 2000a).
Le fait que les pathologies invasives et métastasiques soient plus riches en ET que le tissu sain suggère un rôle du système ET dans les étapes précoces de la tumorigenèse.

1.1.5.2. Récepteurs de l'endothéline et cancers

Une des questions qui vient naturellement à l'esprit est celle de l'implication des différents types de récepteurs dans le cancer.
Le rôle du récepteur ET_A semble prédominant puisque plusieurs travaux ont rapporté une augmentation de son expression notamment dans les cancers colorectal, ovarien et prostatique. En outre, ces niveaux d'expression élevés ont été corrélés avec la présence de métastases (Gohji *et al,* 2001).
Les tissus normaux qui expriment davantage de récepteurs ET_B voient plutôt une expression supérieure du récepteur ET_A lorsqu'ils se transforment en tumeurs, qu'elles soient primaires ou métastasiques. De manière intéressante, une relative hyperméthylation du gène ET_B a été prouvée dans plusieurs lignées cancéreuses de la prostate, de la vessie et du colon (Pao *et al,* 2001). Ceci serait un mécanisme plausible pour expliquer l'expression réduite de ET_B dans les tissus malins.

1.1.5.3. Actions de l'endothéline dans le cancer

Actuellement, les arguments sont en faveur du rôle « pro-cancéreux » de ET-1. Cela nous est suggéré par ses effets sur la mitogenèse, l'apoptose, l'angiogenèse, l'invasion tumorale et le développement des métastases.

1.1.5.3.1. Rôle mitogénique

La stimulation de la croissance cellulaire par ET-1 est observée dans plusieurs lignées cancéreuses humaines in vitro (lignées colorectale, ovarienne, prostatique, du sarcome de Kaposi et du mélanome). Certains chercheurs ont prouvé que ces effets mitogéniques sont réalisés par l'intermédiaire du récepteur ET_A (Nelson *et al,* 1996 ; Bagnato *et al,* 1995; Ali *et al,* 2000). Conformément, les antagonistes spécifiques du récepteur ET_A ont des effets inhibiteurs sur la croissance cellulaire tumorale (Ali *et al,* 2000), et montrent une certaine efficacité clinique, dans le cancer de la prostate par exemple (Carducci *et al,* 2002).
En revanche, la croissance des tumeurs non-épithéliales ne semble pas dépendante du récepteur ET_A.
Très peu d'études ont montré un effet mitogénique via le récepteur ET_B excepté dans les cellules musculaires lisses de la prostate humaine (Saita *et al,* 1998) et dans le mélanome (Kikuchi *et al,* 1996).

Les mécanismes sous-jacents à la mitogenèse induite par ET-1 impliquent l'activation de multiples voies de transcription et une action synergique avec des facteurs de croissance tels que les TGF β et α, l'EGF, le PDGF ou l'insuline (Battistini *et al,* 1993 ; Bagnato *et al,* 1997). ET-1 peut aussi activer la transcription des protooncogènes c-fos et c-myc (Komuro *et al,* 1998).
ET-1 agit comme facteur mitogène autocrine dans certaines lignées cancéreuses humaines et comme facteur mitogène paracrine dans d'autres. Ainsi, dans le cancer ovarien, ET-1, fabriqué par les cellules tumorales, stimule la croissance du stroma.

1.1.5.3.2. Rôle anti-apoptotique

La prolifération et l'apoptose sont deux points importants qui déterminent la progression tumorale. Dans ce contexte, le rôle de ET-1 a été évalué dans la régulation de l'apoptose.
De très nombreuses preuves se sont accumulées pour témoigner d'un rôle anti-apoptotique de ET-1 (Vacca *et al,* 2000 ; Filippatos *et al,* 2001 ; Wu Wong *et al,* 1997 ; Wu Wong *et al,* 2000 ; Shichiri *et al,* 1997 ; Peduto Eberl *et al,* 2000). En protégeant les cellules de l'apoptose, ET-1 favorise la croissance des cellules tumorales qui ne sont dès lors plus éliminées par l'organisme.

1.1.5.3.3. Rôle angiogénique

Favoriser le développement des néo-vaisseaux contribue grandement à l'invasion des tumeurs. Il semble que ET-1 agisse également dans ce sens.
Prenons l'exemple de l'influence de ET-1 sur le VEGF (vascular endothelial growth factor) : ET-1 augmente indirectement la prolifération des cellules endothéliales en stimulation la production de VEGF par d'autres types cellulaires (Pedram *et al,* 1997 ; Salani *et al,* 2000a). Inversement, dans les cellules endothéliales, le VEGF augmente à son tour l'expression des ARN_m de ET-1, donc sa sécrétion (Matsuura *et al,* 1998).

In vitro, ET-1 a révélé sa capacité à accroître l'effet de plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que le PDGF et le VEGF (Yang *et al,* 1999 ; Pedram *et al,* 1997).
Toujours in vitro, Salani et ses collègues (2000b) ont découvert que ET stimule l'invasion et la différenciation morphologique des cellules de la veine ombilicale humaine (HUVEC) cultivées sur des matrices artificielles. Ces effets seraient probablement liés à la capacité qu'a ET-1 d'induire la production par les cellules endothéliales de métalloprotéases matricielles, surtout MMP-2.

Tableau 1.1. Molécules antagonistes à ET-1 en développement. (d'après Nelson *et al*, 2003)

Nom	Compagnie	Phase	Indication	Mode d' administration	Type
Pour le cancer					
Atrasentan	Abbott	III	Prostate	Oral	ET_A
		II	Types multiples de tumeur		
YM 598	Yamanouchi	II	Prostate	Oral	ET_A
AZD 4054	AstraZeneca	II	Prostate	Oral	ET_A
Pour les autres maladies					
Bosentan (Tracleer ®)	Actelion	Commerciali-sation	Hypertension pulmonaire	Oral	ET_A/ET_B
Tezosentan (Veleri)	Actelion/ Genetech	II	Hypertension	IV/Oral	ET_A/ET_B
J104132	Banyu/Merck	II	Hypertension, DC	Oral	ET_A/ET_B
Sitaxsentan	ICOS Texas Biotech	II	DC	IV/Oral	ET_A
Ambrisentan	Myogen	II	Maladies cardiovasculaires et rénales	Oral	ET_A
SPP 301	Sppeedel Development	II	Maladies cardiovasculaires	Oral	ET_A
Edonentan	Bristol Myers Squibb	II	DC	Oral	ET_A
S0139	Shionogi	II	DC	Oral	ET_A

IV=intraveineuse ; DC= Décompensation cardiaque

In vivo, l'action combinée de ET-1 et du VEGF stimule l'angiogenèse chez la souris. Chez le rat, dans un modèle cornéen, la stimulation par ET-1 seule produit un résultat similaire à celle induite par le VEGF. Dans ce même modèle, cette angiogenèse est inhibée par ajout soit d'antagonistes mixtes soit d'antagonistes spécifiques du récepteur ET_A mais aussi par des inhibiteurs de ECE. Cela renforce l'idée que ET-1 puisse être un important régulateur de l'angiogenèse cancéreuse.

1.1.5.3.4. Rôle dans la progression tumorale et les métastases

Récemment, Bagnato et son équipe ont prouvé que dans des lignées cellulaires humaines de carcinome ovarien, ET-1 peut augmenter l'expression de plusieurs MMP, en particulier de MMP-2 et de MMP-9, et diminue celle des inhibiteurs tissulaires (TIMP) de ces métalloprotéases matricielles (Rosano *et al,* 2001). En détruisant la matrice, les tumeurs se frayent un chemin dans les tissus, ce qui facilite leur invasion.

Quant aux métastases, ET-1 est connue pour avoir des effets sur les métastases osseuses essentiellement. ET-1 peut moduler la croissance de celles-ci au départ d'une tumeur primaire prostatique. Des expériences sur des lignées cancéreuses prostatiques attestent ce phénomène en montrant que la production de ET-1 est augmentée par contact des cellules cancéreuses avec l'os, mais surtout que l'effet de ET-1 sur l'os est d'inhiber toute résorption par les ostéoclastes (Chiao *et al,* 2000). Ceci induit des métastases ostéocondensantes.
Shankar et ses collaborateurs ont quant à eux mis en évidence une forte immunoréactivité à ET-1 dans des cellules endothéliales à l'intérieur de métastases hépatiques en provenance du colon (Shankar et al, 1998). ET- 1 pourrait donc être impliquée dans la modulation du flux sanguin, qui est connu pour être altéré dans les métastases hépatiques.

1.1.5.3.5. Résumé

Comme nous pouvons le constater, les composants du système ET sont modifiés dans le cadre de maladies cancéreuses. Ces changements divers paraissent aider à la croissance et à la progression tumorale. De ces observations, il découle que l'usage d'antagonistes des récepteurs ET_A pourrait être indiqué pour ralentir le développement tumoral (Grant *et al,* 2003).

1.1.5.4. Essais cliniques des antagonistes de l'endothéline dans les cancers

Le rôle de ET-1 dans les maladies rénales et cardio-vasculaires a conduit à l'idée du développement d'antagonistes spécifiques ou mixtes des récepteurs ET_A et ET_B (Remuzzi *et al,* 2002).
Ces produits à visée médicamenteuse, dont le nom commun comprend le suffixe « -sentan », portent de nombreux espoirs dans la thérapie anti-cancéreuse. Les principaux sont indiqués dans le **Tableau 1.1.**
Le premier antagoniste non peptidique à atteindre le stade de commercialisation est l'inhibiteur mixte bosentan développé par la firme Actelion en Suisse. Son activité bénéfique a été prouvée dans l'hypertension pulmonaire, et il est commercialisé sous le nom de Tracleer® dans cette indication. Le bosentan a aussi montré des effets favorables dans l'insuffisance cardiaque, les maladies des artères coronaires, les vasospasmes cérébraux et d'autres pathologies (Dupuis, 2001).
A l'heure actuelle, hormis le Tracleer®, toutes les autres molécules sont en phase II ou III d'études cliniques.

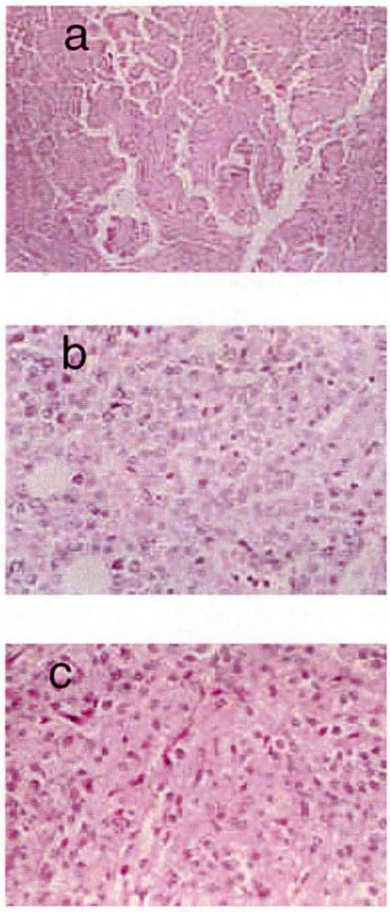


Figure 1.7. Coupes histologiques de carcinomes thyroïdiens : a) carcinome papillaire, b) carcinome folliculaire, c) carcinome médullaire. (www.swissmed.ch/dossiers/nst/NST14.htm)

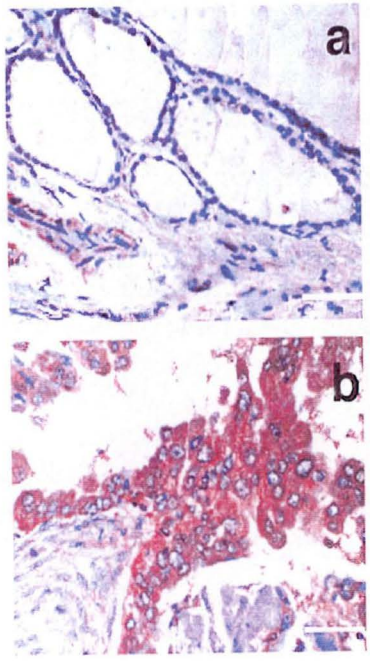


Figure 1.8. Immunoréactivité à ET-1 dans la thyroïde normale (a) et dans le carcinome papillaire (b) (Donckier *et al,* 2003).

Dans le traitement du cancer, l'adénocarcinome prostatique a bénéficié de nombreuses avancées. Ce sont les antagonistes du récepteur ET_A qui ont donné les meilleurs résultats. Citons l'atrasentan (ABT-627), à l'étude depuis 3 ans dans le cancer avancé de la prostate (Nelson *et al,* 2001 ; Carducci *et al,* 2002). Jusqu'ici, il a été démontré que l'atrasentan en monothérapie retarde la progression de la production de PSA (Prostate specific antigen) dans le cancer prostatique avancé et réfractaire aux hormones sans présenter d'effets secondaires sérieux. Cependant, il n'a pas encore été prouvé que l'atransentan augmenterait la survie.
D'autres études sont en cours sur la combinaison de ces molécules avec une chimio- ou une hormono-thérapie dans les cancers de la prostate ou d'autres tumeurs solides.

1.2. Cancers de la thyroïde

1.2.1. Généralités

Pour rappel, la thyroïde est un organe endocrine impliqué dans la régulation du métabolisme central ainsi que dans la croissance et le développement. A l'échelle histologique, la glande thyroïdienne est constituée d'une multitude de vésicules ou follicules tassés les uns contre les autres. Les follicules sécrètent en leur centre une substance colloïde où est stockée l'hormone thyroïdienne sous forme de thyroglobuline. Autour des follicules existent des cellules para-folliculaires sécrétrices de calcitonine, aussi appelées cellules C.

Dans les pays occidentaux, les cancers de la thyroïde sont responsables de moins de 1% de tous les décès dus au cancer. Il existe des tumeurs différenciées et d'autres non différenciées appelées carcinomes anaplasiques. Les carcinomes différenciés de la thyroïde représentent 80-85% des cancers de la thyroïde. Du point de vue histologique, ils se divisent en deux types selon que les lésions apparaissent dans l'épithélium folliculaire (carcinomes papillaire et folliculaire) ou dans les cellules C (cancer médullaire) (**Figure 1.7**).

1.2.2. Carcinome papillaire de la thyroïde (CPT)

C'est le carcinome de la thyroïde le plus fréquent dans tous les groupes d'âge. Le pic d'incidence se trouve entre 30 et 40 ans ; il est deux fois plus fréquent chez les femmes. Il est histologiquement très bien différencié, et se présente souvent comme une tumeur à plusieurs nodules.
Une irradiation antérieure du cou peut favoriser son développement.
Cette tumeur manifeste une croissance lente ; aussi, il est souvent de bon pronostic. Il n'occasionne pas souvent de métastases ; le cas échéant, celles-ci voyagent par voie lymphatique surtout vers les ganglions cervicaux. Le traitement de base du CPT est la lobo-isthmectomie ou une thyroïdectomie totale pour les cas de mauvais pronostic.

1.2.3. Carcinome folliculaire de la thyroïde (CFT)

Le CFT est une tumeur plus rare et constitue 10 à 20% des cancers de la thyroïde. Sa prévalence est plus élevée dans des régions carencées en iode ; l'âge moyen des sujets va de 40 à 60 ans. Il apparaît souvent comme un nodule solitaire, qui envahit les vaisseaux et donne des métastases pulmonaires et osseuses. Les CFT à invasion minime ont un excellent pronostic et sont traités par une lobo-isthmectomie. Les CFT invasifs sont traités par une thyroïdectomie totale.

1.2.4. Carcinome médullaire de la thyroïde (CMT)

Le CMT se développe à partir des cellules C de la glande thyroïde et représente 5 à 8% des cancers de la thyroïde. Il existe une forme sporadique et une forme familiale (25% des CMT) transmise sous forme autosomique dominante. Le taux de survie à 5 ans est de 75%. Le CMT présente souvent des métastases par voie lymphatique. La chirurgie constitue le traitement le plus efficace du CMT.
Ce cancer se distingue des autres cancers thyroïdiens par plusieurs caractéristiques :

- son origine embryologique neuroectodermique et son développement à partir des cellules C qui ne captent pas l'iode et ne sont pas régulées par la TSH ;
- sa possible transmission héréditaire, une des formes familiales étant liées à des mutations du proto-oncogène RET ;
- sa possible association à une néoplasie endocrinienne multiple (MEN de type IIa et IIb) ;
- l'existence de marqueurs tumoraux spécifiques (calcitonine).

1.2.5. Endothéline et thyroïde

1.2.5.1. Endothéline et thyroïde normale

ET-1 est présente dans la thyroïde normale et pathologique (Lenziardini *et al,* 1995). De plus, ET-1 peut être produite par les cellules folliculaires de la thyroïde en culture primaire, comme démontré chez le cochon (Colin *et al,* 1992), le rat (Colin *et al.*1992) et l'Homme (Eguchi *et al*, 1993 ; Tseng *et al*, 1993 ; Lenziardi *et al,* 1995 ; Foppiani *et al*, 1997 ; Gerard *et al*, 2002). Néanmoins, le rôle de ET-1 dans la physiologie thyroïdienne n'est pas connu.

1.2.5.2. Endothéline et carcinomes thyroïdiens

Récemment, le professeur Donckier de l'Université Catholique de Louvain et son équipe ont démontré par immunohistochimie et RT-PCR que ET-1 et son récepteur ET_A sont surexprimés dans le carcinome thyroïdien papillaire et dans la thyroïdite d'Hashimoto (Donckier *et al,* 2003). Cette surexpression suggère un rôle mitogénique de ET-1 dans le carcinome thyroïdien et éventuellement un rôle dans le processus inflammatoire. L'immunoréactivité à ET-1 était principalement localisée dans le cytoplasme des cellules folliculaires **(Figure 1.8).** Mais un signal positif était aussi présent dans la colloïde de certains follicules, dans les cellules inflammatoires (surtout dans le cas de la thyroïdite d'Hashimoto) et dans les cellules endothéliales de nombreux vaisseaux. Dans la thyroïde normale, la thyroïdite et le carcinome, les pourcentages de cellules positives pour ET-1 étaient respectivement de 37, 72 et 97%.

Quant aux résultats de la RT-PCR, ils révèlent que les taux des ARNm d'ET-1 étaient près de quatre fois plus élevés dans le carcinome papillaire que dans la thyroïde normale. L'ARNm des récepteurs ET_A était plus exprimé que celui de ET_B dans le carcinome. Il est à noter que le récepteur ET_A est plus exprimé dans la thyroïdite par rapport à la thyroïde normale, mais néanmoins d'une façon moindre que dans le carcinome papillaire.

En plus de l'étude du Professeur Donckier, une autre étude immunohistochimique avait auparavant détecté la présence d'ET-1 dans le carcinome papillaire thyroïdien humain, mais la spécificité de l'anticorps utilisé n'avait pas été prouvée (Lenziardi *et al,* 1995).

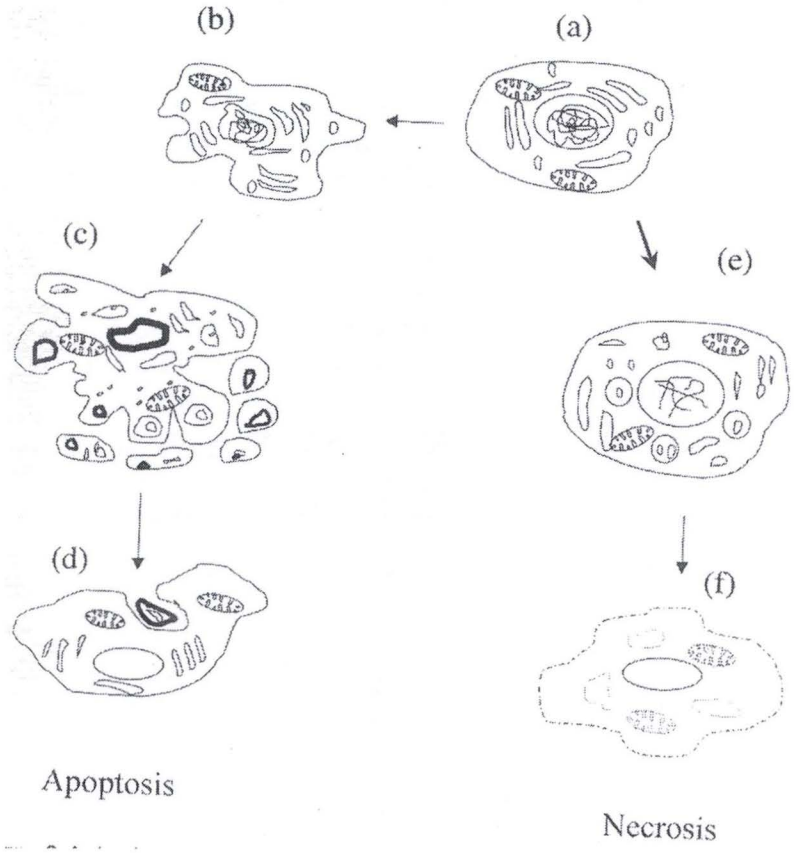


Figure 1.9. Comparaison entre la mort cellulaire par nécrose et par apoptose (d'après, Studzinski, G.P. 1999). a) condensation de la cellule ; b) condensation de la chromatine ; c) apparition des corps apoptotiques ; d) phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages environnants ; e) dégradation cellulaire ; f) lyse cellulaire.

Néanmoins, la présence de ET-1 dans des cancers de la thyroïde ne suffit pas à démontrer son importance fonctionnelle. Pour cela, des études in vitro sont nécessaires. Ce sera un des buts de notre travail.

1.3. Apoptose

1.3.1. L'apoptose physiologique

Pour rappel, l'apoptose est une mort cellulaire programmée, un processus voulu, limité aux cellules qui doivent être éliminées. Cela s'oppose à la nécrose qui est une mort cellulaire accidentelle. Pendant l'apoptose, par rapport à la nécrose, la perte de l'intégrité membranaire et l'altération des organites ne sont que tardives. Une des premières modifications morphologiques de l'apoptose est une réduction du volume de la cellule : le cytoplasme se condense sans pour autant présenter une modification des organites **(Figure 1.9).** A ce stade, la cellule perd contact avec ses voisines. Puis c'est au tour de la chromatine du noyau de se condenser, pour finir par se fragmenter en petits lobes. Ces modifications s'accompagnent de l'activation d'une endonucléase spécifique au niveau du noyau ; celle-ci clivera l'ADN en fragments multiples de 180 à 200 paires de bases. Après cette étape de condensation, la cellule bourgeonne pour former des corps apoptotiques qui seront phagocytés par les macrophages environnants. Cette phagocytose permet d'éviter l'accumulation de débris cellulaires dans les tissus, ce qui empêche une réaction inflammatoire et autorise le recyclage des composants organiques de la mort cellulaire par le phagocyte.

Il existe des situations dans lesquelles l'apoptose est naturellement requise, que ce soit pendant la vie fœtale ou à l'âge adulte.
Lors du développement embryonnaire, l'exemple des cellules localisées dans l'espace interdigité est souvent cité ; elles vont mourir par apoptose pour laisser apparaître les doigts. Egalement pendant l'embryogenèse, les constituants des cellules apoptosées sont recyclés pour servir de matériaux à l'accroissement. La sélection immunitaire des lymphocytes dans le thymus est aussi un phénomène apoptotique très important ; dans ce cas l'apoptose sert à éliminer les lymphocytes dysfonctionnels ou autoréactifs.
N'oublions pas qu'à la naissance, dans notre système nerveux, les neurones sont générés en excès. Ensuite, plus de la moitié sont éliminés par apoptose afin de créer un équilibre entre ceux-ci et les cibles qu'ils innervent.
Chez l'adulte, l'apoptose aide à la régulation du nombre de cellules : la mort cellulaire doit exactement équilibrer la division cellulaire par des phénomènes de croissance ou dégénérescence cellulaire. Ainsi l'apoptose s'observe surtout dans les tissus dont le renouvellement est élevé. A titre d'illustration, des milliards de cellules meurent chaque heure dans la moelle osseuse et l'intestin.
Essentiel à la construction, au maintien et à la réparation des tissus, le suicide des cellules surnuméraires, dysfonctionnelles ou endommagées est soumis à un contrôle hautement spécifique et efficace.

1.3.2. Mécanismes de l'apoptose

L'apoptose est réalisée par l'intermédiaire d'une cascade intracellulaire protéolytique.
Cette machinerie intracellulaire semble similaire dans toutes les cellules animales ; elle est constituée par une famille de protéases possédant une cystéine à leur site actif et clivent leurs cibles au niveau d'un acide aspartique spécifique. C'est pourquoi elles sont appelées caspases pour cysteinyl-aspartate-specific proteases. Ces caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, les pro-caspases, qui sont activées par d'autres caspases **(Figure 1.10).**

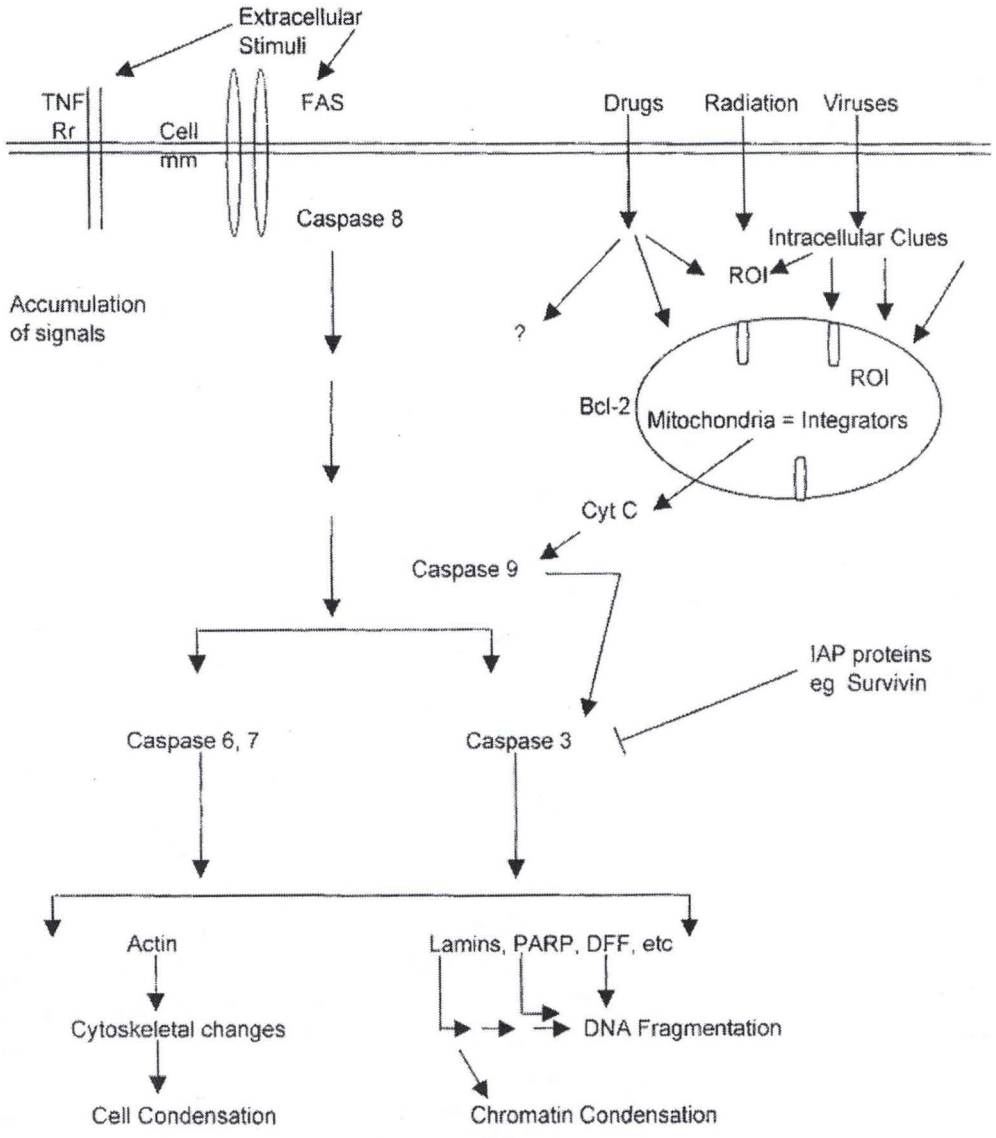


Figure 1.10. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose (d'après, Studzinski, G.P. 1999).

Une fois activées, ces caspases clivent d'autres pro-caspases, ce qui aboutit à une cascade d'amplification protéolytique. Les caspases ne dégradent pas les structures cellulaires, mais agissent en clivant des protéines. Ce clivage aura pour résultat l'activation d'une autre caspase, celle d'une DNAase spécifique, ou l'inhibition d'une enzyme de réparation de l'ADN et le démantèlement du noyau (par action sur les lamines).
Autrement dit, il faut distinguer les caspases d'exécution (par exemple la caspase 3) et les initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10). Ces dernières peuvent à leur tour être activées par la stimulation des récepteurs de mort. Les lymphocytes cytotoxiques, par exemple, peuvent induire l'apoptose en sécrétant une protéine appelée Fas ligand. Celle-ci se lie aux récepteurs de mort Fas (CD95/APO-1) localisés à la surface des cellules cibles. Lorsque les récepteurs Fas sont stimulés, ils recrutent des protéines adaptatrices dont l'action aura pour conséquence la liaison et l'agrégation de pro-caspases 8. Cet exemple nous montre que des cellules stressées, infectées par des virus ou endommagées se suicident par cette voie du Fas/Fas ligand.

Les processus conduisant à l'activation des caspases initiatrices ne sont pas encore tout à fait résolus. Néanmoins, il est maintenant connu que cette étape se déroule au niveau des mitochondries.
Celles-ci sont stimulées d'une manière telle qu'elles libèrent le transporteur d'électrons cytochrome c dans le cytoplasme, où il va s'associer à Apaf-1, une protéine adaptatrice, et l'activer. Cette voie mitochondriale d'activation des pro-caspases est utilisée dans de nombreuses situations d'apoptose. Un cas d'école est la situation de dommage à l'ADN. Une des réponses cellulaires à ces dégâts est l'apoptose qui passe habituellement par la molécule p53. Cette p53 peut activer la transcription de gènes qui codent pour des protéines favorisant la libération du cytochrome c. Ces protéines appartiennent à la famille Bcl-2.
Cette famille de protéines intracellulaires aide à la régulation des pro-caspases. Certains membres, tels que Bcl-2 et autres Bcl-X, sont anti-apoptotiques, principalement par inhibition de la libération du cytochrome c, tandis que d'autres sont pro-apoptotiques. Parmi ceux-ci, Bad lie et inactive les inhibiteurs de mort cellulaire, et Bax et Bak stimulent la libération du cytochrome c.

Une autre famille de molécules importantes intervient dans la régulation de l'apoptose : celle des IAP (inhibitory of apoptosis) dont l'action principale est de bloquer l'activité des caspases.

La cellule voit aussi ses mécanismes d'apoptose influencés par des signaux extracellulaires, tant comme inhibiteurs que comme activateurs de cette mort programmée. Sont proposés comme signaux d'apoptose : la privation en facteur de croissance, une infection par virus, le TNFα, les dommages à l'ADN, le choc thermique ou encore le stress oxydatif.
Ces molécules-signaux agissent principalement par contrôle de l'activité des membres des familles Bcl-2 et IAP. C'est le cas des facteurs de survie extracellulaire qui suppriment l'apoptose.

Akt, aussi appelée protéine kinase B (PKB), est une voie importante dans la régulation de la survie cellulaire. L'activation de Akt prend place par la liaison directe avec les produits phosphoinositides de la PI3Kinase **(Figure 1.11).** Akt est une kinase avec un domaine PH qui lui permet de s'accrocher aux produits de réaction de la PI3Kinase activée. Après avoir lié le phosphatidyl inositol triphosphate (PIP_3) sur la face cytosolique de la membrane, Akt modifie sa conformation et se trouve dès lors activée par phosphorylation grâce à une protéine kinase dépendante des phosphatidylinositols appelée PDK1. Une fois activée, Akt quitte la

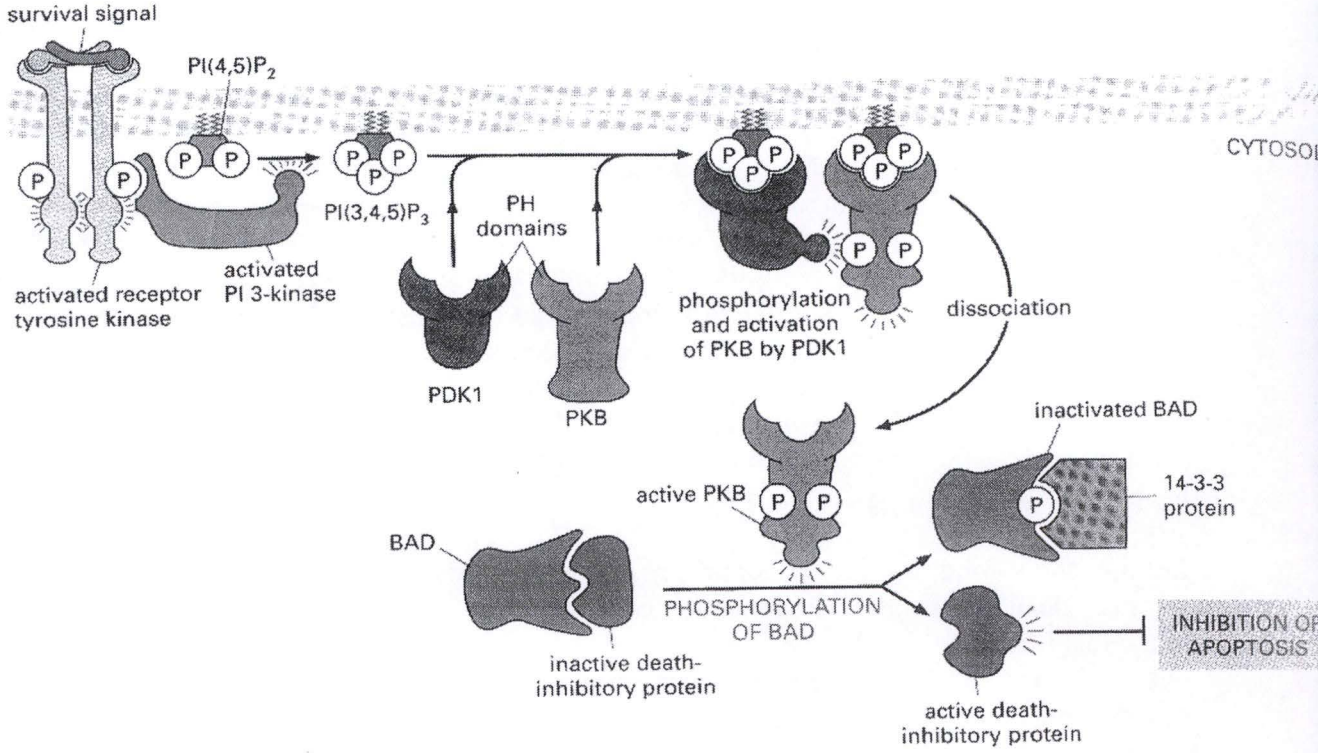


Figure 1.11. Signalisation de Akt dans la voie de l'apoptose (d'après in Molecular Biology of the Cell, Fourth edition, Garland Science).

membrane pour phosphoryler plusieurs cibles. Ces cibles sont principalement cytosoliques (par exemple, Caspase-9, Bad), mais certaines sont nucléaires (par exemple, les facteurs de transcription Forhead), ce qui nécessite l'importation d'Akt vers le noyau. Parmi les mécanismes de la stimulation de la survie cellulaire par Akt, on peut citer l'inactivation par phosphorylation de la molécule Bad, normalement pro-apoptotique.

1.3.3. Apoptose pathologique

L'intérêt de l'apoptose réside aussi dans son implication en pathologie, qu'elle soit cancéreuse ou neuro-dégénérative.
En effet, dans un tissu normal, il y a équilibre entre la prolifération et l'apoptose. Par contre, les cellules cancéreuses voient augmenter le taux de prolifération et diminuer celui de l'apoptose ; leur prolifération devient souvent excessive. Une réduction d'apoptose menant à la survie des cellules a aussi lieu dans certaines maladies autoimmunes comme l'arthrite rhumatoïde.
Les maladies neuro-dégénératives, comme les maladies de Parkison et d'Alzheimer, se caractérisent par un excès d'apoptose au niveau des neurones.
Il est important de noter que l'apoptose est aussi le mécanisme de cytotoxicité prédominant induit par les agents chimiothérapeutiques. Ainsi, l'incapacité des cellules cancéreuses à activer l'apoptose peut mener à une résistance à plusieurs agents anticancéreux. D'où l'idée prometteuse d'utiliser ou d'associer des médicaments inhibiteurs d'apoptose dans la thérapie anti-cancéreuse.

1.3.4. Caractéristiques des cellules apoptotiques

Les cellules apoptotiques se distinguent par bien des points. Deux des plus spécifiques sont la fragmentation de l'ADN et le « flip-flop » de la phosphatidylsérine (PS).

- *Fragmentation de l'ADN*. Dans la nécrose, l'ADN est dégradé en morceaux de tailles diverses. Dans l'apoptose, il est dégradé en morceaux de 180 paires de base ou en ses multiples. En effet, une DNase particulière à l'apoptose, CAD (pour caspase activated DNase), clive spécifiquement les espaces internucléosomiques. Cette particularité permet d'obtenir au départ d'un extrait de cellules apoptotiques un gel d'électrophorèse typique, l'ADN s'y présentant sous forme d'une échelle. Cette échelle d'ADN est représentée à la **Figure 1.12**.

- *« Flip-flop de la PS »*. La PS est habituellement exposée à la face cytosolique des membranes cellulaires. Lors de l'apoptose, les cellules exposent cette molécule à leur surface. L'utilité de ce mécanisme n'est pas bien comprise ; il est admis qu'il s'agirait d'un signal pour activer la phagocytose des corps apoptotiques. L'aspect pratique est que la PS est spécifiquement reconnue par l'annexine V. En couplant l'annexine V à un marqueur fluorescent telle que la fluorescéine, la détection des cellules apoptotiques au sein d'une population cellulaire est possible.

1.3.5. Endothéline et apoptose

Comme expliqué ci-dessus, l'inhibition de l'apoptose peut entraîner des désordres cliniques. Il a été démontré qu'en plus de ses effets mitogéniques, l'endothéline supprimait l'apoptose des cellules cancéreuses (Wu-Wong *et al*, 2000 ; Vacca *et al*, 2000).

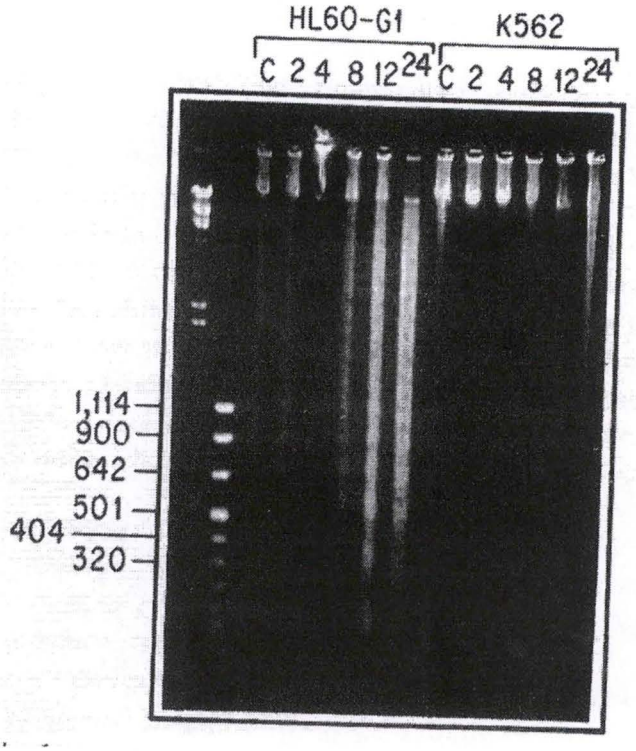


Figure 1.12. Illustration d'une échelle d'ADN dans les cellules HL60-G1 (clones de cellules leucémiques HL60), mais pas dans les cellules leucémiques K562 après exposition à la doxorubicine (d'après, Studzinski, G.P. 1999).

La façon dont l'endothéline entraîne cette inhibition n'est pas complètement élucidée. En plus, il semblerait que les effets de ET-1 ne jouent pas au même endroit de la cascade apoptotique en fonction des différents types cellulaires. Grâce aux diverses études réalisées, il est cependant possible de s'en faire une idée.

Peduto Eberl *et al*, (2000) ont examiné l'effet de ET-1 sur l'apoptose de lignées cellulaires humaines de carcinomes coliques. Ils ont constaté que le bosentan bloquait l'effet anti-apoptotique de ET-1 en potentialisant la voie du Fas-ligand dans ces lignées. ET-1 pourrait ainsi être impliqué dans les mécanismes de résistance tumorale à l'apoptose induite par Fas dans les cellules du colon.

Cette même équipe a aussi étudié l'expression du système des ETs dans le gliobastome humain, tumeur hautement maligne du système nerveux central (Egidy *et al,* 2000b). Après avoir démontré une expression très élevée de pré-pro-ET-1, de ECE-1 et des récepteurs ET_A dans les vaisseaux de la tumeur ainsi que de ET_B dans les cellules du glioblastome, ils ont suggéré que les vaisseaux du glioblastome constituent une importante source de ET-1 qui agit sur le cancer via le récepteur ET_B. En poursuivant leur travail, ils ont observé que le système ET-1 n'est pas impliqué dans la prolifération tumorale mais que ET-1 agit comme facteur de survie, probablement via la phosphorylation de ERK et la voie de PKC.

Le groupe de Bagnato, quant à lui, a approfondit les relations entre ET-1 et l'apoptose sur des cellules de carcinome ovarien (Del Bufalo *et al,* 2002). Le but de leur étude était, après constatation d'une surexpression des récepteurs ET_A dans ces tissus ovariens, de voir si ET-1 modifiait la sensibilité de lignées cellulaires à l'apoptose induite par deux stimuli. Les résultats sont manifestes : ET-1 inhibe l'apoptose induite par la privation de sérum et celle induite par le paclitaxel, puissant agent antinéoplasique utilisé dans le traitement des cancers du sein avancés et dans les carcinomes ovariens. Au niveau cellulaire, le paclitaxel entraîne la polymérisation de la tubuline et la formation de microtubules, bloque le cycle cellulaire en mitose, et induit l'apoptose. Au niveau biochimique, l'apoptose déclenchée par le paclitaxel se déroule via l'augmentation de la phosphorylation de Bcl-2 (Blagosklonny *et al,* 1996) ; elle est supprimée par l'addition de ET-1.
Une analyse plus aboutie de cette voie de signalisation a montré que ET-1 stimule l'activation de la protéine sérine/thréonine kinase Akt.
Ainsi, ET-1 semble jouer un rôle déterminant dans la protection des cellules de carcinome ovarien contre l'apoptose induite par le paclitaxel, et cela via les voies dépendantes de Bcl-2 et passant par la PI3K. Dans ce cas, ET-1 et le récepteur ET_A seraient d'importantes cibles dans la thérapie antinéoplasique. L'avenir proche permettra probablement de confirmer ou de nuancer cette hypothèse.

But du mémoire

2. But du mémoire

Depuis sa découverte, l'endothéline-1 a été impliquée dans de nombreuses pathologies qui couvrent presque toutes les spécialités médicales (Rubanyi *et al,* 1994). Les endocrinologues en particulier, se sont intéressés à la participation de ET-1 dans le diabète de type 2, l'hypertension, les maladies de la thyroïde et enfin aux implications de ET-1 dans les cancers (Grant *et al,* 2003). Des chercheurs ont mis en évidence une corrélation entre l'immunoréactivité à ET-1 et des pathologies thyroïdiennes (Lenziardi *et al,* 1995 ; Donckier *et al,* 2003). Toutefois cette relation est encore très peu élucidée. Or, ET-1 s'avère comme un acteur important du développement des pathologies néoplasiques, en particulier dans les métastases des cancers de la prostate (Nelson *et al,* 1995). Afin d'améliorer les connaissances concernant la physiopathologie de ET-1 dans les maladies cancéreuses, notre travail a pour objectif d'étudier les effets in vitro de ce peptide dans des lignées de cellules cancéreuses thyroïdiennes.

Dans ce mémoire, deux lignées cellulaires seront utilisées : FTC133 et TPC1. La première, achetée à l'ECCC (European Collection of Cell Culture), provient d'un homme de 42 ans atteint d'un carcinome folliculaire thyroïdien qui a donné des métastases au niveau d'un ganglion lymphatique. La lignée TPC1, originaire d'un carcinome papillaire thyroïdien humain, nous a été fournie gracieusement par le Dr. Donatella Vitagliano (Institut d'Endocrinologie et d'Oncologie Expérimentale, CNR, Université Frédérico II, Naples, Italie).

Notre fil conducteur sera le suivant : tout d'abord, nous vérifierons la présence du système ET dans nos lignées cellulaires. Pour ce faire, des extractions d'ARN suivies de RT-PCR, des western-blots et des expériences d'immunocytochimie seront réalisées. Ensuite, la fonctionnalité du système ET sera appréciée par les effets que le peptide ET-1 induit. Il s'agira de découvrir d'éventuels effets mitogéniques par mesure de la prolifération cellulaire (grâce à un test spécifique), ou de mettre à jour un potentiel pro-apoptotique de ET-1. Les effets d'antagonistes de ET-1 seront examinés.
Pour terminer, nous tâcherons d'identifier les voies par lesquelles ET-1 agit. Nous examinerons son influence sur les variations de la concentration en calcium intracellulaire et sur des étapes plus tardives de la signalisation comme la phosphorylation de Akt.

Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Culture cellulaire.

3.1.1. Cellules

Comme déjà signalé, les lignées cellulaires TPC-1 utilisées dans nos expériences sont des cellules de carcinome papillaire thyroïdien ; elles ont été gracieusement fournies par le professeur Donatella Vitagliano. Elles ont été cultivées en milieu DMEM contenant 10% Fœtal Bovine serum (FBS Gibco) et 15mM Hepes (Gibco).
Quant aux lignées FTC133, provenant d'un carcinome folliculaire thyroïdien, elles proviennent de la ECCC (European Collection of Cell Culture). Elles ont besoin d'un milieu DMEM : Ham's F12 + 2mM de glutamine +10% de FBS ainsi que de 15mM Hepes. Il est conseillé de ne pas dépasser 70 à 80% de confluence.

3.1.2. Repiquage des cellules FTC133 et TPC1

Hormis le milieu de culture différent pour chaque type cellulaire, la méthode est la même dans les deux cas.

3.1.2.1. Matériel

- Trypsine-EDTA : solution stérile de Trypsine-EDTA (Gibco)
- Boîtes de culture (Cell Star® Greiner Bio-one)
- Trypan bleu stained 0, 4% (Gibco)
- Pénicilline-streptomycine : 5000 U/ml pénicilline et 5000µg/ml streptamycine
- PBS stérile 1x d'après la recette Gibco
- Hepes 1M Gibco

Les milieux de culture et de rinçage sont conservés à 4°C. Le FBS, la trypsine et le Pen-strep sont stockés à -20°C. Les milieux doivent être réchauffés à 37°C avant utilisation.

3.1.2.2. Méthode

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 75cm^2 pour les TPC1 et de 25cm^2 pour les FTC133.
Rincer plusieurs fois les cellules avec du PBS ;

- Détacher les cellules par ajout de PBS-Trypsine-EDTA ;
- Placer 4 minutes dans l'incubateur à 37°C.
- Neutraliser la trypsine à l'aide de milieu ;
- Centrifuger pendant 8 minutes à 1200 rpm à température ambiante ;
- Resuspendre le culot cellulaire dans du milieu ;
- Compter le nombre de cellules grâce à la cellule de Bürker ;
- Repiquer les cellules dans des boîtes, et les mettre dans l'incubateur à 37°C avec 5% de CO_2.

Tableau 3.1. Recette des gels et tampons utilisés en WB

Gel de séparation		**Gel d'empilement**	
Tris-HCL 1,5 M pH 8,8 ; SDS 0,4%	2,5ml	Tris-HCL 0,5 M ; pH 6,8 ; SDS 0,4%	1,25ml
Acrylamide 30% ; Bisacrylamide 0,8%	4,0ml	Acrylamide 30% ; Bisacrylamide 0,8%	0,625ml
H_2O bidistillée	3,0ml	H_2O bidistillée	2,75ml
Temed (Biorad)	10µl	Temed	5µl
Persulfate d'ammonium (APS de Biorad) 10%	0,5ml	Persulfate d'ammonium (APS) 10%	0,375ml

Solution alourdissante		**Tampon de migration ou d'électrophorèse**	
SDS	1%	Tris-HCL	25mM
Bleu de bromophénol	0,06%	Glycine	192 mM
Glycérol	14%	SDS pH 8,6	0,1%
Tris-HCL ; pH 6,8	300mM		

Tampon de transfert	
Tris-HCL	25mM
Glycine	192 mM
Méthanol	20%

Tableau 3.2 : Recette de tampon de lyse et des inhibiteurs de phosphatases.

RIPA	**Inhibiteurs de phosphatases**
Tris HCl 50mM ph=7,4	$Na_3 VO_4$ 2mM
NaCl 120mM	NAF 50mM
Triton 1%	Glycérol phosphate disodium 50mM
SDS 0,1%	EDTA 2mM
DOC 1%	

3.2. Western Blot

3.2.1. Principe

Le Western Blot est une méthode qui permet de détecter la présence d'une protéine produite dans un échantillon cellulaire. En pratique, il s'agit de séparer les protéines de l'échantillon en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Une membrane est mise au contact du gel, et par application d'un champ électrique, les protéines seront transférées sur cette membrane. Ensuite avant d'incuber la membrane avec un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt, il faut bloquer les sites aspécifiques de l'anticorps avec du PBS-BSA (phosphate buffered saline- bovine serum albumin). Dans un deuxième temps, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (HRP). La protéine pourra être localisée sur la membrane par ajout de H_2O_2 et de luminol (Kit Western Lightning Chemiluminescence ou kit Amersham).

3.2.2. Matériel

- Nous travaillons avec de l'acrylamide (Bio-rad) et un système Semi-phor (Hofer Scientific Instrument).
- Pour deux petits gels de 12 % d'acrylamide, d'environ 8 cm de hauteur et 10 cm de largeur: un gel de séparation ainsi qu'un gel d'empilement sont réalisés, une solution alourdissante, un tampon de migration et un tampon de transfert sont utilisés (**Tableau 2.1**).
- Les échantillons pour la mise en évidence des récepteurs ET_A sont des homogénats cellulaires des lignées FTC133 et TPC1
  Les échantillons pour la mise en évidence de l'Akt sont des homogénats de cellules TPC1 soumis à un cocktail contenant du tampon de lyse (RIPA) 2 x concentré, des inhibiteurs de protéases 10x (Roche) et des inhibiteurs de phosphatases **(Tableau 2.2).**

3.2.3. Méthode

3.2.3.1. Electrophorèse en gel de polyacrylamide (méthode de Laemmli)

Le gel de polyacrylamide permet de séparer les protéines contenues dans un mélange. Cette séparation est basée sur une différence de charge et de taille. Il est possible d'en éliminer le facteur charge en présence de SDS. En effet, ce détergent anionique a la capacité de dénaturer les protéines. Il se complexe à celles-ci, ainsi les protéines sont toutes chargées négativement et possèdent à peu près la même densité de charge à leur surface. Il existe alors une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire d'une protéine et sa distance de migration dans un gel de polyacrylamide contenant du SDS.

3.2.3.2. Dépôt des échantillons

- Ajouter un volume de solution alourdissante et de β-mercaptoéthanol 0,25% pour chaque échantillon ;
- Bouillir les échantillons pendant 3 minutes au bain-marie ;
- Centrifuger 1 min à 13.000 rpm;
- Déposer les échantillons dans les puits, et déposer en parallèle 10µl d'un étalon de poids moléculaire.

3.2.3.3. Migration

- Déposer le gel dans une cuve contenant le tampon de migration;
- Appliquer une différence de potentiel de 80 volts à 100 volts et laisser migrer.

3.2.3.4. Transfert semi-sec des protéines sur membrane Polyscreen® PVDF (PolyVinylidene DiFluoride)

- Traiter la membrane au méthanol 100% pendant 1min puis la plonger au minimum 15 min dans la solution de transfert ;
- Arrêter la migration de protéines dans le gel de polyacrylamide ;
- Récupérer le gel de séparation ;
- Réaliser le montage en sandwich composé d'éponges imbibées de solution de transfert, de papiers Whatman 3 MM également imbibés de solution de transfert et de la membrane PVDF ;
- Appliquer un courant de 8 volts et de 250 mA, laisser transférer pendant environ 2h30.

3.2.3.5. Coloration au rouge Ponceau

Le rouge Ponceau est un colorant réversible qui permet de révéler l'ensemble des protéines présentes sur la membrane. Ainsi, on peut comparer les quantités de protéines déposées dans chacun des puits.

- Après transfert, sécher la membrane à l'air ambiant ;
- Sur un agitateur, incuber la membrane avec environ 20 ml de rouge Ponceau (Sigma ; Rouge Ponceau S 0,1% dans 5% acide acétique) pendant 15 minutes ;
- Rincer la membrane à l'eau bidistillée pour obtenir un signal satisfaisant et scanner.

3.2.3.6. Saturation des sites de liaison non spécifiques des protéines

Il s'agit d'une étape empêchant la liaison non spécifique des anticorps.

- Placer la membrane dans une boîte et la recouvrir d'un volume suffisant de solution de blocage (PBS-Tween 0,1% avec lait en poudre 5% ou solution de blocage Amersham) ;
- Laisser sur agitateur pendant 2h à température ambiante ou overnight en chambre froide.

3.2.3.7. Ajout de l'anticorps primaire

- Laver la membrane 3 fois avec du PBS-Tween 0,1% ;
- Diluer l'anticorps primaire à la concentration désirée dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 1%.
  Pour l'anticorps anti-ET_A (polyclonal de mouton ; Alexis Biochemicals) de concentration 3,8mg/ml, la dilution était de 1/200 ; pour l'anti-Akt donné gracieusement par le laboratoire de biologie cellulaire, la dilution était de 1/10000.
- Mettre la membrane au contact de la solution d'anticorps. Incuber à vitesse lente et à température ambiante pendant 2h pour ET_A et 1h pour Akt.

3.2.3.8. Ajout de l'anticorps secondaire

- L'anticorps secondaire pour ET_A est un anti-IgG de mouton couplé à HRP ; celui pour Akt est un anti-IgG de lapin couplé à HRP.
- Rincer plusieurs fois avec PBS-Tween 0,1% sous agitation plus forte ;

- Diluer l'anticorps secondaire dans du PBS-Tween 0,1%-BSA 1% pour obtenir une concentration de 1/5000 pour ET_A et de 1/10000 pour Akt.
- Incuber 45 minutes à température ambiante.

3.2.3.9. Visualisation des protéines

- Révéler en chambre noire à l'aide du kit de chemilumiscence ; le Perkin Elmer pour ET_A et le Amersham pour Akt. Ce kit contient de l'eau oxygénée et du luminol. La perodyxase couplée à l'anticorps secondaire catalyse l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol.
- Laisser incuber 1 min ou 5 min avec les deux solutions de ce kit.
- Déposer la membrane dans une cassette et la mettre au contact d'un film (Kodak Biomax) le temps voulu ; puis développer le film.

3.3. Méthodes relatives à l'ADN et l'ARN

3.3.1. Extraction d'ARN

3.3.1.1. But

L'extraction d'ARN des deux types cellulaires nous servira pour réaliser la RT-PCR

3.3.1.2. Matériel

- Minikit Qiagen
- Spectrophotomètre pour le dosage de la quantité d'ARN

Noter que dès que l'on veut travailler avec de l'ARN, il est indispensable de travailler en conditions RNase-Free (RF). Dès lors, toute la vaisselle est passée au four pendant 3h à 180°C.

3.3.1.3. Méthode

- Le protocole est celui du Mini-Kit RNeasy de Qiagen.

3.3.1.4. Mesure de la quantité d'ARN contenu dans l'extrait cellulaire

Une mesure de l'absorbance à 260nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques.

- La formule pour calculer cette quantité est :
  Pour 100µl, une densité optique (D.O) de 1 correspond à 4µg d'ARN
- Pour vérifier l'intégrité de l'ARN, un gel d'agarose est réalisé, et le profil de migration analysé.
- L'ARN est ensuite stocké à -80°C

3.3.2. Electrophorèse d'ARN et d'ADN en gel d'Agarose

3.3.2.1. Principe

Comme signalé ci-dessus, l'électrophorèse est une méthode de séparation. Dans ce cas, c'est la taille des fragments d'ARN (ou d'ADN) qui va être évaluée. Le problème des charges est résolu par les groupements phosphates qui rendent l'ARN (ou l'ADN) globalement négatif.

Ainsi l'ARN (ou l'ADN) migre vers l'électrode positive s'il est soumis à un champ électrique. Pour visualiser les fragments, du bromure d'éthidium est utilisé. Cette molécule s'intercale entre les bases de l'ARN (ou l'ADN) et émet de la fluorescence lors de son exposition aux ultraviolets (λ=302nm), ce qui permet la visualisation des fragments.

3.3.2.2. Matériel

- Agarose (Bio-rad)
- Cuve d'électrophorèse
- Pour l'ADN, tampon TAE pour Tris 40nM, Acide acétique glacial 40nM, EDTA 1mM ; le tout porté à pH 8. Pour l'ARN, le tampon TAE est RNase free.
- Bromure d'éthidium 10mg/ml et 1mg/ml conservés à 4°C et à l'abri de la lumière.
- Solution alourdissante constituée pour 10ml de : 25mg de bleu de bromophénol ; 5 ml de glycérol ; 0,5ml de EDTA (1M) et H_2O.

3.3.2.3. Méthode

- Chauffer 1g d'agarose dans 100 ml de TAE pour un gel 1% ;
- Laisser refroidir la solution et ajouter 10µl de bromure 1mg/ml ;
- Couler le gel encore liquide dans un moule en plexiglas ;
- Insérer un peigne dont la taille des dents est choisie en fonction du volume à déposer ;
- Déposer l'échantillon d'ARN (ou d'ADN) alourdi par ajout de 1/10 de solution alourdissante dans les puits;
- Déposer en parallèle sur le gel un marqueur de poids moléculaire pour l'ADN (DNA Molecular Weight Markers Roche) ; aucun marqueur n'a été utilisé pour l'ARN ;
- Appliquer un courant de 400 A, et une différence de potentiel de 40 à 100 V ;
- Laisser migrer pendant 45 min à 1h30 ;
- Visualiser les bandes sur un transilluminateur (Vilbert Lourmat) UV 302nm
- Photographier le gel.

3.4. RT-PCR

3.4.1. Principe

Cette technique sert à quantifier un ARN_m donné. Pour ce faire, il faut au préalable une étape de transcription inverse.

3.4.1.1. Transcription inverse

Cette transcription est réalisée au moyen d'une enzyme, la reverse transcriptase RT (M-MLV RT pour moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, Invitrogen). Elle recopie le brin d'ARN monocaténaire en un brin ADN complémentaire à partir d'amorce nucléotidique d'une dizaine de paire de bases (Random Hexamer). Cette amorce allongée à son extrémité 3'-OH et brin d'ADN complémentaire à l'ARN est nommée ADNc.

3.4.1.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette réaction permet d'amplifier exponentiellement le fragment d'ADNc.
La technique consiste à utiliser une ADN polymérase capable de fonctionner à haute température (72°C) et de rester intacte à très haute température (95°C). Nous utilisons une DNA polymerase de BIOTOOLS, il s'agit d'une forme modifiée de l'enzyme de la bactérie

Tableau 3.3. Liste des amorces utilisées pour les RT-PCR.

Nom de l'amorce	Séquence	Taille du fragment
PPET sens	5'-TCAGTTTGAACGGGAGGTTTTT-3'	647 pb
PPET anti-sens	5'-CGCTCTCTGGAGGGATTGC-3'	
ET_B sens	5'-AGATCAAGGAGACTTTCAAATAC-3'	422 pb
ET_B anti-sens	5'-CAATACTCAGAGCACATAGACT-3'	
ET_A sens	5'-CCTGTCCTTTATCCTGGCCA-3'	± 300 pb
ET_A anti-sens	5'-AGATCGCAGTGCACACCAAG-3'	
ECE sens	5'- TGGGGGACCTTCAGCAACCT-3'	± 350 pb
ECE anti-sens	5'-GGGTGTCCTGGAAGTTGTCCTTG-3'	
GAPDHsens	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452 pb
GAPDHas	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	

Thermus thermophilus exprimée dans *E.coli*. La polymérase a besoin d'une amorce : un petit morceau d'ADN complémentaire d'une des extrémités de la région à amplifier. Cette amorce va s'hybrider à l'ADN et pourra être allongée à son extrémité 3'-OH libre en présence de dNTPs. Un seul brin est synthétisé pour que la région désirée soit amplifiée, il faut fournir une autre amorce pour l'autre extrémité de la région.

3.4.2. Matériel et méthode

3.4.2.1. Transcription inverse

- Dans un tube PCR, mettre exactement 2µg d'ARN ;
- Dérouler l'ARN en le plaçant 10 min dans un bain à 70°C, puis le mettre sur glace ;
- Pendant ce temps, préparer dans un même tube le mélange suivant :
  - Tampon M-MLV Reverse Transcriptase
  - dNTP 10 mM
  - Random Hexamer
  - H_2O pour arriver à un volume total de 20µl
  - Enzyme RTase M-MLV
- Centrifuger 1 min à 13000 rpm et laisser 5 min à température ambiante ;
- Mettre 1h à 42°C, puis 5 min à 95°C et ensuite conserver à froid ;
- Centrifuger 1 min à 13000 rpm ;
- Porter le volume à 100 µl avec de l'eau RNase free ;
- Mettre les tubes sur glace si on fait la PCR le jour même, sinon les stocker à -20°C.

3.4.2.2. PCR

Une PCR se réalise avec les composants suivants :
- L'ADN d'intérêt à amplifier
- Les amorces choisies en fonction de la région à amplifier
- L'ADN polymérase thermorésistante
- Les quatre bases nucléotidiques : dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Le tampon de la polymérase

Ce mélange subit un nombre variable de cycles (entre 25 et 40) constitués de trois températures successives et différentes :
- Avant chaque cycle, une étape de dénaturation de l'ADN à 95°C est nécessaire pendant 1 minute.
- La température de dénaturation ; 95°C pendant 1 min;
- La température d'hybridation calculée par la formule suivante :
  Tm (°C) = (nombre de A et de T) x 2°C + (nombre de C et G) x 4°C
  Dans ce travail, toutes nos amorces avaient une température d'hybridation de 59°C.
- La température d'élongation est de 72°C.
- Les cycles sont clos par une étape d'élongation finale de 7 min à 72°C.
  Les amorces utilisées sont reprises dans le **Tableau 3.3**.

3.5. Dosage de la Lactate Déshydrogénase

3.5.1. But de la manipulation

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme marqueur du cytosol. La doser nous permet de tester l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule, soit déterminer un état

d'altération cellulaire. La LDH catalyse la transformation du pyruvate en lactate tout en oxydant le NADH en NAD^+.Le principe du dosage est basé sur cette oxydation qui se traduit par une diminution de l'absorbance à 340nm.

3.5.2. Matériel

- Spectophotomètre
- Mélange pour le dosage composé de 5ml de tampon phosphate 0,5M pH 7,4 ; 5ml de pyruvate 10mM ; 100 µl de triton 10% ; 30 ml d'H_2O_2.

3.5.3. Méthode

Le dosage de la LDH a été réalisé sur le milieu de culture des deux types cellulaires et les extractions cellulaires recueillis après 24h, 48h, et 5 jours de privation de FBS.

Dans la cuvette sont déposés :
- 0,4 ml de mélange
- 0,5 ml d'échantillon
- 0,1 ml de NADH

La disparition du NADH, qui résulte de la réaction d'oxydo-réduction, est suivie pendant une minute au spectrophotomètre (λ 340 nm). Cette lecture donne une droite dont la pente est directement proportionnelle à la concentration enzymatique de LDH.

3.6. Test de prolifération au BrdU

3.6.1. Principe

Traditionnellement la prolifération des cellules in vitro se fait par comptage direct des cellules en déterminant l'index mitotique ou encore par la mesure de la synthèse d'ADN avec l'incorporation de la [3H]-thymidine. Ces méthodes ont le désavantage d'être laborieuses ou radioactives.

La technique du BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) est basée sur l'incorporation de cet analogue de pyrimidine au lieu de la thymidine lors de la synthèse d'ADN par des cellules en prolifération. Après l'incorporation dans l'ADN, le BrdU est détecté par un anticorps spécifique anti-BrdU.

3.6.2. Matériel

- -Kit BrdU Roche Applied Science
- -Les cellules TPC1 cultivées dans des plaques 96 puits à raison de 3500 cellules par puits, et les FTC133 à raison de 5000 par puits.

3.6.3. Méthode

Le protocole est celui livré avec le kit.
En résumé, le principe est le suivant :
- Les cellules sont cultivées en présence ou en absence d'ET-1 sur une plaque 96 puits à 37°C pendant différents temps : 24h, 48h, 72h et 5 jours.
- Le BrdU est ajouté aux cellules, et celles-ci incubées à 37°C pendant 3h.

- Ce milieu est aspiré et remplacé par un fixateur et dénaturant cellulaire (FixDenat) pour une durée de 30 min. Le FixDenat est ensuite enlevé.
- L'anticorps anti-BrdU couplé à la HRP est ajouté pour une période de 1h30.
- Différents lavages sont réalisés, ensuite est ajoutée une substance colorante contenant le substrat de la peroxydase (TMB : tétramethyl-benzidine) pendant 10 min.
- Le produit de la réaction est mesuré par lecture de l'absorbance au lecteur Elisa (λ=450nm) endéans les 5min.

3.7. Test d'exclusion au Trypan Bleu

3.7.1. Principe

Le trypan bleu est un colorant qui pénètre dans les cellules dont la membrane cytoplasmique est altérée. Aussi les cellules dont l'intégrité membranaire est perturbée se colorent en bleu. Cette coloration nous permet d'estimer la proportion de cellules à perméabilité fortement altérée, autrement dit la proportion de cellules mortes.

Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer le pourcentage de cellules mortes après leur avoir ajouté différentes concentrations de doxorubicine. La doxorubicine est un agent pro-apoptotique, de la famille des anthracyclines, qui s'intercale dans la molécule d'ADN inhibant ainsi la topoisomérase II (détorsion de l'ADN). De plus, le métabolisme de ces molécules produit des radicaux libres.

3.7.2. Matériel

- Trypan bleu (Gibco)
- Doxorubicine (Roche) aliquotée à une concentration de 17,24 mM

3.7.3. Méthode

- Les cellules sont cultivées dans une plaque 6 puits pendant 24h.
- La doxorubicine est ajoutée pendant une nuit.
- Les cellules vont subir une trypsinisation classique jusqu'à l'étape de resuspension dans un volume de 1ml.
- Les milieux dans lesquels elles étaient seront conservés afin de recueillir les cellules s'y trouvant suite à la mort cellulaire
- Un échantillon de chaque tube est prélevé et dilué 5 fois dans du PBS 1% stérile et dans du trypan bleu.
- Les cellules colorées et non colorées sont ensuite comptées à l'aide d'une cellule de Bürker permettant ainsi d'évaluer la mortalité cellulaire.

3.8. Etude de survie cellulaire avec le test Cell Counting Kit-8

3.8.1. Principe

Ce kit CCK-8 (Dojindo Laboratories) permet l'étude aisée de la cytotoxicité cellulaire grâce à l'utilisation d'un sel de tétrazolium, WST-8. Ce sel produit un colorant formazan jaune lors de sa réduction par l'action des déshydrogénases cellulaires, et en présence d'un transporteur d'électron : le 1-methoxy PMS. Le taux de colorant généré sera directement proportionnel au nombre de cellules viables. Ainsi, ce test va nous permettre de confirmer les résultats obtenus avec le trypan bleu.

3.8.2. Matériel

Des cellules TPC1
Une bouteille de réactif « tout en un contenant » le WST et du 1-methoxy PMS

3.8.3. Protocole

- ensemencer 5000 cellules par puits sur une plaque 96 puits
- incuber les cellules pendant 24h à 37°C
- Ajouter les différentes combinaisons de doxorubicine (doxorubicine 25µM seule, doxorubicine 25µM et ET-1 10nM, doxorubicine 25µM et BQ-610 10µM et doxorubicine 25µM, ET-1 10nM et BQ-610 10µM) pendant 16h.
- Ajouter 10µl de solution tout en un et incuber à 37°C pendant 3h.
- Mesurer l'absorbance à 450nm.

3.9. Marquage par immunocytochimie

3.9.1. Principe

Ces marquages utilisent la spécificité des anticorps vis-à-vis de leurs antigènes pour localiser des molécules d'intérêt directement sur les cellules ; ensuite le principe est de révéler la présence de cet anticorps par un anticorps secondaire couplé à un marqueur. Ce marqueur peut être un fluorochrome, une enzyme, voire le système d'amplification biotine-streptavidine associé au marqueur. Ce dernier est ensuite détecté par microscopie.

3.9.2. Matériel

(Pour l'immunohistochimie de Akt)
- Les cellules utilisées sont des TPC1 cultivées sur des lamelles en verre à raison de 100.000 cellules/9,6cm^2 ;
- Les anticorps primaires (Akt et Akt-phosphorylé) sont des anticorps de lapin (Cell Signaling); dilution 1/200 ;
- Les anticorps secondaires sont des anti-IgG de lapin couplés à au flurochrome Alexa 488 et donnés par le laboratoire de biologie cellulaire ; dilution 1/500 ;

3.9.3. Méthode

- Rincer 3 x les couvre-objets avec du PBS;
- Fixer les cellules pendant 10 min avec du paraformaldéhyde (PAF) 4% à température ambiante;
- Rincer 3 fois au PBS ;
- Perméabiliser pendant 5 min à température ambiante au PBS /Triton 1% ;
- Rincer 2 fois avec du PBS-BSA 1% ;
- Incubation avec les anticorps primaires pendant 2h ;
- Rincer 3 fois 5 min dans du PBS-BSA 1%;
- Incubation avec les anticorps secondaires couplés au flurochrome Alexa 488 pendant 1h à température ambiante;
- Rincer 3 fois au PBS-BSA 1% et terminer par un lavage au PBS seul ;
- Un marquage des noyaux a été réalisé au TO-PRO 3 pendant 35 min. ;
- Montage : déposer une goutte de Mowiol préchauffé à 56°C sur une lame; placer les lames à plat dans une boîte et laisser solidifier une nuit à 4°C ;

- Observation au microscope confocal (Leica Microsystems Heidelberg).

3.10. Mesure du calcium cytosolique au spectrofluorimètre

3.10.1. Principe

Mesurer la variation de calcium intracellulaire en réponse à l'ajout d'ET-1 est un moyen de démontrer la fonctionnalité des récepteurs à ET-1.
En pratique, pour mesurer la concentration en calcium cytosolique au spectrofluorimètre, nous avons utilisé la sonde Fura-2. Cet indicateur fluorescent est incubé sous sa forme estérifiée (Fura-2 AM) qui lui permet de rentrer dans les cellules. Ensuite, les estérases endogènes le désestérifient, cette forme active se lie de façon stoïchiométrique avec les ions calcium. La perte du groupement ester empêche la sortie de la sonde de la cellule ainsi que l'entrée de celle-ci dans les différents organites cellulaires. Ainsi, la sonde permet de mesurer uniquement le calcium cytosolique.
La liaison du calcium au Fura-2 déplace le pic d'excitation de la sonde de 380nm à 340nm. De ce fait, la sonde libre soumise à une longueur d'onde d'excitation de 380nm et la sonde liée soumise à une longueur d'onde d'excitation de 340nm donneront des valeurs qui serviront à établir des rapports. Le signal sera mesuré à 510nm. Grâce à cette méthode des rapports (Grynkiewicz et al, 1985), la concentration en calcium cytosolique peut être calculée.

3.10.2. Matériel

- Fura-2AM 2µM (à conserver à l'abri de la lumière)
- Probénécid 2,5 mM
- Solution physiologique ajustée à pH 7,4 et composée de NaCl 140mM ; KCl 5mM ; $MgCl_2$ 1mM ; Hepes 10mM ;D-glucose 5,5mM ;$CaCl_2$ 1,2mM.
- EGTA 20mM
- Ionomycine 10µM
- ET-1 10nM, 100nM et 200nM
- Triton X-100 0,1%
- Cellules TPC1 500 .000/25cm^2

3.10.3. Méthode :

3.10.3.1. Chargement des cellules

- Incuber les cellules 30 min à 37°C avec la solution physiologique contenant du probenecid 2,5mM et du Fura-2 AM 2µM ;
- Trypsiniser les cellules de manière classique ; après la centrifugation, suspendre les cellules dans 2 ml de solution physiologique + probenecid ;

3.10.3.2. Mesure de la fluorescence

Le spectrofluorimètre (Aminco SPF) mesure la fluorescence émise par la sonde ;
Le monochromateur est placé successivement à 340 et à 380nm pour la longueur d'onde d'excitation. L'émission sera de 510nm .Les différentes mesures s'effectuent comme suit ; dans la cuvette ;

- un échantillon de cellules + solution physiologique avec probenecid = réponse basale
- solution physiologique avec probenecid = blanc
- cellules + ionomycine = R max

- cellules +EGTA avec Triton 0,1% = R min
- cellules + ET-1 10nM, 100nM ou 200nM = évaluation de l'effet de ET-1 sur le calcium

3.10.3.3. Formule pour calculer le calcium intracellulaire :

$[Ca^{2+}] = Kd . [(R-Rmin) / (Rmax-R)]$

Où

- R= rapport de fluorescence à 340/ fluorescence à 380
- Kd = 224nM à 20°C

Résultats

4. Résultats

4.1. RT-PCR

4.1.1. But de l'expérience

Avant d'étudier les effets de ET-1 dans les deux lignées cellulaires de cancer thyroïdien choisies (FTC133 et TPC1), il faut d'abord y vérifier la présence des différents composants du « système endothéline », à savoir le précurseur de ET-1 (la pré-pro-endothéline ou PP-ET), l'enzyme qui fournit la forme active de ET-1 (ECE), ainsi que le récepteur qui intervient dans les processus cancéreux (ET_A). Nous y avons ajouté le récepteur ET_B afin d'envisager son rôle éventuel dans les carcinomes thyroïdiens. Cette détection de la présence du système ET se fait grâce à la RT-PCR, technique en plusieurs étapes : l'extraction de l'ARN total de chaque lignée, la transcription reverse de l'ARN en ADN et enfin la PCR.

4.1.2. Extraction d'ARN total

Trois millions de cellules FTC133 et TPC1 ont été récoltées pour en extraire l'ARN au moyen du kit Qiagen. La quantité d'ARN total obtenue pour chaque lignée (29 µg pour FTC133 et 99 µg pour TPC1) nous a permis de réaliser une RT-PCR qui ne nécessite que 2 µg d'ARN. Afin de vérifier l'intégrité de ces ARN totaux, 1 µg d'ARN total de chaque lignée a été déposé sur gel d'agarose 1%. L'ARN total étant principalement constitué d'ARN ribosomal, il est détecté sous forme de deux bandes correspondant aux deux plus lourdes des trois sous-unités : 28S, 18S et 4S des eucaryotes. Les ARN obtenus permettaient alors de pratiquer l'étape de transcription inverse.

4.1.3. Détection des ARNm de PP-ET, ECE, ET_A et ET_B

Une PCR a été pratiquée sur l'ADNc des FTC133 et des TPC1. Dix µl des produits de cette PCR ont été déposés et ont migré sur gel d'électrophorèse. Les résultats obtenus (**Fig. 4.1 A et B**) montrent une amplification spécifique, correspondant aux tailles attendues, pour chaque paire d'amorce dans la lignée FTC133 et pour toutes les paires sauf celle d'ET_B dans la lignée TPC1. L'absence de détection de l'ARNm du récepteur ET_B dans les cellules TPC1 a été vérifiée à plusieurs reprises. Il faut aussi remarquer que l'amplicon de PP-ET est moins facile à distinguer dans les cellules TPC1, mais il est présent. Un contrôle positif a été réalisé en amplifiant l'ARNm de la GAPDH, une enzyme connue comme ubiquiste dans les cellules et transcrite à taux constant. Le contrôle négatif consiste à remplacer l'ADNc par de l'eau pour détecter une éventuelle contamination d'origine extérieure à l'échantillon.

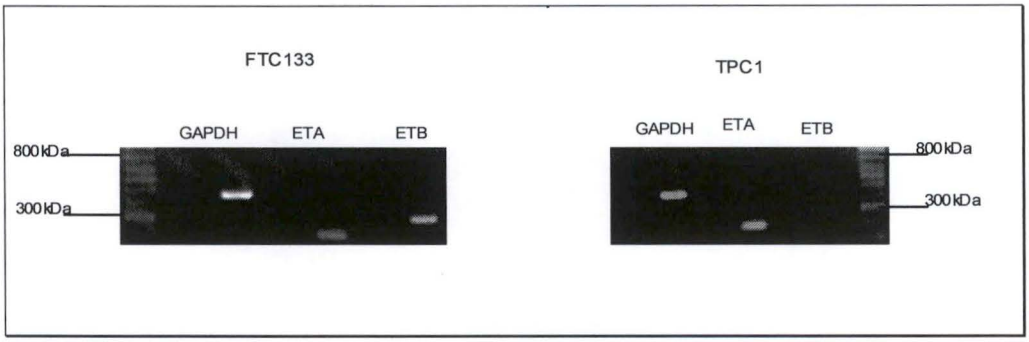


Figure 4.1.A. RT-PCR des récepteurs ET_A et ET_B, ainsi que de GAPDH, dans les lignées FTC133 et TPC1.

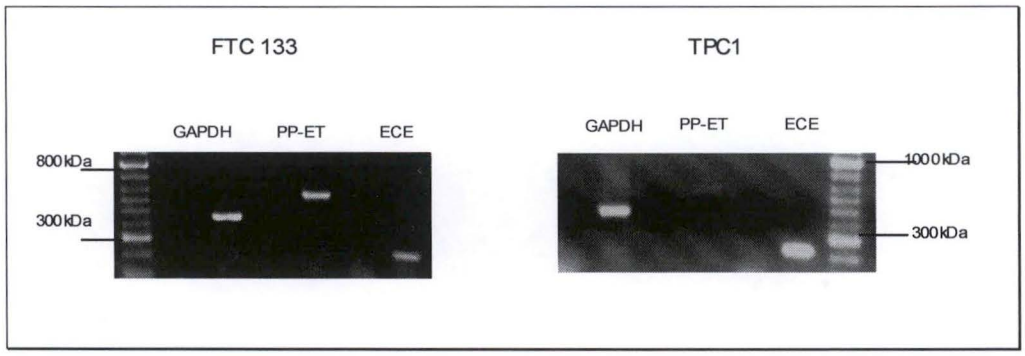


Figure 4.1.B. RT-PCR de la pré-pro-endothéline (PP-ET), et de l'enzyme de conversion de ET (ECE), ainsi que de GAPDH, dans les lignées FTC133 et TPC1.

Nous pouvons conclure que les lignées FTC133 et TPC1 possèdent tous les composants requis (PP-ET, ECE et récepteurs à ET) pour fabriquer ET-1 et pour y répondre, à la nuance que les cellules TPC1 sont dépourvues de récepteur ET_B. Ce récepteur est beaucoup plus rarement évoqué dans les effets prolifératifs ou anti-apoptotiques de ET-1 par rapport au récepteur ET_A. Si une différence de réponse à ET-1 apparaît entre les deux lignées, elle pourrait être due à l'absence de ET_B chez les TPC1.

Il faut garder à l'esprit que la présence des ARNm des composants du système ET ne signifie pas nécessairement synthèse protéique de ces molécules, ni leur fonctionnalité. C'est pourquoi nous avons cherché à révéler la présence de la protéine indispensable à la fonction de ET-1, à savoir le récepteur ET_A, au moyen d'un anticorps polyclonal obtenu commercialement (Alexis Biochemicals). Deux méthodes différentes ont été utilisées : le Western blot (cf. ci-après) et l'immunocytochimie. La seconde méthode n'a pas permis de révéler de signal spécifique dans les cellules FTC133 ou TPC1 (résultats non montrés), bien que le même anticorps ait donné des résultats probants en immunohistologie sur des prélèvements de thyroïde humaine (Donckier *et al.*, 2003). Il s'agit probablement d'un échec technique.

Quant à la réponse fonctionnelle des cellules thyroïdiennes cancéreuses à ET-1, elle a été recherchée au moyen de la mesure du calcium intracellulaire et de la phosphorylation de Akt (aussi connu comme protéine kinase B ou PKB).

4.2. Western blot pour le récepteur ET_A

Dans ce cas, nous avons travaillé sur des homogénats de FTC133 et de TPC1. Pour chaque échantillon cellulaire, 20 µg de protéines ont été déposés sur gel. L'anticorps primaire anti-ET_A a été dilué 1/200 ou 1/500 dans du PBS-BSA 1% et l'anticorps secondaire (anti-IgG de mouton couplé à la HRP) a été dilué 1/5000 dans du PBS-BSA 1%. La taille attendue du récepteur est d'environ 50 kDa. Les résultats sont indiqués à la **Fig. 4.2**.

On observe une bande dans la gamme de PM attendue, entre 75kDa et 46kDa, pour les deux types d'homogénats.

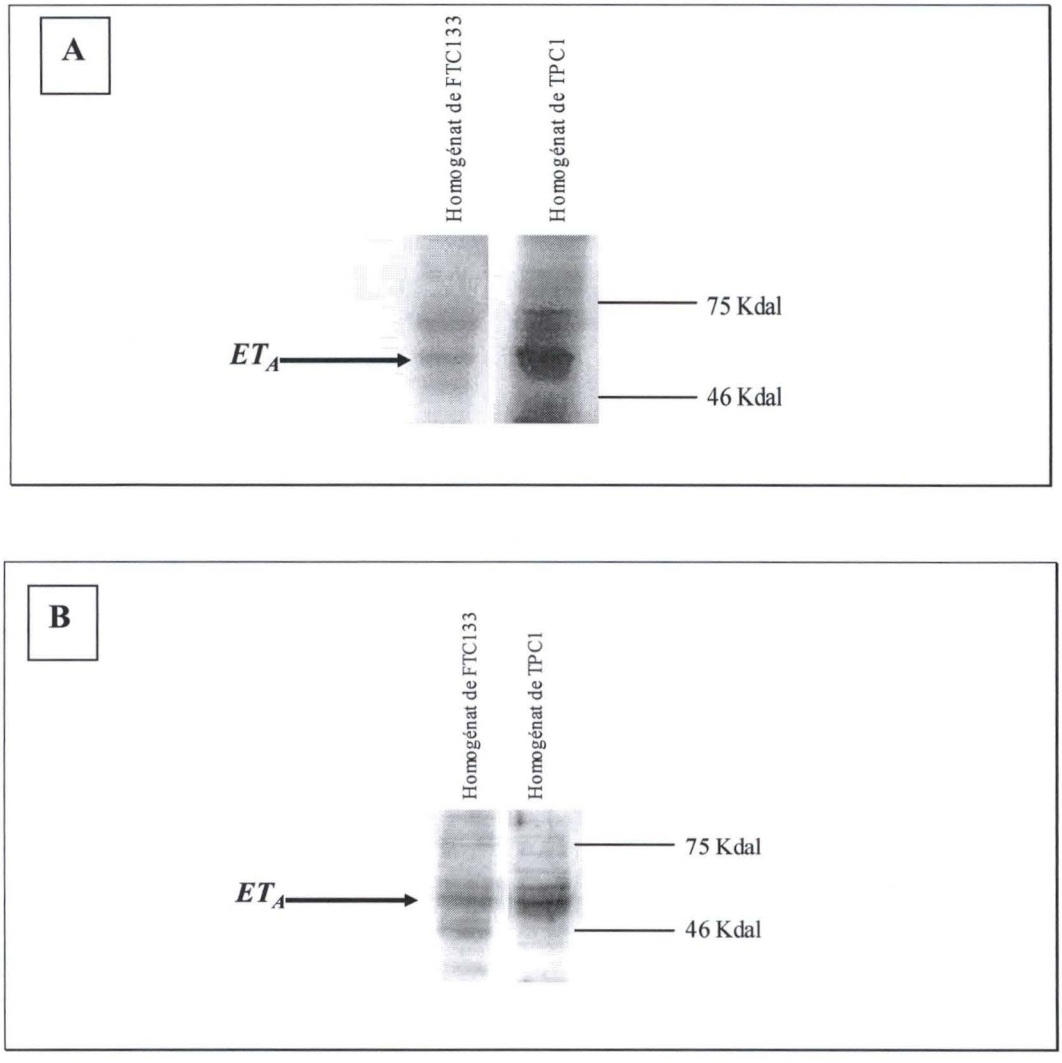


Figure 4.2. Analyse en Western Blot du récepteur ET_A au moyen d'un anticorps polyclonal (A, dilution 1/200 ; B, dilution 1/500)

4.3. Test de viabilité cellulaire

4.3.1. But de l'expérience

Ayant démontré la présence du récepteur ET_A, nous pouvons passer à la mesure de la réponse à ET-1 exogène. Comme certaines de ces expériences nécessiteront des temps d'exposition prolongés à un milieu sans FBS (jusqu'à 5 jours), nous allons au préalable nous assurer de la viabilité cellulaire dans ces conditions. Une des façons aisées de le faire est de doser la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) qui est libérée dans le milieu.

La LDH est une enzyme cytosolique libérée par des cellules à l'intégrité membranaire altérée ou mortes. Une mesure spectrophotométrique indirecte de la LDH (via la NADH) nous renseigne sur la proportion de cellules mortes.

4.3.2. Résultats

Pour chaque lignée cellulaire, deux boîtes de 25 cm^2 contenant environ 500 000 cellules ont été utilisées. Après 24 h de culture en conditions standard, une boîte est privée de FBS et l'autre pas. A partir de ce moment, les cellules seront laissées 24 h, 48 h ou 5 jours en culture. Au terme de cette culture, les cellules et le milieu sont récupérés pour le dosage enzymatique de la LDH (**Fig. 4.3**).

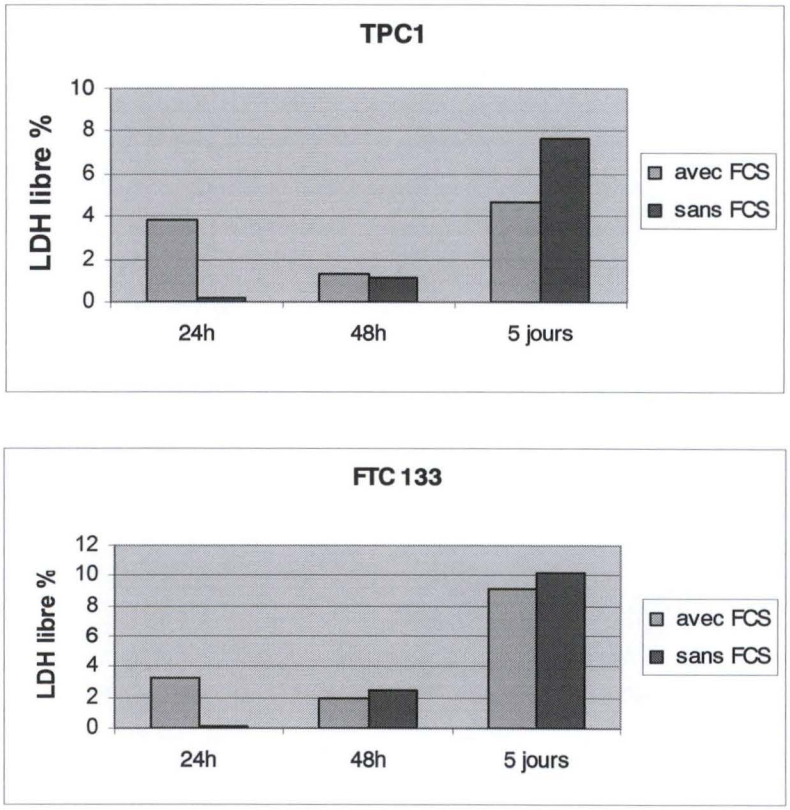


Figure 4.3. Dosage de la LDH libre (exprimée en pourcent). (A) pour les cellules TPC1 à 24 h, 48 h et 5 jours et (B) pour les FTC133. En gris clair, les cellules cultivées avec FBS ; en gris foncé, les cellules cultivées sans sérum.

4.3.3. Interprétation

Les observations réalisées sur les deux lignées cellulaires ont montré qu'elles résistent très bien à la privation de FBS. Aussi, l'expérience n'a pas été réitérée.

Ces faibles différences de survie, pour une même lignée cellulaire, entre les cellules avec ou sans sérum, même après 5 jours de privation, s'expliquent probablement par la nature cancéreuse de ces deux lignées. Par exemple, il est connu que les TPC1 possédant des réarrangements spontanés au niveau de l'oncogène RET peuvent croître sans sérum (Carlomagno *et al,* 2003). Quant aux cellules FTC133, elles présentent des modifications chromosomiques dont des mutations au niveau de p53, justifiant également une croissance quasi indépendante du FBS.

Considérons à présent les valeurs : après 5 jours de culture sans sérum, la mortalité ne dépasse pas 10% pour les FTC133 et 8% pour les TPC1. Ces valeurs sont faibles quand on sait qu'en général, des cellules en culture sont considérées comme « valables » si leur mortalité mesurée par la perte de LDH n'excède pas les 20%. Cela s'explique également par la nature cancéreuse des cellules.

En résumé, nous estimons les cellules aptes à subir les longues périodes de privation en sérum requises pour les tests de prolifération.

4.4. Test de prolifération au BrdU

4.4.1. But de l'expérience

ET-1 est connu comme agent mitogène dans de nombreuses lignées cellulaires. Nous désirions évaluer le potentiel prolifératif de ET-1 sur nos deux lignées de cancer thyroïdien. Classiquement, pour mesurer la synthèse d'ADN, une incorporation de thymidine tritiée est réalisée. Mais cette technique est assez fastidieuse. Nous avons utilisé la technique, plus simple, du BrdU. Ce procédé est un cas particulier de marquage immunologique.

Une remarque importante doit être faite, quant au choix du temps d'exposition à ET-1 exogène. La littérature ne présente pas ET-1 comme agent prolifératif pour des cellules cancéreuses lorsque ces effets sont étudiés sur des temps courts d'environ 2 à 9 heures (par exemple Peduto Eberl *et al,* 2003). Par contre, c'est après 72h que les effets prolifératifs dans des lignées humaines cancéreuses apparaissent (par exemple : Shichiri *et al,* 1997) Ainsi, nos efforts se sont surtout consacrés aux résultats que pouvaient apporter des temps longs d'exposition à ET-1, soit 5 jours.

4.4.2. Réalisation pratique

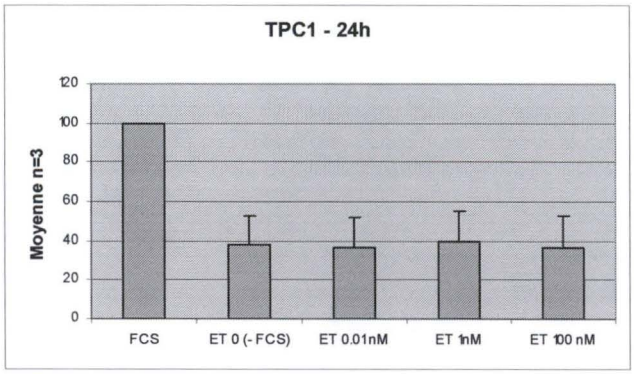
Ce test est réalisé au moyen du kit BrdU de Roche. Les cellules sont cultivées sur des plaques de 96 puits, adéquates pour la lecture d'absorbance au photomètre (Model 450 Microplate Reader). Les TPC1 sont ensemencées à raison de 3500 cellules/puits, un nombre déterminé comme optimal (expériences non montrées) pour leur croissance tout en évitant la saturation lors de la lecture du signal. Les FTC133 sont ensemencées à 5000 cellules/puits : car leur croissance est un peu plus lente que celles des TPC1.

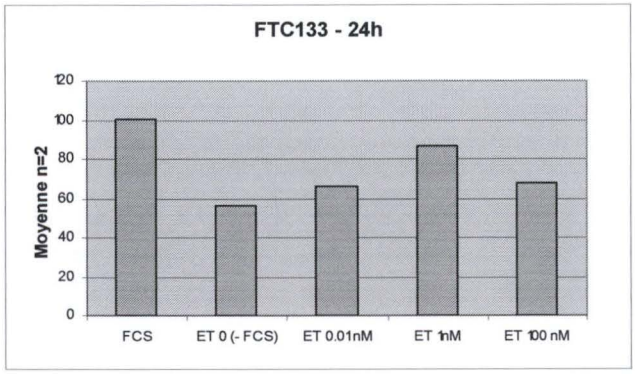
Les premières expériences ont servi à la mise au point des différents temps évoqués dans la partie *Matériel & Méthodes* (Résultats non montrés).

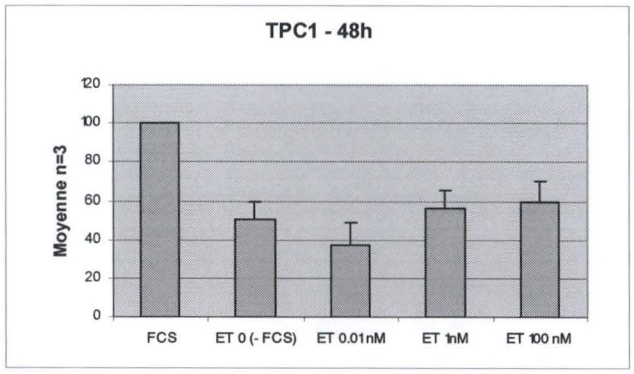
Par après, la stimulation des cellules par ET-1 a débuté. Les cellules étaient généralement disposées en colonnes de huit puits. Les mesures sont ainsi réalisées huit fois, ce qui diminue la variabilité. Quant aux colonnes, elles représentaient les conditions de culture des cellules.
Le protocole suivant était respecté : après ensemencement des cellules en présence de FBS sur les plaques, nous attendions 24 h pour atteindre la quiescence. Ensuite, une colonne contrôle a reçu du FBS, les autres en été ont privées pendant 24 h. Au terme de ces 24 h, les colonnes ont reçu respectivement 0, 0.01, 1 et 100 nM de ET-1. Puis ET-1 a été incubée avec les cellules durant 24, 48, 72 ou 120 heures (5 jours). Un des problèmes rencontrés est la nature instable du peptide ET-1. Pour amoindrir ce fait, nous avons renouvelé ET-1 du milieu toutes les 48 h.

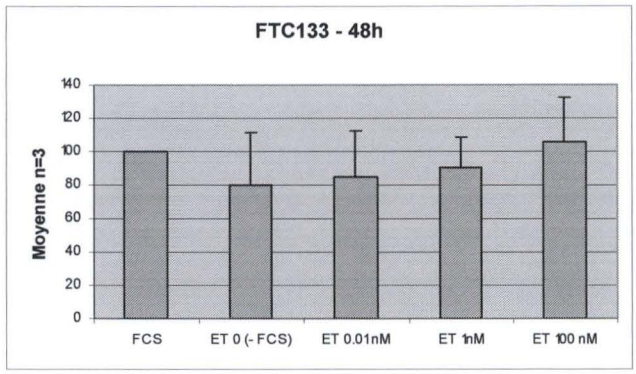
4.4.3. Résultats

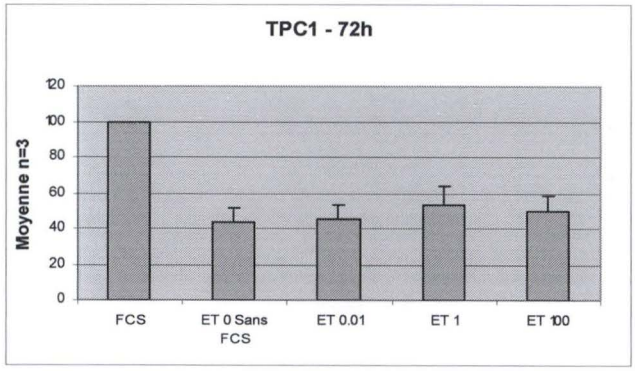
Ce que nous mesurons dans ces expériences, ce sont des absorbances qui reflètent le taux de synthèse d'ADN , autrement dit la prolifération cellulaire. Puisque nous avons observé, dans la grande majorité des expériences, une prolifération plus importante des cellules TPC1 et FTC133 cultivées avec FBS par rapport à celles sans sérum, nous avons arbitrairement choisi de considérer la valeur obtenue pour le « FBS » comme une prolifération de 100%. Il s'agit de notre référence. A partir de celle-ci, nous avons déterminé le pourcentage d'absorbance pour les cellules privées de FBS et traitées ou non avec des doses croissantes de ET-1.
Les expériences ont été réalisées au moins trois fois pour les TPC1 et au moins deux fois pour les FTC133. Cette différence provient de la culture plus délicate (croissance assez lente) des FTC133.
Les histogrammes présentés à la **Figure 4.4** représentent la somme de trois ou deux expériences.

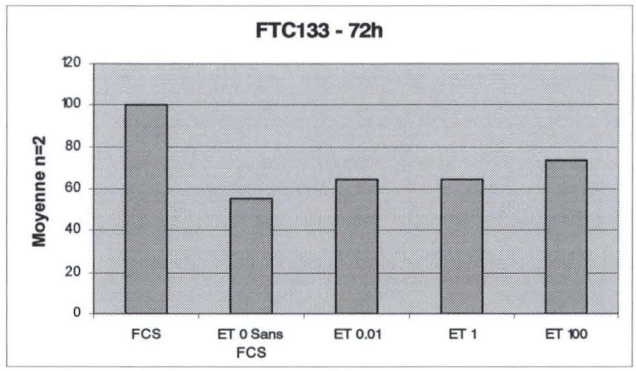


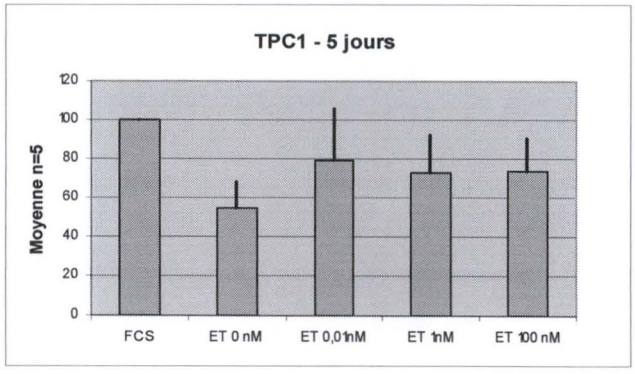












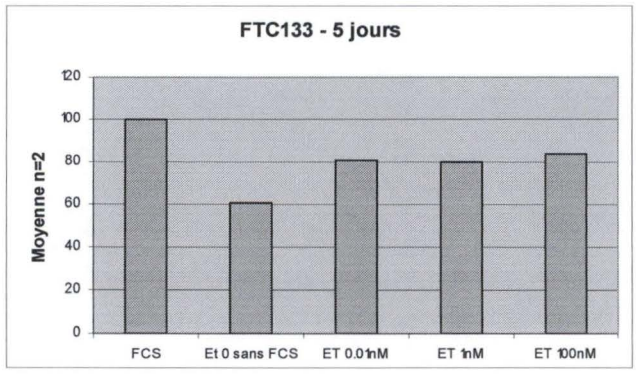


Figure 4.4 Mesure de la prolifération des cellules TPC1 et FTC133, dans un milieu sans sérum, en absence ou en présence de 3 concentrations croissantes de ET-1 (exprimées en nM).

L'examen visuel des histogrammes ne montre pas d'effet majeur de ET-1 sur la prolifération, et cela à aucun des temps testés. Le test ANOVA-1 se conclut d'ailleurs par l'acceptation de l'hypothèse nulle pour chacune des lignées en ce qui concerne l'effet de ET-1. En d'autre terme, il n'a pas été possible de détecter des modifications de la prolifération cellulaire en présence et en absence de ET-1 dans des cellules privées de FBS ; nous devons considérer que toutes les moyennes de l'expérience sont semblables.

4.4.4. Commentaires

Ces expériences se sont révélées beaucoup plus difficiles que ne le laissait supposer l'utilisation d'un « kit » de dosage apparemment classique. En fait, l'ensemble « cellules cultivées – système immunoenzymatique » est grevé d'une grande variabilité. Par exemple, malgré une standardisation maximale de tous les paramètres, il reste une variable mal contrôlable : le nombre de cellules par puits. Bien que nous ayons tenté de garder tant que possible le même nombre de cellules par puits dans chaque expérience, elles ont tendance à former des amas rendant ardu leur comptage précis. Il est impossible de combiner dosage protéique et détection du BrdU. Ainsi des variations dans la densité cellulaire d'une expérience à l'autre sont inévitables. Il ne devrait toutefois pas s'agir d'un biais.

Parmi les autres difficultés rencontrées, il est probable que le temps de demi-vie du peptide ET-1 dans le milieu soit relativement limité. Rappelons que le milieu a été renouvelé toutes les 48 h, en estimant à partir de données de la littérature que cet intervalle était suffisant. De nombreuses expériences in vitro ont montré qu'on pouvait détecter des effets de ET-1 au bout de plusieurs jours d'exposition chez des cellules privées de sérum. Il serait néanmoins intéressant de pouvoir quantifier précisément le temps de demi-vie de ET-1 exogène dans nos lignées grâce à un kit de détection de ET-1.

Les effets prolifératifs de ET-1, même à la concentration de 100 nM, restent largement inférieurs à ceux du FBS. Ce dernier contient visiblement des facteurs de croissance plus importants que ET-1, comme par exemple EGF (Epidermal Growth Factor). On sait d'ailleurs que les effets de EGF et de ET-1 sont synergiques dans certaines lignées cellulaires (Bagnato *et al,* 1997). Tout ceci contribue à la difficulté de détection de l'effet réel qu'a ET-1 sur les lignées choisies. Sans oublier qu'il reste aussi l'inconnue d'une production de ET-1 endogène. Celle-ci peut très bien être suffisante à la cellule, l'ajout de ET-1 exogène étant alors inutile. Dans ce cas aussi un kit de dosage s'avérerait utile.

4.5. Test de l'apoptose par exclusion au trypan bleu

4.5.1. But des expériences

Selon la littérature, le potentiel d'induction tumorale de ET-1 pourrait être lié à son rôle anti-apoptotique. En effet, de récents résultats suggèrent que ET-1 module l'apoptose induite par des traitements chimiques et agit comme facteur de survie pour des cellules endothéliales, des fibroblastes, des cellules musculaires lisses, des carcinomes coliques et des glioblastomes. Nous souhaitons démontrer cet effet de ET-1 sur la lignée cellulaire TPC1. Par facilité, nous avons concentré nos efforts sur la lignée TPC1 en raison de la multiplication assez lente des FTC133.

Dans un premier temps, il faut tester sur les cellules TPC1 les effets de l'agent pro-apoptotique choisi , la doxorubicine , un médicament anti-cancéreux utilisé en chimiothérapie. Une approche simple est de pratiquer un test d'exclusion au trypan bleu pour déterminer la

mortalité cellulaire induite par la doxorubicine. Dès que cela sera réalisé, nous pourrons ainsi pratiquer cette approche de trypan bleu pour déterminer les effets de ET-1 sur l'apoptose induite par la doxorubicine.

Ensuite, pour nous assurer que cette mortalité est bien spécifique à l'apoptose, un gel d'agarose devrait détecter l'échelle d'ADN caractéristique des cellules apoptotiques.

4.5.2. Effet de la doxorubicine

Pour rappel, la doxorubicine est un antibiotique doté d'une activité anti-tumorale. Sa structure lui permet de s'intercaler entre deux paires de bases de l'ADN, ce qui perturbe la topo-isomérase II dans son action de stabilisation de la structure de l'ADN. De plus, cette molécule est apte à former des radicaux libres, qui, dans une moindre mesure, pourraient aussi intervenir dans la cytotoxicité antitumorale .
L'expérience consiste à soumettre des cellules, durant 16h, à différentes concentrations de doxorubicine comprises entre 0 et 50 µM. La mortalité cellulaire est évaluée par comptage des cellules colorées. Il est à noter que toutes les expériences se font en présence d'un milieu contenant du FBS. En effet, sachant que l'apoptose est stimulée par une privation en facteurs de croissance, nous avons voulu éviter un effet apoptotique additionnel.

Les résultats de la **Figure 4.5** nous montrent l'efficacité de la doxorubicine à induire l'apoptose dans la lignée TPC1, et cela d'une manière proportionnelle.

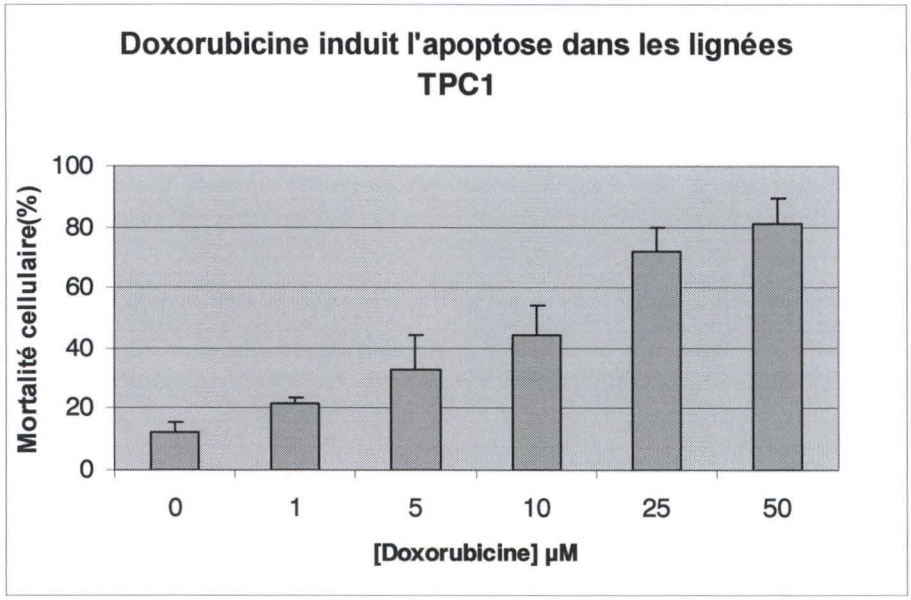


Figure 4.5. Mortalité cellulaire (%), évaluée par exclusion au trypan bleu, induite par différentes concentrations de doxorubicine (µM) sur les cellules TPC1 après 16h de traitement. Les résultats sont la moyenne de 3 expériences.

En conclusion, nous pouvons utiliser la doxorubicine comme agent inducteur de l'apoptose sur les TPC1, ainsi que travailler avec une concentration de 25 µM semblant adéquate pour induire l'apoptose.

4.5.3. Effet de l'endothéline sur l'apoptose induite par la doxorubicine.

Le même genre d'expérience a été réalisé, mais cette fois les cellules ont été exposées d'office à une dose de doxorubicine de 25 μM, avec ou sans addition d'une autre substance.
Les différents traitements cellulaires s'expliquent de la manière suivante :

- la doxorubicine seule sert de contrôle d'induction d'apoptose ;
- puis l'effet de ET-1 exogène à 10 nM est testé ;
- ensuite, dans l'idée de déterminer l'implication de ET-1 endogène dans une éventuelle résistance à la doxorubicine, nous avons utilisé un antagoniste peptidique spécifique des récepteurs ET_A : le BQ-123. Ce peptide cyclique est le plus sélectif des antagonistes peptidiques spécifiques du récepteur ET_A.

Les résultats suivants ont été obtenus pour plusieurs expériences (**Figure 4.6**):

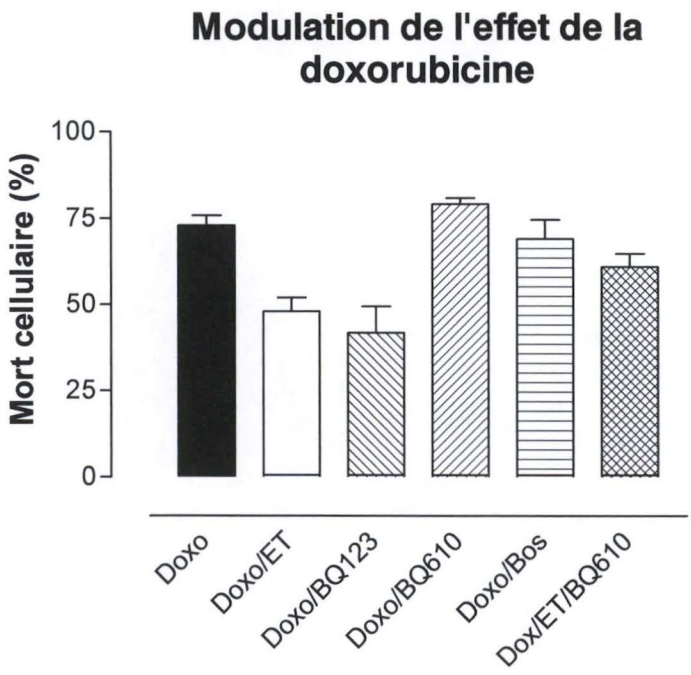


Figure 4.6. Analyse des effets de ET-1 et ses antagonistes sur l'apoptose induite par la doxorubucine (25μM). De gauche à droite, doxorubicine (25μM) seule, doxorubicine + ET-1 (10nM), doxorubicine + BQ-123 (10 μM), doxorubicine + BQ-610 (10μM), doxorubicine + bosentan (50μM), et doxorubicine + BQ-610 (10μM) + ET-1 (10 nM).

Une simple observation de l'histogramme révèle que la mortalité cellulaire induite par 25μM de doxorubicine seule (75%) reste proche de celle observée lors des expériences précédentes. De plus, une réduction de la mort cellulaire semble avoir lieu lors de l'ajout de ET-1 et de BQ-123.

Une analyse statistique par test de Kruskal-Wallis, un test non-paramétrique, montre un effet hautement significatif ($P < 0,0001$) du traitement des cellules. L'analyse s'est donc poursuivie par un test de comparaison multiple (test de Dunn) afin de déterminer quelle combinaison de doxorubicine différait vraiment des autres.

Ce test confirme l'effet inhibiteur significatif (P< 0,05) de ET-1 10nM sur l'apoptose induite par la doxorubicine 25 µM. Bien que l'inhibition reste partielle, nous pouvons penser que ET-1 participe à une forme de survie face à l'agression chimique occasionnée par la doxorubicine.

Nous obtenons aussi une différence significative (P< 0,05) entre l'effet de la doxorubicine seule et celui de l'association doxorubicine/BQ-123. Néanmoins, cette différence va dans un sens inattendu, à savoir que BQ-123 semble diminuer l'effet de la doxorubicine. Ce résultat n'est pas explicable à ce stade.

Au vu de ces résultats et comme un autre antagoniste spécifique des récepteurs ET_A était disponible, nous avons utilisé le BQ-610 (10µM). L'analyse statistique ne montre pas de différence d'effet significative lors de l'ajout de BQ-610 à un milieu contenant 25µM de doxorubicine. Si ce résultat est plus fiable que celui du BQ-123, il signifie que l'endothéline endogène n'a pas d'implication dans une éventuelle protection contre l'apoptose induite par la doxorubicine.

Nous souhaitions comparer l'efficacité des antagonistes peptidiques de type « BQ » (potentiellement instables vu leur structure) à celle des antagonistes non peptidiques. Bien que les lignées TPC1 ne possèdent pas de récepteurs ET_B, nous avons utilisé un antagoniste mixte des récepteurs ET_A et des récepteurs ET_B: le bosentan. Cette molécule est utilisée en clinique sous le nom de Tracleer®. Il aurait été intéressant de pouvoir tester les effets d'un autre antagoniste synthétique mais spécifique du récepteur ET_A tel que l'atrasentan (ABT-627), mais celui-ci ne nous était pas disponible.
Les effets du bosentan en association avec la doxorubicine ne sont pas significativement différents de ceux de la doxorubicine seule. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec le BQ-610 ; néanmoins le nombre d'expériences réalisées reste limité.

Par conséquent, nous pouvons avancer un effet anti-apoptotique de ET-1 exogène sur la lignée TPC1. Cependant, il faut considérer la non-spécificité de la technique du trypan bleu d'une part, et le nombre limité d'expériences d'autre part.
Un des premiers inconvénients du test d'exclusion au trypan bleu est que la mortalité induite par la doxorubicine n'est pas déterminée avec une grande exactitude. En effet, les cellules sont trypsinisées pour être détachées de leur puits, ce qui implique certainement qu'une partie des cellules colorées soient en réalité des cellules fragilisées par la trypsinisation et non par l'agent pro-apoptotique. En outre, nous ne pouvons dénombrer les cellules complètement lysées. Autre inconvénient, le comptage du nombre de cellules colorées présente une variabilité liée à l'expérimentateur. En effet, ce dernier doit déterminer les cellules qu'il considère comme colorées, parce que la coloration bleue n'est pas toujours homogène (certaines cellules sont complètement colorées, d'autres en partie ; et la coloration est plus ou moins foncée). Toutefois, toutes ces expériences ont été réalisées par la même personne qui a toujours compté les cellules selon les mêmes critères.

Malgré ces considérations, le trypan bleu nous apporte des renseignements qu'il serait judicieux d'exploiter avec des techniques plus sensibles de détection de l'apoptose.

4.5.4. Confirmation de l'effet de l'endothéline sur l'apoptose induite par la doxorubicine

Nous avons pu utiliser un kit de détection de la mort cellulaire appelé CCK8 (pour « *cell counting kit* »). Il s'agit d'un kit colorimétrique utilisant un sel de tétrazolium qui produit un

colorant hydrosoluble après réduction par les déshydrogénases cellulaires. Celles-ci sont des enzymes qui réalisent le transport des électrons dans la chaîne respiratoire. Autrement dit, les cellules en « bonne santé » réduiront davantage de sel en molécule colorante.
En pratique, les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits avec 5000 cellules TPC1 par puits et avec 4 puits pour chaque traitement. Le lendemain, les cellules sont traitées pendant 16h avec de la doxorubicine 25μM, soit seule, soit associée avec ET-1 (10nM), BQ-610 (10μM) ou ET-1 et BQ-610 simultanément. Nous n'avons cependant pas pu réitérer l'expérience avec le BQ-123.
Les résultats sont montrés dans la **Figure 4.7**:

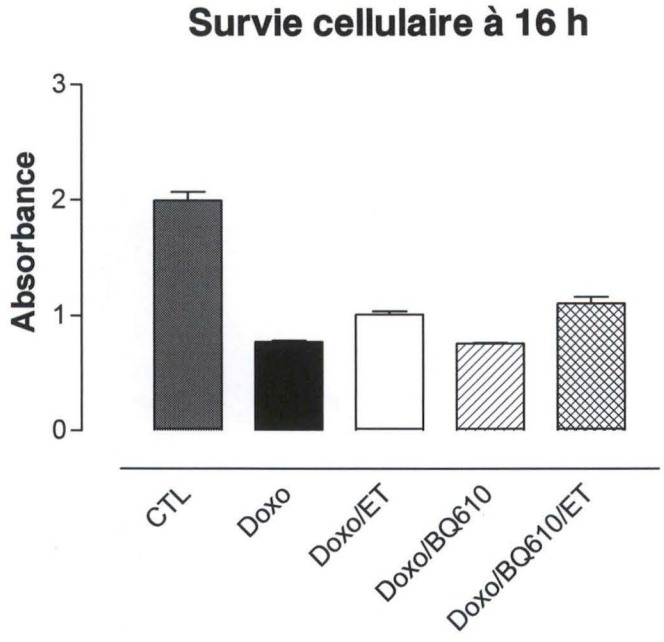


Figure 4.7. Survie cellulaire après différents traitements (voir texte). Le kit mesure la production de colorant formazan jaune par lecture de l'absorbance à 450nm.

L'observation du graphique montre d'emblée que l'ajout de ET-1 10nM à 25μM de doxorubicine ne restaure pas beaucoup la survie cellulaire. Il aurait été intéressant de pouvoir tester l'action de différentes concentrations de ET-1 sur différentes concentrations de doxorubicine pour déterminer si cet effet est généralisable. Dans ce cas, l'analyse statistique (ANOVA) détecte une différence très significative dans l'ensemble des données ($P < 0,0001$). Ensuite, le test de comparaison multiple de Bonferroni révèle que ces différences existent pour toutes les comparaisons entre le contrôle (cellules sans traitement) et les autres combinaisons ($P < 0,001$ à chaque fois), pour la comparaison entre les cellules traitées avec doxorubicine 25μM et celles traitées avec ET-1 ($P < 0,05$), ainsi que pour la comparaison entre les cellules traitées avec doxorubicine 25μM associée au BQ-610 et les cellules recevant doxorubicine et ET-1 ($P < 0,05$). Le résultat obtenu avec le BQ-610 tendrait à montrer un effet sur ET-1 endogène, mais rappelons que cette expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. Aussi, nous n'en tirerons pas de conclusion prématurée. Par contre, l'effet de ET-1 exogène, qui protège partiellement de l'apoptose, renforce ce qui avait été démontré au trypan bleu.

4.6. Test de l'apoptose par analyse de fragmentation internucléosomale de l'ADN

4.6.1. But de l'expérience

Confirmer de manière plus précise les expériences d'exclusion au trypan bleu. Dans l'introduction, il a été fait allusion à ce test qui permet de montrer la fragmentation de l'ADN en morceaux d'environ 200pb et multiples, ce qui est caractéristique des cellules apoptotiques.

4.6.2. Expérience

Des cellules TPC1 ont été cultivées avec le milieu classique contenant 10% de FBS. Vingt-quatre heures avant l'expérience, les milieux ont été changés pour tester l'effet de la doxorubicine 25 µM au contact des cellules pendant 16 heures. L'ADN des cellules TPC1 a été extrait, et une électrophorèse classique en gel d'agarose 1% a ensuite été réalisée.

4.6.3. Résultats

L'obtention d'une échelle n'a pas été possible, notamment à cause de la faible quantité d'ADN récoltée [entre 2,5 et 3,4µg] malgré tous nos efforts pour l'augmenter. Ce fait s'expliquerait en partie par la faible contenance en matériel cellulaire des lignées TPC1. Signalons par exemple la faible quantité d'ARN récoltée lors des extractions d'ARN dans le cadre des RT-PCR que nous avions dû réaliser en plusieurs fois pour en obtenir une quantité satisfaisante.

4.7. Mesure du calcium intracellulaire

4.7.1. But des expériences

Au vu des résultats obtenus en RT-PCR, nous avons pensé qu'il serait bon de démontrer les effets de ET-1 via ses récepteurs, et par là sa fonctionnalité. Il s'agit donc de montrer les voies de signalisation induites par ET-1. Les récepteurs ET_A étant couplés aux protéines G, cela nous laissait un large panel de cibles à étudier.
Nous avons songé à mettre en évidence un effecteur précoce dans les voies de signalisation, le calcium intracellulaire, et un effecteur « plus tardif », Akt ou PKB (cf. *Introduction*).
La littérature montre que ET-1 agit en augmentant la concentration en calcium intracellulaire ; ses effets sur Akt dépendent largement du type cellulaire, mais semblent toujours passer par une phosphorylation de Akt. Nous avons pensé que cette voie serait intéressante à analyser car elle intervient aussi dans l'apoptose. En effet, Akt phosphorylé induit par plusieurs voies l'inhibition de l'apoptose (Kandel *et al,* 1999).
Parmi les différentes méthodes de mesure, notre choix s'est porté sur la spectrofluorimétrie à l'aide de la sonde Fura 2AM. Nous avons évalué le devenir du calcium intracellulaire lorsque les cellules sont soumises à différentes concentrations de ET-1.

4.7.2. Résultats

Les six graphiques présentés dans la **Figure 4.8 A et B** montrent les résultats obtenus. Les graphiques de la **Figure 4.8 A** « réponse à ET-1 » représentent chacun une expérience où les cellules en suspension dans la cuvette reçoivent après quelques mesures de base une concentration croissante en ET-1. Cet ajout se fait de manière séquentielle, autrement dit la

substance est additionnée au mélange précédent sans rinçage entre les deux mesures (ce rinçage n'est pas techniquement possible lors de la manipulation). Il y a de ce fait un effet cumulatif plutôt qu'un pic unique lié à telle dose de ET-1. Dès lors, des contrôles ont été effectués exactement dans les mêmes conditions (ce sont les graphiques de la **Figure 4.8 B** « réponse au contrôle »). Dans les expériences contrôles, les cellules reçoivent des ajouts successifs de milieu sans ET-1, selon une chronologie identique. On constate une légère augmentation de calcium intracellulaire au fil du temps, ainsi que de petites élévations supplémentaires suite à l'ajout de certaines solutions contrôles.

Afin d'éliminer l'effet cumulatif des résultats, nous avons calculé l'élévation moyenne du calcium intracellulaire après ajout de ET-1. Ceci est représenté dans la **Figure 4.9**. Un test ANOVA-2 montre que les différences entre les expériences contrôles et les expériences avec ET-1 sont significatives ($P < 0,0001$), mais que les effets des concentrations de ET-1 utilisées ne diffèrent pas significativement entre eux.
Dès lors, nous pouvons conclure que l'ajout de ET-1 aux cellules TPC1, à des concentrations de 10 à 200nM, augmente la concentration en calcium intracellulaire. Ce résultat conforte la fonctionnalité de la voie ET dans les cellules TPC1. La méthode choisie n'est probablement pas assez sensible pour détecter un effet dose-réponse.

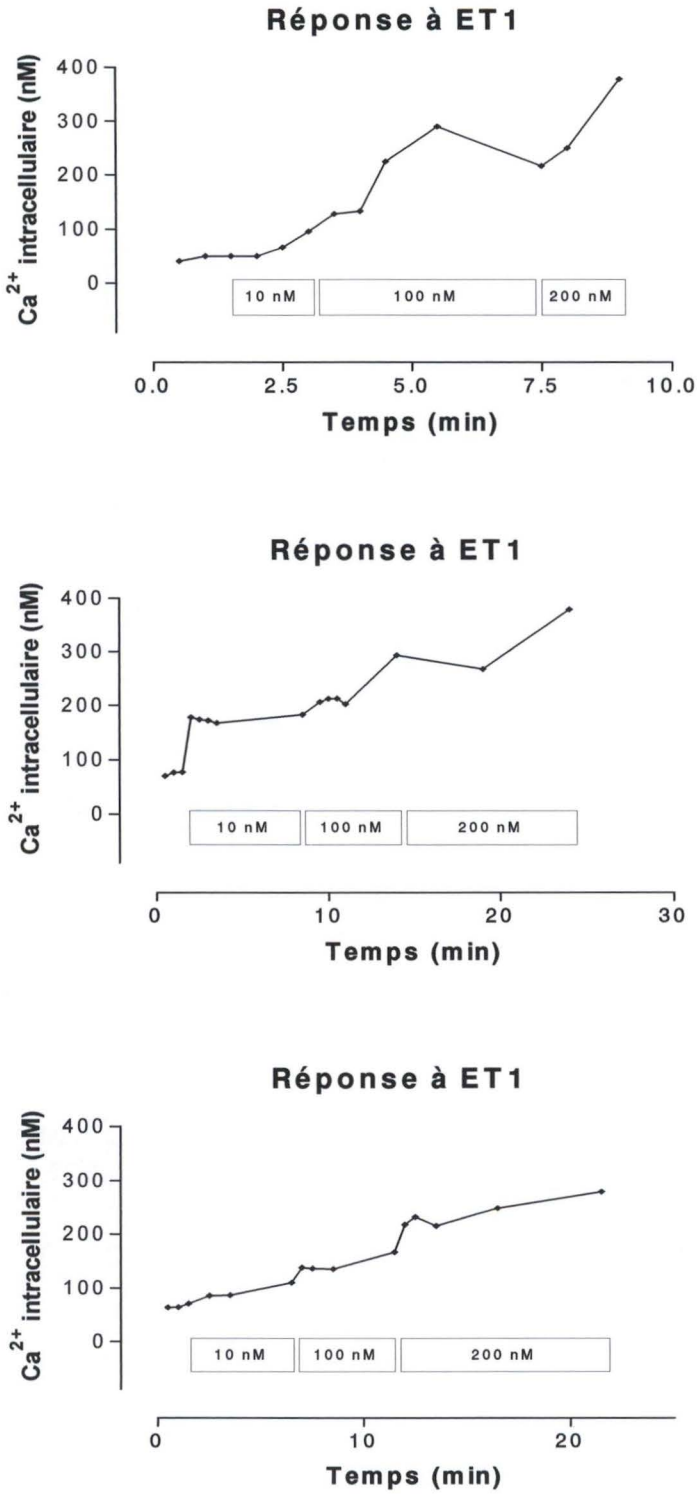


Figure 4.8 A. Evolution du calcium intracellulaire (nM) des cellules TPC1 en réponse à différentes concentrations de ET-1 (expériences individuelles).

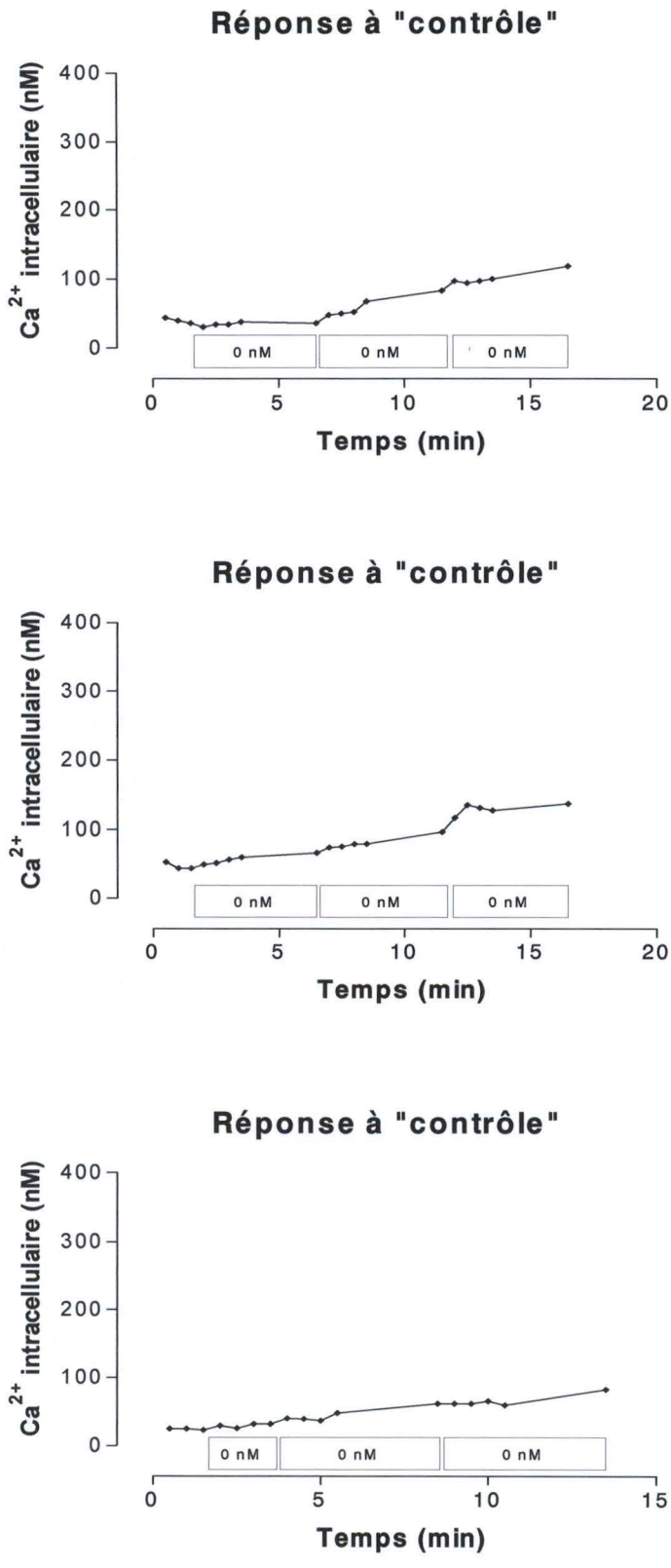


Figure 4.8 B. Evolution du calcium intracellulaire (nM) des cellules TPC1 en réponse à l'ajout d'un milieu sans ET-1 (expériences individuelles).

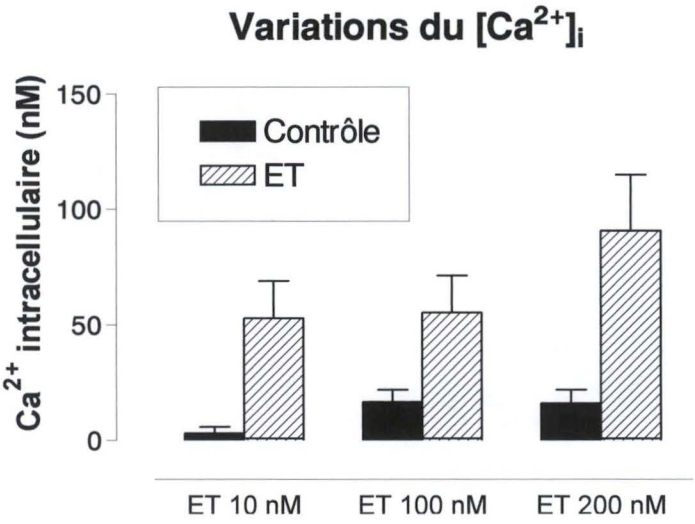


Figure 4.9. Variations moyennes (± ESM) de la concentration en calcium intracellulaire (par rapport à l'état qui précède immédiatement l'ajout de l'agoniste ou du contrôle) dans les cellules TPC1 soumises à différentes concentrations de ET-1 ou à des solutions contrôles.

4.7.3. Commentaires

La méthode de spectrofluorimétrie utilisée pour l'étude du calcium intracellulaire présente certaines limitations, comme des perturbations liées à l'ajout direct des solutions sur les cellules (turbulences, destruction des cellules), la sédimentation des cellules dans la cuvette, le manque de rapidité de passage d'une longueur d'onde à une autre, la mesure de calcium sur des cellules venant d'être trypsinisées, etc. Cependant, la technique fournit une des résultats reproductibles sur l'influence d'une substance exogène sur une population de cellules. Notre interprétation des résultats est ainsi nuancée, bien qu'il y ait preuve de l'effet de ET-1 sur les lignées TPC1. Ce résultat mériterait d'être affiné par l'emploi d'autres techniques, telles que la microscopie.

4.8. Phosphorylation de Akt

4.8.1. But de l'expérience

Dans la littérature, nous avons constaté que ET-1 modifie l'état de phosphorylation de Akt. Pour rappel, la forme phosphorylée représente la forme activée de la kinase. Notre idée était de déterminer l'état de phosphorylation de Akt par western blot sur des extraits de cellules TPC1 stimulées ou non par ET-1 exogène.
En parallèle au western blot, nous avons pratiqué une immunocytochimie pour la détection de Akt et Akt phosphorylé.

4.8.2. Résultats du Western Blot

Un premier western blot a été réalisé pour comparer les cellules contrôles à celles stimulées par ET-1 100nM (**Figure 4.10**). La taille attendue pour Akt est d'environ 50 kDa. Pour Akt non phosphorylé, une faible bande est visible dans le contrôle et dans les cellules stimulées. Cette bande est de même intensité, ce qui suggère une quantité semblable d'Akt non phosphorylé avec ou sans stimulation par ET-1. Quant à Akt phosphorylé, la situation est la même (pas de différence avec ou sans ET-1), mais cette fois la bande est de plus forte intensité. Aussi, on en conclut que, dans les cellules TPC1, Akt est présent sous sa forme

phosphorylée et non phosphorylée; et qu'il n'y a pas de différence de phosphorylation manifeste entre des cellules exposées à ET-1 exogène ou non.

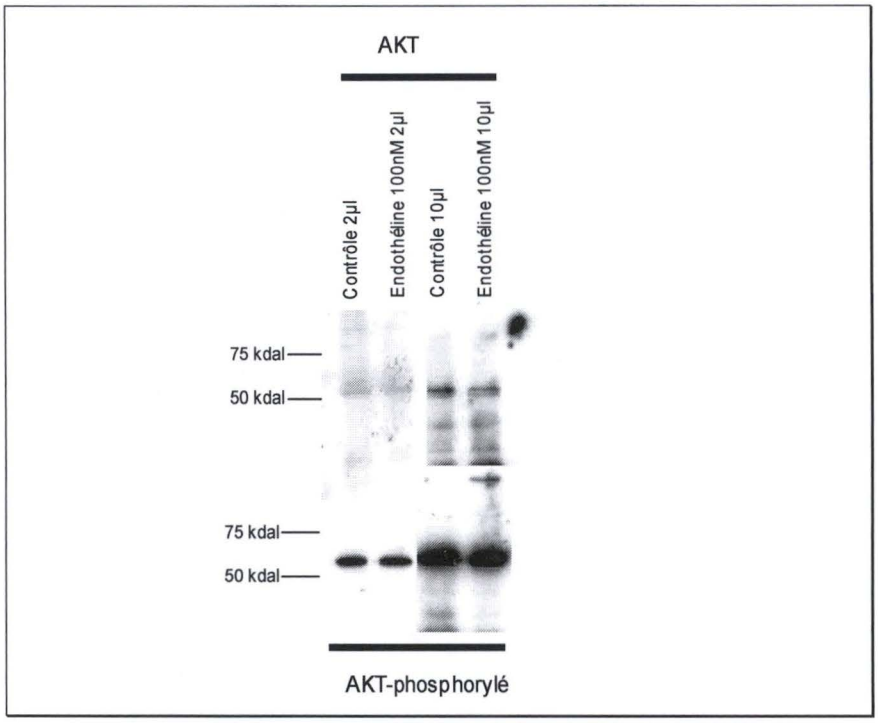


Figure 4.10 Analyse en Western Blot de Akt non phosphorylé (en haut) et phosphorylé (en bas) dans des cellules TPC1, en présence ou non de ET-1 (100nM). Deux quantités différentes d'extraits cellulaires (2 et 10 µL) sont utilisés.

Pour éviter qu'une saturation de signal ne nous empêche de voir une éventuelle différence entre les deux formes de Akt, nous avons déposé moins de protéines sur la partie gauche du gel. Cependant ceci n'a rien révélé de différent.

L'absence d'effet évident de ET-1 exogène sur l'état de Akt suggère l'explication suivante: la quantité de ET-1 exogène n'est peut-être pas suffisante pour dépasser les effets de ET-1 endogène.

Aussi, pour déterminer l'implication de ET-1 endogène, un autre western blot a été pratiqué. Dans ce cas, l'antagoniste spécifique du récepteur ET_A (BQ-123) a été ajouté sur les cellules à une concentration de 10µM (**Figure 4.11**).

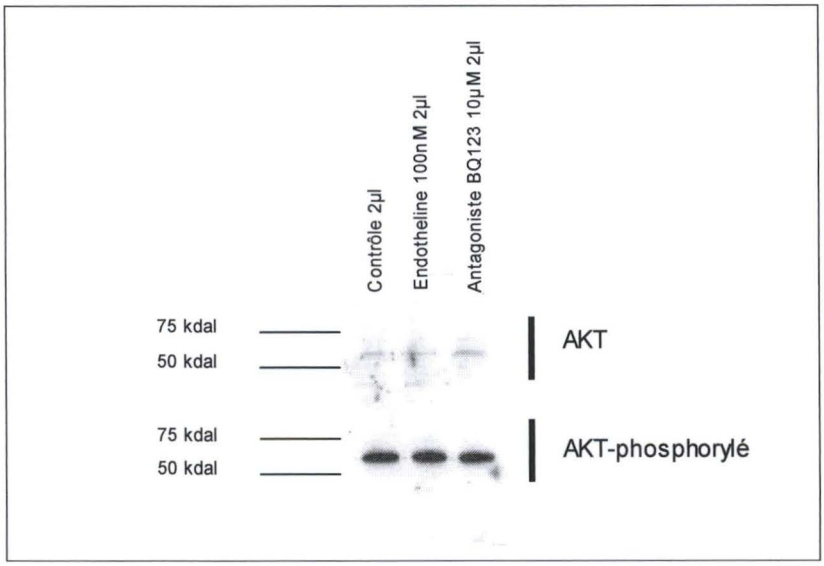


Figure 4.11. Analyse en Western Blot de la protéine Akt phosphorylée et non phosphorylée dans des cellules TPC1 cultivées en présence de 2 µl de ET-1 ou avec 10µM de BQ-123.

Cette figure révèle que l'antagoniste spécifique BQ-123 ne produit pas non plus de différence sur l'état de phosphorylation d'Akt. ET-1 endogène ne semble pas contribuer à l'activation de la voie Akt dans les lignées TPC1. Rappelons toutefois que BQ-123 agit de manière non conforme dans d'autres expériences (notamment celles utilisant le trypan bleu). Ces expériences ayant été faites en parallèle, nous n'avons pu devancer le problème.

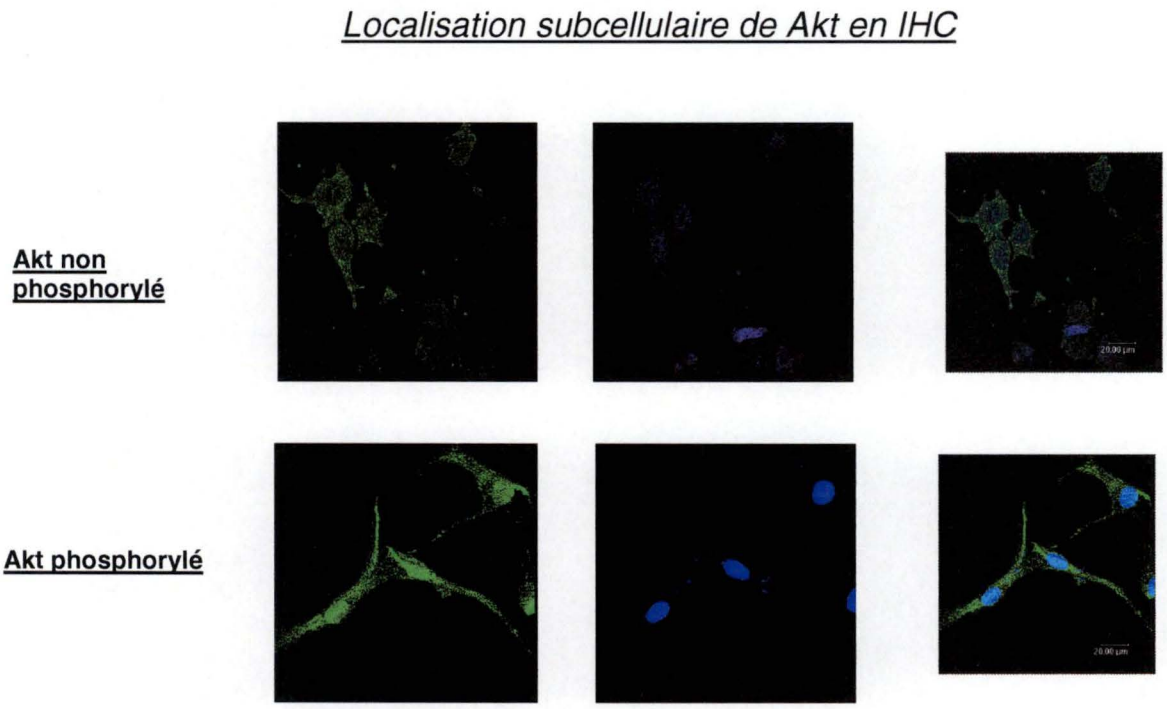
Ces résultats laissent penser que ET-1 n'influence pas la voie de Akt dans la lignée cellulaire TPC1. En effet, Akt semble activée en permanence dans cette lignée (présence de la forme phosphorylée). Akt est un acteur de la survie cellulaire qui est activé par la PI3kinase, elle-même sous contrôle de Ras.
La stimulation constante de cette voie renforce l'explication du caractère cancéreux des cellules TPC1.
Des recherches ont découvert que ces lignées expriment le proto-oncogène RET mais il reste à savoir si cela pourrait intervenir sur l'activation permanente de la voie Akt.

4.8.3. Résultat de l'immunocytochimie

L'objectif de l'immunocytochimie était le même que celui du western blot, à savoir comparer l'effet de ET-1 exogène sur l'état de phosphorylation de Akt. Les cellules ensemencées sur des lamelles en verre ont été privées de sérum pendant 24h avant d'être stimulées avec ET-1 100nM pendant 15minutes. En concordance avec les résultats du western, l'ajout de ET-1 ne modifie en rien l'état de phosphorylation de Akt (résultats non montrés parce que les cellules avaient souffert et que l'expérience n'a pas pu être répétée). Quant à l'état basal de Akt, sans stimulation par ET-1 exogène, les résultats sont présentés à la **Figure 4.12.** Le marquage de la forme non phosphorylée n'est pas très prononcé au niveau du noyau. Par contre, il apparaît clairement que la forme phosphorylée de Akt est détectable dans le cytoplasme et le noyau.

Il faut remarquer que dans ces expériences, les cellules ont été privées de sérum pour éviter tout effet synergique des facteurs de croissance contenus dans celui-ci avec ET-1, exactement comme cela avait été pratiqué lors des tests de prolifération cellulaire. Or, on sait que la privation de sérum peut induire un effet apoptotique et peut-être activer la voie de Akt. Bien

que cet effet ne soit pas démontré pour les cellules TPC1 (rappelons qu'elles résistent à la privation de sérum en ce qui concerne la libération de LDH), il devrait être vérifié lors d'expériences ultérieures.



Figue 4.12. Localisation subcellulaire de Akt et de sa forme phosphorylée dans les cellules TPC1 par inmmunohistochimie

Discussions et perspectives

5. Discussions et perspectives

5.1. Tests relatifs à la prolifération

5.1.1. Discussion

La présence d'un système endothéline comprenant au minimum le précurseur, l'enzyme de conversion, le peptide ET-1 et le récepteur ET_A a été détecté récemment dans des cancers thyroïdiens papillaires (Donckier *et al,* 2003).

Nos expériences in vitro montrent que ET-1, en l'absence de sérum, n'augmente pas significativement la prolifération dans les lignées de cancers thyroïdiens papillaire (TPC1) et folliculaire (FTC133). Cependant il n'est pas à exclure que ET-1 puisse agir en synergie avec d'autres facteurs mitogènes in vivo, ou bien que l'effet principal de l'endothéline dans les cancers thyroïdiens s'effectue de manière paracrine sur les cellules du stroma.

ET-1 pourrait jouer un rôle co-mitogénique dans la pathologie du carcinome thyroïdien. En effet, bien que ET-1 soit un agent mitogène propre pour de nombreuses cellules telles que les cellules musculaires lisses (Hirata *et al,* 1989) et les cellules cancéreuses de la prostate (Nelson *et al,* 1995 ; Nelson *et al,* 1996), cet effet mitogène reste modeste en comparaison avec celui d'autres facteurs de croissance tel que l'EGF ou le bFGF (basic fibroblast growth factor) (Newby *et al,* 1993).

Comme démontré dans d'autres lignées cancéreuses (des carcinomes coliques, par exemple), sans être nécessairement un facteur mitogénique, ET-1 se présente souvent comme un facteur de survie nécessaire au développement tumoral (Peduto Eberl *et al,* 2003). L'absence d'effet in vitro manifeste de ET-1 sur la prolifération des lignées TPC1 et FTC133 ne signifie en rien qu'il faille exclure ce peptide dans la physiopathologie des carcinomes thyroïdiens.

5.1.2. Perspectives

Il serait intéressant d'étudier l'effet des antagonistes non peptidiques de ET-1, soit mixtes (exemple : bosentan), soit spécifiques des récepteurs ET_A (exemple : atrasentan), sur la prolifération. L'utilisation d'antagonistes supprimerait tout effet lié à ET-1 endogène, et apporterait l'avantage de déterminer le type de récepteur impliqué dans la prolifération des lignées. En pratique, ceci pourrait toujours se réaliser avec le kit du BrdU. Cependant, l'utilisation d'une autre méthode d'analyse de prolifération, par exemple au moyen de la thymidine tritiée, pourrait pallier les inconvénients rencontrés avec le kit, en particulier la grande variabilité des résultats.

Il est aujourd'hui de plus en plus admis que les désordres de croissance cellulaire sont souvent le résultat d'un déséquilibre entre le taux de prolifération et celui de l'apoptose. Aussi, nous pouvons penser que ET-1 n'est pas un facteur de prolifération cellulaire majeur mais plutôt un régulateur du processus d'apoptose. Ceci a été examiné sur les cellules TPC1 uniquement, la culture des FTC133 se révélant plus difficile.

5.2. Tests relatifs à l'apoptose

5.2.1. Discussion

Les expériences d'exclusion au trypan bleu ont suggéré (sans le prouver, vu le manque de spécificité) que ET-1 est un facteur de survie cellulaire autocrine capable de protéger les cellules TPC1 contre une apoptose induite par un agent anticancéreux classique, la doxorubicine.

Ce renseignement est une porte ouverte à d'autres investigations. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser un autre agent inducteur d'apoptose pour vérifier si le phénomène est généralisable à l'apoptose induite chimiquement. D'autres mécanismes inducteurs d'apoptose, comme les radiations, les ultraviolets et des agents endommageant l'ADN, pourraient être étudiés. Les cancers thyroïdiens qui sont apparus après l'accident de Chernobyl ou qui résultent d'une radiothérapie sur la glande sont généralement des carcinomes papillaires. Ces tumeurs se caractérisent par la formation de réarrangements impliquant l'oncogène RET, un récepteur membranaire à activité protéine kinase.

L'unique expérience de survie cellulaire réalisée avec le kit CCK-8 n'ayant pas mis en évidence d'effet antiapoptotique clair de ET-1, la conclusion précédente doit être nuancée. L'expérience doit être répétée. Il serait très intéressant de continuer ce travail de recherche avec des mesures plus spécifiques de l'apoptose, comme la détection de la fragmentation de l'ADN.

Nous n'avons pas pu prouver un effet des antagonistes peptidiques de l'endothéline, BQ-123 et BQ-610, sur l'apoptose. Dans ce cas aussi il faudrait multiplier les expériences et affiner les recherches.

5.2.2. Perspectives

Si ET-1 semble atténuer l'apoptose induite par la doxorubicine dans la lignée cellulaire TPC1, il reste de nombreuses questions en suspens. Il aurait été intéressant d'étudier également ce phénomène dans la lignée FTC133 possédant le récepteur ET_B, afin de détecter d'éventuelles différences de comportement liées à ce récepteur.

Enfin, les mécanismes par lesquels ET-1 agit sur l'apoptose sont loin d'être élucidés. Nous n'avons pu établir de lien précis entre ET-1 et la voie de Akt. Voilà encore une voie d'étude supplémentaire.

5.3. Tests relatifs à la signalisation cellulaire

La réponse du calcium intracellulaire à l'ajout de ET-1 dans le milieu de culture des cellules TPC1 est manifeste : ET-1 entraîne la libération de calcium de ses stocks. Des études complémentaires pourraient certes fournir des mesures plus précises concernant les variations de concentration en calcium, mais cela n'était pas notre but. Nous voulions surtout prouver la fonctionnalité des récepteurs à ET-1 dans les cellules TPC1, ce qui est fait.

La lignée TPC1 semble donc être un bon modèle d'études in vitro du rôle des ETs dans le cancer thyroïdien papillaire, qui exprime tous les composants du système ET, depuis le précurseur jusqu'au récepteur ET_A, tout en n'exprimant pas le récepteur ET_B.

Montrer que le système est présent et fonctionnel pose la question de son rôle dans les lignées cellulaires cancéreuses. Pour y répondre, on pourrait envisager d'étudier les effets de la suppression de ET-1 sur le devenir de la population cellulaire. La suppression peut s'effectuer au niveau des gènes (manipulations génétiques cellulaires), des ARN (via les petits ARN d'interférences) ou de la protéine (antagonistes).

D'autres voies de signalisations « tardives » (par rapport au calcium) de ET-1 peuvent également faire l'objet de recherches, en particulier Erk (voie des MAPK), connu pour être activé par ET-1. Cependant, à l'instar d'études récentes, nous nous sommes intéressés à Akt. Cette kinase régule la croissance et la survie de cellules thyroïdiennes saines, ainsi que la mobilité de cellules non-thyroïdiennes, mais surtout, elle semble jouer un rôle important dans la progression du cancer thyroïdien (Vasko *et al,* 2004). Sa forme active (phosphorylée) est rarement localisée dans des tissus normaux, mais elle se trouve en très grande quantité dans les tissus cancéreux. On remarque une différence dans la quantité d'Akt phosphorylée (plus grande dans les carcinomes folliculaires) entre les carcinomes papillaires et folliculaires, et dans sa localisation subcellulaire (cytoplasmique dans les carcinomes papillaires et nucléaire dans les folliculaires). Toutefois, lorsque les carcinomes qu'ils soient folliculaires ou papillaires, présentent un caractère invasif, la localisation de Akt semble toujours nucléaire. Ceci établit une corrélation entre la forme nucléaire d'Akt et la progression des cancers thyroïdiens.

Dans notre travail, nous avons détecté cette forme d'Akt phosphorylée dans le noyau. L'expérience est à répéter avec et sans ET-1, et à affiner.

Les résultats du western blot suggèrent une absence d'effet de ET-1 exogène sur la phosphorylation de Akt dans la lignée TPC1, mais il faut constater que Akt est déjà manifestement phosphorylé à l'état basal. Rappelons que les cellules TPC1 présentent une mutation de l'oncogène RET et que de nombreuses études montrent que des mutations de ce gène peuvent activer la voie de la PI3 kinase, et par là celle de Akt. Il serait intéressant d'étudier cette voie dans une autre lignée cellulaire de carcinome papillaire pour rechercher d'éventuels effets de ET-1.

De toute manière, si Akt est activée de façon continue dans les carcinomes papillaires, il s'agit d'une bonne piste pour le traitement de ces cancers. En effet, l'inhibition de la voie de signalisation PI3K–Akt pourrait contrôler la croissance cellulaire aberrante. Récemment, des découvertes ont montré que la voie de survie PI3K–PDK1–Akt est une cible importante pour le contrôle de la croissance cellulaire ; ce contrôle est possible via la phosphorylation des facteurs de transcription Forkhead, la localisation nucléaire de Akt et l'activation de ces molécules (Kau *et al*, 2003).

5.4. Considérations générales

L'étude de l'action du système ET sur une lignée de cellules ne peut rendre compte du rôle paracrine de cette hormone. Or, celui-ci a été démontré dans de nombreux cas. Dans cet ordre idée, on observe des interactions dépendant de ET-1 entre les cellules épithéliales tumorales

de la prostate et les cellules stromales, à la fois à l'intérieur de la glande prostatique (Dawson *et al,* 2004) et dans l'environnement osseux où se développent les métastases ostéocondensantes (Chiao *et al,* 2000). Les cellules épithéliales tumorales ont perdu les endopeptidases neutres responsables de la dégradation de ET-1, tandis que les cellules stromales expriment ECE qui convertit la pré-pro-endothéline en ET-1.

Le rôle paracrine de ET-1 n'est pas facile à étudier in vitro, surtout en ce qui concerne la glande thyroïdienne.

De plus, il serait intéressant de pouvoir étudier les effets de ET-1 sur des lignées de carcinome thyroïdien humain médullaire. En effet, ce cancer est beaucoup plus invasif, les traitements sont inefficaces, et l'on sait que ET-1 favorise la migration et progression des tumeurs par son action sur les métalloprotéinases et sur l'angiogenèse.

Il est évident que l'étude du système ET est un axe très prometteur dans la compréhension des mécanismes du cancer en général et dans les éventuelles thérapies à venir.

Bibliographie

6. Bibliographie

Alanen, K., Deng, D. X. & Chakrabarti, S. Augmented expression of endothelin-1, endothelin-3 and the endothelin-B receptor in breast carcinoma. *Histopathol* **36**, 161-167 (2000).

Ali, H., Loizidou, M., Dashwood, M., Savage, F., Sheard, C. & Taylor, I. Stimulation of colorectal cancer cell line growth by ET-1 and its inhibition by ET (A) antagonists. *Gut* **47**, 685-688 (2000).

Bagnato, A., et al. 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).

Bagnato, A., Tecce, R., Moretti, C., Di Castro, V., Spergel, D. & Catt, K. J. Autocrine action of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **1,** 1059-1066 (1995).

Balakrishnan, S. & Pandhi, P. Endothelins : a brief review. *Indian J Pharmacol* **29**, 281-288 (1997).

Battistini, B., Chailler, P., D'Orléans-Juste, P., Briere, N. & Sirois, P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* **14**, 385-399 (1993).

Blagosklonny, M. V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J. & Neckers, L.M. Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway. *Cancer Res* **56,** 1851-1854 (1996).

Bremnes, T., Paasche, J.D., Mehlum, A., Sandberg, C., Bremnes, J., and Attramadal, H. Regulation and intracellular trafficking pathways of the endothelin receptors. *The Jjournal Of Biological Chemistry 23,* 17596-17604(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. C*lin Oncol* **20**, 2171-2180 (2002).

Carlomagno, F., Vitagliano, D., Guida, T., Basolo, F., Castellone, M.D., Melillo, R.M., Fusco, A., & Santoro, M. Efficient inhibition of RET/Papillary thyroid carcinoma oncogenic kinases by 4-amino-5-(4-chloro-phenyl)-7-(*t*-Butyl) Pyrazolo [3,4-*d*]Pyrimidine (PP2). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**(4):1897-1902 (2003).

Chan, L., Chittinandana, A. & Shapiro, J. I. Effects of an endothelin receptor antagonist on ischemic acute renal failure. *Am J Physiol* **266**, F135-F138 (1994).

Chiao, W., Moonga, B. S., Yang, Y., Kancherla, R., Mittelman, A., Wu-Wong, J. R. & Ahmed, T. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone reabsorption. *Br J Cancer* **83**, 360-365 (2000).

Clozel, M., Breu, V., Burri, K., Cassal, J. M., Fischli, W., Gray, G. A., Hirth, G., Loffler, B. M., Muller, M., Neidhart, W. & Ramuz, H. Pathophysiological role of endothelin revealed by the first orally active endothelin receptor antagonist. *Nature* **365**, 759-761 (1993).

Colin, I., Berbinschi, A., Denef, J. F. & Ketelsbergers, J. M. Detection and identification of endothelin-1 immunoreactivity in rat and porcine thyroid follicular cells. *Endocrinology* **130**, 544-546 (1992).

Dawson, L.A., Maitland, N.J., Turner, A.J. & Usmani, B.A. Stromal-epithelial interactions influence prostate cancer cell invasion by altering the balance of metallopeptidase expression. *British Journal of Cancer* **90,** 1577-1582 (2004).

Del Bufalo, D., Di Castro, V., Biroccio, A., Varmi, M., Salani, D., Rosano, L., Trisciuoglio, 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. 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 (6),** 2476-2484 (1991).

Donckier, J. E., Michel, L., Van Beneden, R., Delos, M. & Havaux X. Increased expression of endothelin-1 and its mitogenic receptor ET_A in human papillary thyroid carcinoma. *Clinical Endocrinology* **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).

Edwards, R. M., Trizna, W. & Ohlstein, R. H. Renal microvascular effects of endothelin. *Am J Physiol* **259**, F217-21 (1990).

Egidy, G., Juillerat-Jeanneret, L., Jeanin, J., Korth, P., Bosman, F. & Pinet, F. Modulation of human colon tumour – stromal interactions by the endothelial system. *Am J Pathol* **157**, 1863-1874 (2000-a).

Egidy, G., Peduto Eberl, L., Valdenaire, O., Irmler, M., Majdi, R., Diserens, A-C., Fontana, A., Janzer, R-C., Pinet, F. & Juillerat-Jeanneret, L. The endothelin system in human glioblastoma. *Lab Inv* **Vol 80, 11**, 1681-1689 (2000-b).

Eguchi, K., Kawakami, A., Nakashima, M., Ida, H., Sakito, S., Sakai, M., Terada, K., Kawabe, Y., Fukuda, T., Ishikawa, N., Ito, K. & Nagataki, S. Stimulation of mitogenesis in human thyroid epithelial cells by endothelin. *Acta Endocrinol* **128**, 215-220 (1993).

Ferrari-Bravo, A., Franciosi, C., Lissoni, P., Fumagalli, L. & Uggeri, F. Effects of oncological surgery on endothelin-1 secretion in patients with operable gastric cancer. *Int J Biomarkers* **15**, 56-57 (2000).

Filep, J. G., Fournier, A. & Foldes-Filep, E. Acute pro-inflammatory actions of endothelin-1 in the guinea-pig lung : involvement of ET_A and ET_B receptors. *Br J Pharmacol* **115**, 227-236 (1995).

Filippatos Regulation of apoptosis by vasoactive peptides *Am J Physil* **281,** L749-L761 (2001).

Firth, J. D. & Radcliffe, P. J. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal gene expression. *J Clin Invest* **88**, 1023-31 (1992).

Foppiani, I., Porcella, E., Cuttica, C. M., Fazzuoli, L., Valenti, S., Giordano. G. & Giusti, M. Immunoreactive endothelin in nodular pathology of the thyroid. *Clin Endocrinol* **47**, 479-483 (1997).

Gerad, A. C., Many, M. C., Daumerie, C., Costagliola, S., Miot, S., Devijlder, J. J. M., Colin, J. M. & Denef, J. F. Structural changes in the angiofolicular units between active and hypofunctioning folliculles align with differences in the epithelial expression of newly discovered proteins involved in iodine transport and organification. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 1291-1299 (2002).

Gohji, K., Tamada, H., Katsuoka, Y. & Nakajima, M. Expression of endothelin receptor A associated with prostate cancer progression. *J Urol* **165**, 1033-1036 (2001).

Grant, K., Loizidou, M. & Taylor, I. Endothelin-1 : a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer* **88,**163-166 (2003).

Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J.Biol. Chem.* **260** (6), 3440- 3450 (1985).

Haynes, W. G. & Webb, D. J. Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* **344**, 852-4 (1994).

Haynes, W. G. & Webb, D. J. The endotheliin family of peptides : local hormones with diverse roles in health and disease. *Clin Sci* **84**, 485-500 (1993).

Hirata, Y. Endothelin-1 receptors in cultured vascular smooth muscle cells and cardiocytes of rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol*, **13 suppl.5**:S157-8 (1989).

Howard, P. G., Plumpton, C. & Davenport, A. P. Anatomical localisation and pharmacological activity of mature endothelins and their precursors in human vascular tissue. *J Hypertens* **10**, 1379-86 (1992)

Kandel, E.S.& Hay, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research* **253**, 210-229.

Kau, T. R., and Silver P. A. Nuclear transport as a target for cell growth. *DDT* **vol. 8 No. 2,** 78-85 (2003)

Kedzierski, R. M. & Yanagisawa, M. Endothelin system : the double-edged sword in health and disease. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 851-876 (2001).

Kikuchi, K., Nakagawa, H., Kaduno, T., Etoh, H., Byers, H. R., Mihm, M. C. & Tamaki, K. Decreased ETB receptor expression in human metastic melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 734-739 (1996).

Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F. & Yazaki, Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters* **238**, 249-252 (1998).

Lenziardini, M., Viacava, P., Fiorini, I., Castagna, M., Nardini, V., Pollina, L., De Negri, F., Goletti, O., Di Coscio, G. & Bevilacqua, G. Presence of endothelin-1 in the normal and pathological human thyroid. *J Endocrinol Invest* **18**, 336-340 (1995).

Lovin, E. R. Endothelins. *N Engl J Med* **333**, 356-63 (1995).

Matsuura, A., Yamochi, W., Hirata, K., Kawashima, S. & Yokoamam, M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension* **32**, 89-95 (1998).

Molecular Biology of the Cell, Chap.17 The Cell Cycle and Programmed Cell Death *Garland Science* Fourth edition, 1010-1026 (2002).

Murch, S. H., Braegger, C. P., Sessa, W. C. & MacDonald, T. T. High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* **339**, 381-385 (1992).

Nakamuta, M., Ohashi, M., Tabata, S., Tanabe, Y., Goto, K., Narise, M., Narise, K., Hiroshige, K., & Nowata, H. Raised plasma concentration of endothelin-like immunoreactivity in patients with hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* **88,** 248-252 (1993)

Nelson, J. B. *et al.* Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res* **56,** 663-668 (1996).

Nelson, J. B. *et al.* The endothelin receptor antagonist atrasentan improves the time to clinical progression in hormone refractory prostate cancer patients : a randomized, double bind, multi-national study. *J. Urol.* **16,**168 (2001).

Nelson, J. B., Hedican, S.P., George, D.J., Reddi, A.H., Piantasposi, S., Eisenberger, M. A. & Simons, J. W. Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastasic adecarcinoma of the prostate. *Nat Med* **1**, 994-999 (1995).

Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. & Nisen, P. The endothelin axis : emerging role in cancer. *Nature* **3,** 110-116 (2003).

Newby, A.C.& George, S.J. Proposed roles for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular pathologies. *Cardiovasc Res.* **27 (7)** : 1173-83(1993)

Pao, M., Tsutsumi, M., Liang, G., Uzvolgyi, E., Gonzales, F. A. & Jones P. The endothelin receptor B (EDNRB) promoter displays heterogeneous, site speific methylation patterns in normal and tumours cells. *Hum Mol Genet* **10,** 903-910 (2001).

Pedram, A., Razandi, M., Hu, R. M. & Levin, E. Vasoactive peptides modulate vascular endothelial cell growth factor production and endothelial cell proliferation and invasion. *J Biol Chem* **272**, 17097-17103 (1997).

Peduto Eberl, L., Bovey, R. & Juillerat-Jeanneret, L Endothelin-receptor antagonists are proapoptotic and antiproliferative in human colon cancer cells. *Br J Cancer* **88,** 788-795 (2003).

Peduto Eberl, L., Egidy,G., Pinet, F., & Juillerat-Jeanneret, L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **36**: S354-356 (2000).

Peduto Eberl, L., Valdenaire, O., Saintgiorgio, V., Jeannin, J. & Juillerat-Jeanneret, L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *Int J Cancer* **86**, 182-187 (2000).

Pernow, J. & Wang, Q. D. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* **33**, 518-26 (1997).

Randall, M. D., Douglas, S. A. & Hiley, C. R. Vascular activities of endothelin–1 and some alanyl substitued analogues in resistance beds of the rat. *Br J Pharmacol* **98,** 685-99 (1989).

Remuzzi, G., Perico, N. & Benigni, A. A new therapeutics that antagonize endothelin promises and frustrations. *Nature Rev Drug Discov* **1,** 986-1000 (2002).

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 Research* **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 inasiveness of ovarian carcinoma cells[1]. *Cancer Research* **61,** 8340-8346 (2001)

Rubanyi, G. M. & Polokoff, M. A. Endothelins : molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol* **46**, 325-415 (1994).

Saita, Y., Yazawa, H., Koizumi, T., Morita, T., Tamura, T., Takenata, T. & Honda, K. Mitogenic activity of endothelin in human cultured prostatic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* **349**, 123-128 (1998).

Salani, D., Di, C. V., Nicotra, MR., Rosano, L., Tecce, R. Venuti, A., Natali, P. G., & Bagnato, A. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *Am J Pathol* **157**, 1537-1547 (2000a).

Salani, D., Taraboletti, G., Rosano, L., Di, C. V., Borsotti, P., Giavazzi, R., & Bagnato, A. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am* J *Pathol* **157**, 1703-1711 (2000b).

Shankar, A., Loizidou, M., Aliev, G., Fredericks, S., Holt, D., Boulos, P. B., Burnstock, G. & Taylor, I. Raised endothelin-1 levels in patients with colorectal liver metastases. *Br J Surg* **85,** 502-506 (1998).

Shichiri, M., Kato,H., Marumo, F., & Hirata, Y. Endothelin–autocrine/paracrine apoptosis survival factor for endothelial cells. *Hypertension* **30,** 1198-1203 (1997).

Studzinski, G.P., In: Apoptosis a pratical approach. *Oxford Press Ubiversity*, 1-16 (1999)

Suzuki, T., Watanabe, K., Kasukawa, R. & Suzuki, T. Immunohistological localization of endothelin-1/big endothelin-1 in normal liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Fukushima J Med Sci* **44,** 1998

Teder, P. & Noble, P. W. A cytokine reborn ? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Resp Cell Mol Biol* **23**, 7-10 (2000).

Tseng, Y. C. L., 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* **76**, 156-161 (1993).

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).

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).

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).

Wu Wong, J. R., Chiou, W. J., Dickinson, R., & Opgenorth, T. J. Endothelin attenuates apoptosis by inhibition of caspase 3. *Hypertension* **35**, 733-737 (1997).

Yamashita, J., et al. A large amount of endothelin-1 is present in human breast cancer tissues. *Res Commun Chem Pathol* **74,** 363-369 (1991).

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yasaki, Y., Goto, K. & Masaki, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411-415 (1988).

Yang, Z., Krasnici, N. & Luscher, T. F. Endothelin-1 potentiates smooth muscle cell growth to PDGF: effects of ETA and ETB receptor blockade. *Circulation* **100**, 5-8 (1999).

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

25 AOUT 2004