

UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Discipline : *Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique*

Spécialité : Sciences du Médicament

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011

par

DELPHINE LE BROCC

Impact de l'environnement chimique sur la prise en charge de molécules à visée anticancéreuse :
- Effet du cadmium sur l'efficacité potentielle de la Phenstatine et de ses métabolites dans le traitement du cancer de la prostate -

Membres du jury :

Rapporteurs: **Dr Luc Ferrari**, Maître de Conférences des Universités de Toxicologie, Centre Antipoison et de Toxicovigilance, Nancy
Pr Gérard Lachâtre, Professeur des Universités de Toxicologie - Praticien Hospitalier, CHU de Limoges.

Examineur: **Pr Michel Lhermitte**, Professeur des Universités de Toxicologie - Praticien Hospitalier, CHRU de Lille.

Directeur de thèse: **Dr Nicole Pommery**, Maître de Conférences des Universités de Toxicologie, Lille

UNIVERSITÉ LILLE NORD DE FRANCE
FACULTÉ DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE 2

Discipline : *Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique*

Spécialité : Sciences du Médicament

Soutenue publiquement le 9 décembre 2011

par

DELPHINE LE BROC

Impact de l'environnement chimique sur la prise en charge de molécules à visée anticancéreuse :
- Effet du cadmium sur l'efficacité potentielle de la Phenstatine et de ses métabolites dans le traitement du cancer de la prostate -

Membres du jury :

Rapporteurs: **Dr Luc Ferrari**, Maître de Conférences des Universités de Toxicologie, Centre Antipoison et de Toxicovigilance, Nancy
Pr Gérard Lachâtre, Professeur des Universités de Toxicologie - Praticien Hospitalier, CHU de Limoges.

Examineur: **Pr Michel Lhermitte**, Professeur des Universités de Toxicologie - Praticien Hospitalier, CHRU de Lille.

Directeur de thèse: **Dr Nicole Pommery**, Maître de Conférences des Universités de Toxicologie, Lille

REMERCIEMENTS

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

Monsieur le Professeur Michel Lhermitte

Je tiens à vous remercier sincèrement de m'avoir accueillie au sein du service de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Un grand merci également de m'avoir fait confiance et soutenue pour l'obtention du poste d'ATER.

Merci pour tout !

Madame le Docteur Nicole Pommery

Je tiens à vous adresser tout mon respect et je ne vous remercierai jamais assez pour avoir accepté de m'accompagner durant ces trois années et de la confiance que vous m'avez accordée pour mener à bien ce travail de thèse. Travailler à vos côtés fut très enrichissant pour moi, vous avez toujours été disponible pour faire avancer au mieux le sujet malgré les difficultés que nous avons pu rencontrer. J'ai apprécié nos nombreux échanges et l'aide que vous m'avez apportée notamment en acceptant que je puisse effectuer le monitorat au cours de ma thèse et en mettant tous les atouts de mon côté afin de préparer au mieux mon avenir. Je vous suis également très reconnaissante pour votre investissement dans la rédaction de ce manuscrit.

Un grand merci pour vos marques de sympathie et de réconfort que vous m'avez apportés.

MERCI !

Je remercie également mes rapporteurs :

Monsieur le Docteur Luc Ferrari

et

Monsieur le Professeur Gérard Lachâtre

Je vous remercie d'avoir accepté de venir dans le Grand Nord en tant que rapporteurs afin de juger mon travail de thèse. Je vous en suis très reconnaissante. Vos remarques et critiques ne pourront être qu'un apport bénéfique dans ce travail.

Je tiens également à remercier les personnes qui m'ont encadrée et aidée dans la réalisation de cette thèse :

Monsieur le Docteur Christophe Furman

Je tenais à vous faire part de toute ma sympathie et mon respect. C'est avec plaisir que j'ai pu travailler à vos côtés ces cinq dernières années. J'espère que d'autres suivront... un grand Merci pour les enseignements que vous avez dispensés lors de mon Master et Mastère en *Drug Design*. J'aimerais acquérir un jour votre aisance à l'oral et votre capacité à transmettre des connaissances. Vous avez toujours été soucieux de mon avenir et avez tout mis en oeuvre, avec Nicole, pour me préparer au mieux au métier d'enseignant. Nos longues discussions et les connaissances scientifiques que vous m'avez apportées ont été des atouts majeurs dans la réalisation de ce travail de thèse. A vos côtés, j'ai pu évoluer dans un climat de confiance et de perpétuelle bonne humeur, ce qui a pu que me motiver davantage. Un grand MERCI Christophe !!!

Monsieur le Docteur Jean Pommery

Je vous adresse toute ma reconnaissance pour avoir suivi de près l'avancement de mes travaux de recherche. Je vous remercie pour votre contribution et le temps que vous m'avez accordé dans la mise au point et l'enseignement d'une technique qui était bien étrangère pour moi, l'HPLC. J'ai été la cause de bien des suées, j'en suis consciente... mais vous avez su être patient et compréhensif. Merci !!! L'aide que vous m'avez apportée dans la pratique de cette technique a amplement contribué à la réussite de cette thèse. MERCI pour tout Jean !!!

Merci à tous ceux qui ont contribué à ce travail :

Merci à toi **Alina**, d'avoir synthétisé tous les composés mentionnés dans ce manuscrit. Cela fait déjà plusieurs années que nous collaborons ensemble, ce qui a toujours été un plaisir pour moi. Je tiens à te remercier pour ta sympathie et ta contribution en tant que chimiste dans ce travail. Je te souhaite de réussir professionnellement et surtout personnellement, car en définitive c'est ça le plus important. Merci à toi !

Un grand merci également à toi **Delphine** !! Tu as toujours répondu présente pour nous apporter tes connaissances en pharmacogénétique et un œil critique sur ce travail, ce qui fut d'une grande aide ! Merci à toi et **Christelle** d'avoir contribué à ma préparation au Grand Jury, je vous en suis très reconnaissante. Vous avez toujours été d'une grande gentillesse ! MERCI !!!

Merci à **Jean-François Wiart** d'avoir effectué les manipulations en spectrométrie de masse ce qui a permis l'identification et la caractérisation des métabolites présentés. Merci !!!

Merci à tous ceux qui par leur présence m'ont aidée :

Le service de Toxicologie :

Un grand merci à **Anne Garat** (tu as souvent été d'un grand soutien et tu as toujours eu la petite parole pour remonter le moral, merci Anne), **Anne Platel**, **Béatrice**, **Marie-Hélène** (mes collègues secouristes, merci de m'avoir soutenue dans ma candidature pour le poste d'ATER et pour votre sympathie), **Dany** (merci à toi, tu as toujours été d'un grand réconfort et merci encore pour tous tes conseils), **Marie-Claudine** (ma co-locataire d'HPLC), **Michel Imbenotte** (merci pour votre gentillesse et votre sourire quotidien ; je vous souhaite une agréable retraite), **Mike** (je te dois beaucoup, c'est toujours appréciable d'avoir un *British* dans le labo, tu as été d'une grande aide, merci pour ta grande disponibilité, merci beaucoup !!!) et sans oublier mon cher **Philippe** (*alias* Mister Fish), j'ai apprécié ta bonne humeur quotidienne et ta sympathie (courage plus que 9 mois !!).

La salle 31, Faculté de médecine, Pôle Recherche :

Un grand MERCI à tous pour votre accueil, votre gentillesse et vos conseils. Un petit clin d'œil à mes collègues thésard(e)s : **Elisabeth**, **François**, **Joanna** et **Marion**. *We did it* !!! Merci à **Christelle**, **Ingrid** et **Jean-marc** pour vos conseils avisés, merci pour votre disponibilité !!!

Sans oublier mon petit péruvien (**Christian**), bonne chance pour la suite !

Merci à toi également **Julie**, grâce à toi les TLDA n'ont plus de secret pour nous !!

Merci également à **Benjamin**, **Julien**, **Mélanie** et **Nicolas**. Merci à **Anne Engels** de m'avoir intégrée et aidée à mon arrivée dans l'équipe. Tes conseils m'ont été précieux et toujours prodigués avec gentillesse et dévouement.

Le Centre de Biologie et Pathologie de Lille (Service de Génopathies) :

Merci à vous **Isabelle** et **Nathalie** de m'avoir permis l'accès à l'automate ABI Prism™ 7900HT.

Merci à vous **Monsieur Broly** d'avoir accepté que j'effectue une thèse au sein de votre équipe EA4483.

L'institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol :

Merci à vous tous pour votre accueil et votre sympathie.

Merci à toi **Amélie**, tu m'as enseigné la culture cellulaire qui n'a plus de secret pour toi ! j'ai apprécié les bons moments que nous avons passé ensemble. Merci pour tout !!! Merci à mes deux acolytes (**Aurélien** et **Davy**), ne changez rien, vous êtes parfaits !!! Merci également à toi **Fred K** (notre maman, merci pour ton soutien et ton attention), **Fred L** (quelle pêche !! merci pour tous les moments inoubliables), **Laurence**, **Manu**, **Natascha** (on se connaît depuis peu mais tu sais lire en moi comme dans un livre ouvert, c'en est flippant. Tu es devenue une véritable amie, merci pour ton soutien quotidien, ton écoute, tu es quelqu'un de formidable alors ai confiance en toi !!!), **Pauline** (j'envie ton courage, je te souhaite de réussir dans tes études de pharmacie et dans ta vie de maman, tu le mérites), **Perrine** (ma miss people préférée, j'ai apprécié nos parties de Jungle speed ensemble et tu es la meilleure à ce jeu là, je m'incline !), **Régis** (*Alias Tac* : n'oublie pas que tu as un pari à tenir pour la thèse !!!) et ma Mademoiselle **Valérie** (Merci pour ta générosité et ton amitié durant toutes ces années, on peut toujours compter sur toi ! Je pense que d'ici quelque temps tu pourras commencer les tic, tac, tic, tac !).

Le service de Biochimie :

Merci à **Barbara**, **Béatrice**, **Fanny**, **Malika**, **Olivier**, **Philippe**, **Pierrette** et mes collègues moniteurs de m'avoir accueillie dans le cadre de mon monitorat. Travailler avec vous a été un réel plaisir. MERCI !!!

... sans oublier mes amis :

Merci à vous **Amélie** et **Sophie**, mes amies, mes sœurs de cœur. Vous avez toujours su être à mon écoute et je sais que je pourrai toujours compter sur vous deux !! Merci encore pour vos encouragements, je vous entends encore dire : « Allez Dédé, tu vas tout dédéchirer !!! ». J'espère être à la hauteur de vos espérances !! Je vous aime les filles !

Merci à vous **Julie, Sophie, Damien, Mana, Gaya** et tous nos potos du Grand Ouest. On ne se voit malheureusement pas beaucoup mais je vous promets de me rattraper après la thèse. Vous avez toujours été attentionnés et soucieux de notre vie. Merci les amis !!!

... et ma famille :

Merci à vous mes frérots **Nicolas** et **Romain** !!! Votre présence et votre joie de vivre m'ont beaucoup aidée, que ferai-je sans vous ? Je suis fière des hommes que vous êtes devenus, je vous aime !!!

Merci à vous **Maïté** et **Marco**, grâce à toi Maïté, je sais ce que c'est d'avoir une sœur. Je suis heureuse des démarches que tu as entrepris pour me retrouver !! J'ai la chance aujourd'hui d'avoir un magnifique neveu, **Viktor**. Merci à tous les trois.

Merci à toi ma petite **Mamie** Marguerite, ma deuxième maman ! Tu m'as toujours réconfortée étant petite et tu le fais encore maintenant. Je te dois beaucoup, tu as toujours cru en moi et je t'en remercie. Je t'aime ma petite Mamie !!

Je tiens à te remercier **Florent** pour ton soutien quotidien depuis maintenant dix ans. Te souviens-tu du jour de mes résultats de concours de pharmacie ? J'étais atterrée, je ne savais plus quoi faire. Et tu m'as dit que veux-tu faire vraiment ? Et je t'ai répondu que je voulais travailler en recherche. Et là tu m'as dit : « et bien vas-y, fonce !!! ». Et me voici quelques années plutard !!!

La réussite de cette thèse te revient également. Tu as toujours su me réconforter et m'aider dans mes choix. Ces dernières années n'ont pas été des plus faciles mais on le savait. Merci pour ta confiance et m'avoir laissée m'épanouir dans ma passion qui est devenue aujourd'hui mon métier. Cette thèse a été également égayée par notre mariage et la naissance de notre fils **Samuel**, notre rayon de soleil. Toi seul sait à quel point il a été ma bouffée d'oxygène cette année. Je suis heureuse d'en être arrivée là mais ma plus grande fierté, c'est toi mon petit Biboune, je t'aime mon bébé !!!

SOMMAIRE

Introduction : Présentation générale du travail de thèse	12
ÉTAT ACTUEL DU SUJET	14
PARTIE 1 : INTÉRÊT D'UNE NOUVELLE VOIE DE RECHERCHE DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE	14
I. Présentation du cancer de la prostate	15
1. <i>Les chiffres</i>	15
2. <i>Les causes</i>	15
3. <i>Les stades d'évolution</i>	16
4. <i>Les traitements</i>	17
4.1. <i>Nouvelles thérapies hormonales</i>	18
4.2. <i>Nouveaux agents de chimiothérapie</i>	18
4.3. <i>Autres cibles moléculaires</i>	19
4.4. <i>Justification de la cible moléculaire retenue dans notre projet</i>	19
II. Intérêt de concevoir de nouveaux modulateurs de la polymérisation de la tubuline	20
1. <i>Structure et rôle des microtubules</i>	20
2. <i>Mécanismes d'action des poisons du fuseau</i>	22
3. <i>La Combrétastatine A-4 (CA-4) et ses dérivés</i>	25
PARTIE 2 : IMPLICATION DE LA MÉTABOLISATION VIA LES CYTOCHROMES P450 SUR LE DEVENIR D'UNE MOLÉCULE A VISÉE THÉRAPEUTIQUE	29
I. Métabolisme des xénobiotiques – Implication des cytochromes P450	30
1. <i>Généralités – structures et mécanismes d'action des cytochromes P450</i>	32
2. <i>Classification</i>	34
II. Importance clinique et toxicologique des dérégulations du métabolisme par les CYPs	39
1. <i>Inductions – Inhibitions</i>	40
2. <i>Polymorphisme génétique des cytochromes P450</i>	42
3. <i>Pharmacogénétique</i>	43
III. La prostate : siège d'une métabolisation extra-hépatique	49

<u>PARTIE 3 : INFLUENCE DU CADMIUM SUR LA MÉTABOLISATION DES XÉNOBIOTIQUES</u>	53
I. Sources d'exposition au cadmium et métabolisme	54
II. Toxicité du cadmium	55
1. <i>Intoxications aiguë et chronique</i>	56
2. <i>Mécanismes d'action au niveau cellulaire</i>	57
3. <i>Cas particulier de l'implication du cadmium dans le cancer de la prostate</i>	59
III. Effets du cadmium sur les enzymes de métabolisation des xénobiotiques	64
<u>PARTIE EXPÉRIMENTALE</u>	67
Objectifs du travail	67
Matériels et Méthodes	68
I. Évaluation pharmacologique de la Phenstatine et de ses métabolites	68
1. <i>Mesure de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline</i>	68
1.1. <i>Principe</i>	68
1.2. <i>Protocole</i>	68
2. <i>Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire</i>	69
2.1. <i>Modèles cellulaires utilisés</i>	69
2.2. <i>Test d'évaluation de la prolifération cellulaire</i>	70
II. Étude <i>in vitro</i> de la métabolisation de la Phenstatine par des microsomes hépatiques de rat et humains	72
1. <i>Incubation des microsomes hépatiques</i>	74
2. <i>Identification et quantification des métabolites</i>	74
3. <i>Identification des CYPs intervenant dans la métabolisation de la Phenstatine</i>	75
3.1. <i>utilisation de supersomes</i>	75
3.2. <i>utilisation d'inhibiteurs sélectifs des CYPs</i>	76
III. Suivi de l'expression des gènes et des protéines correspondant aux CYPs impliqués dans la métabolisation de la Phenstatine	78
1. <i>Détermination de l'expression protéique</i>	78
1.1. <i>Dosage de protéines</i>	78
1.2. <i>Western blot</i>	78

2. Détermination du profil d'expression des gènes	79
2.1. Extraction des ARNs totaux et détermination de leur qualité	80
2.2. RT-PCR quantitative en temps réel	81
a. Rétro-transcription ou Transcription inverse	81
b. PCR quantitative en temps réel sur TaqMan™ Low Density Arrays	81
2.3. Quantification de l'expression des gènes sélectionnés	83
IV. Identification de microARNs exprimés lors d'un traitement au cadmium	84
1. Extraction des microARNs et détermination de leur qualité	84
2. RT-PCR quantitative en temps réel	84
2.1. Rétro-transcription ou Transcription inverse	84
2.2. PCR quantitative en temps réel sur TaqMan™ Low Density Arrays	85
3. Quantification de l'expression des microARNs sélectionnés	85
Résultats	86
I. Évaluation pharmacologique de la Phenstatine et de ses métabolites	86
1. Inhibitions de la polymérisation de la tubuline et de la prolifération cellulaire	86
2. Etude du métabolisme de la Phenstatine	86
2.1. Identification des métabolites formés par incubation de la Phenstatine avec les microsomes hépatiques	86
a. Analyse en LC/UV des incubats de microsomes hépatiques de rats et humains	86
b. Analyse en LC-ESI-MS des incubats de microsomes hépatiques de rats et humains	88
2.2. Evaluation pharmacologique des métabolites	90
a. Etude sur la polymérisation de la tubuline	90
b. Etude sur la prolifération cellulaire	90
c. Apport de la modélisation moléculaire	91
II. Identification des CYPs intervenant dans le métabolisme de la Phenstatine	92
1. Par l'utilisation de supersomes	93
2. Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques	95

III. Impact du cadmium sur la prise en charge de la Phenstatine et de ses métabolites	101
1. <i>Evaluation pharmacologique des composés sous l'influence du cadmium</i>	101
2. <i>Analyse de l'expression protéique des CYPs impliquées dans la métabolisation de la Phenstatine</i>	105
3. <i>Analyse du profil d'expression des gènes impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques par RT-PCR quantitative en temps réel</i>	107
3.1. <i>Validation du modèle cellulaire</i>	107
3.2. <i>Influence du cadmium sur l'expression génique des EMX</i>	108
4. <i>Implication des microARNs sur l'expression des CYPs d'intérêt</i>	110
DISCUSSION	112
Références Bibliographiques	116
Annexes	141
Publications	152

FIGURES

Fig. 1 : Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010 (I_{UVS})

Fig. 2 : Evolution du nombre de cas et de décès (barres) par cancer de la prostate et des taux standardisés mondiaux correspondants (TSM) (courbe, échelle logarithmique) chez l'homme de 1990 à 2010 en France (I_{UVS}, 2010).

Fig. 3 : Nombre de cas et de décès et taux correspondants (standardisés dans le monde pour 100 000 personnes-années) par cancer de la prostate chez l'homme pour l'année 2010 en France (I_{UVS}, 2010).

Fig. 4 : Mécanismes impliqués dans le passage à l'hormono-indépendance

Fig. 5 : Voies de signalisation ayant une importance clinique dans le cancer de la prostate

Fig. 6 : Mécanismes de résistance au Docétaxel dans les cancers prostatiques métastatique

Fig. 7 : Les différentes étapes de la mitose

Fig. 8 : Dynamique de la polymérisation des microtubules

Fig. 9 : Conformation du proto-filament dans la dynamique des microtubules

Fig. 10 : Liaison d'anti-mitotiques à différents sites des microtubules

Fig. 11 : Structures des principaux composés anti-microtubulaires

Fig. 12 : Structures de la Phenstatine, de la Colchicine et des Combrétastatines A-1, A-2 et A-4

Fig. 13 : Site de liaison de la colchicine sur la tubuline

Fig. 14 : Modèle de liaison de la colchicine (à gauche) et de la CA-4 (à droite) au dimère de tubuline

Fig. 15 : Activation de la GTPase Rho par GEF-H1

Fig. 16 : Voies de signalisation stimulées lors de la dépolymérisation des microtubules par la CA-4P associées à une augmentation de la perméabilité vasculaire

Fig. 17 : Mécanismes simplifiés de la régulation de l'expression des CYPs et d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques

Fig. 18 : Structure du CYP2D6 : les hélices α (bleu), les feuillets β (rouge).

Fig. 19 : Modèle de conformations ouverte et fermée de la Cytochrome P450 réductase dans la bicouche lipidique

Fig. 20 : Cycles catalytiques des CYPs et de la CYP réductase

Fig. 21 : Nomenclature des cytochromes P450

Fig. 22 : Bases moléculaires des polymorphismes génétiques

Fig. 23 : Les facteurs environnementaux génèrent un éventail de phénotypes dans la population à travers la participation de mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation de l'expression des microARNs

Fig. 24 : Prédiction des îlots CpG dans le promoteur et les régions 5' des gènes CYPs.

Fig. 25 : Biogenèse et fonction des microARNs

Fig. 26 : Schéma général représentant les trois zones de la prostate

Fig. 27 : Schéma général des conséquences biologiques d'une intoxication au cadmium dans les cellules.

Fig. 28 : Etapes de polymérisation de la tubuline

Fig. 29 : Expression des ARNm des CYPs 1A2, 2C9, 2E1 et 3A4 dans différents modèles de cellules hépatiques.

Fig. 30 : Préparation des fractions sub-cellulaires par ultracentrifugation différentielle

Fig. 31 : Structures chimiques des inhibiteurs de CYPs sélectionnés dans notre étude

Fig. 32 : Exemple d'un électrophérogramme effectué avec le bioanalyseur ExperionTM RNA standard sens (Biorad)

Fig. 33 : Microplaques de 384 puits comportant les 8 réservoirs de dépôt

Fig. 34 : Principe de la PCR quantitative en temps réel en utilisant des sondes TaqManTM

Fig. 35 : Analyse par LC-UV du métabolisme de la Phenstatine par des microsomes hépatiques de rats (A), humains (B) et par des microsomes hépatiques bouillis (C)

Fig. 36 : Spectre UV de la Phenstatine **1** et du benzhydrole **M1**

Fig. 37 : Analyse par LC-ESI-MS des principaux métabolites de la Phenstatine produits par les microsomes hépatiques de rats (a, b) et d'humains (c, d). LC-ESI-MS en mode ion positif : m/z 335 (a,c) et m/z 305 (b,d).

Fig. 38 : Mode de liaison de **M1** [(a): configuration R; (b): configuration S], **M4** (c) et **M7** (d) dans le site colchicine de la tubuline et superposition de la Combrétastatine A-4 (vert)

Fig. 39 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

Fig. 40 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

Fig. 41 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

Fig. 42 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'Ellipticine.

Fig. 43 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Furafylline.

Fig. 44 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Méthoxsalène.

Fig. 45 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'inhibiteurs de Thiotepea.

Fig. 46 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Fluconazole.

Fig. 47 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Triméthoprime.

Fig. 48 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Sulfaphénazole.

Fig. 49 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'inhibiteurs de Quinidine.

Fig. 50 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de DDTC.

Fig. 51 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non Itraconazole.

Fig. 52 : Effet d'un prétraitement de 3 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine (2,8 μM) (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$: différence significative par rapport au contrôle).

Fig. 53 : Effet d'un prétraitement de 3 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites

Fig. 54 : Effet d'un prétraitement de 7 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites

Fig. 55 : Effet d'un prétraitement de 10 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites

Fig. 56 : Analyse de l'expression protéique par Western Blot des CYPs 1A1, 1A2 et 2C19

Fig. 57 : Expression relative logarithmique (log 10) exprimée en RQ des gènes CYPs de la lignée cellulaire prostatique cancéreuse PC3 traitée à différentes concentrations de cadmium en comparaison des mêmes cellules non traitées

Fig. 58 : Effet du métabolite **M6** sur la progression du cycle des cellules DA1-3b

Fig. 59 : Expression relative logarithmique (log 10) exprimée en RQ des gènes CYPs de tumeurs prostatiques issues de biopsies des patients (1012276, 1012889, 1013095, 1016409 et 1017127) en comparaison avec ceux d'une tumeur issue de la biopsie du patient 0833950 (ligne de base)

TABLEAUX

Tableau 1 : Inhibiteurs qui inactivent les CYPs par un mécanisme inconnu.

Tableau 2 : Importance des CYPs polymorphes sur le métabolisme de médicaments et d'agents cancérigènes

Tableau 3 : Phénotypes des CYPs intervenant dans le métabolisme de médicaments et allèles des CYPs polymorphes ayant une importance dans la réponse modifiée aux médicaments

Tableau 4 : Quelques membres de CYPs, impliqués dans la métabolisation de médicaments, régulés par la méthylation de l'ADN

Tableau 5 : Relations entre le PSA et le cadmium retrouvé dans le sang et les urines

Tableau 6 : Principaux modèles permettant les études de métabolisation

Tableau 7 : Liste des inhibiteurs choisis afin de déterminer les CYPs potentiels impliqués dans le métabolisme de la Phenstatine

Tableau 8 : Présentation des K_i et sélectivité des inhibiteurs sélectionnés

Tableau 9 : Résumé des propriétés inhibitrices de quelques inhibiteurs chimiques sélectifs d'isoformes de cytochromes P450

Tableau 10 : Structure et évaluation quantitative des métabolites de la Phenstatine

Tableau 11 : Résultats LC-ESI-MS en mode ion positif obtenus pour les métabolites M1 à M8 de la Phenstatine

Tableau 12 : Activité des métabolites sur la polymérisation de la tubuline et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques PC3

Tableau 13 : Etude de la cytotoxicité de la Phenstatine et de ses métabolites sur des cellules tumorales prostatiques issues de biopsies

Tableau 14 : miARNs exprimés dans la lignée PC3 ciblant les CYPs d'intérêt

Tableau 15 : Effets du métabolite **M6** sur la prolifération de cellules cancéreuses humaines (tests réalisés par le NCI)

ABRÉVIATIONS

ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	<i>Aryl hydrocarbon Receptor</i>
ARN	Acide ribonucléique
BCA	Acide bicinchoninique
BPE	<i>Bovine Pituitary Enzyme</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CA-4	Combrétastatine A4
CAR	<i>Constitutive Androstane Receptor</i>
Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CENP	<i>Centromere Protein</i>
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
COL	Centre Oscar Lambret
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
CRPC	<i>Castration-Resistant Prostate Cancer</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CYP	Cytochrome P450
DHT	Dihydrotestostérone
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMT	Dose Maximale Tolérée
DNMT	DNA MéthylTransférase
DO	Densité Optique
DRE	<i>Dioxin Response Element</i>
DTT	Dithiothréitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth factor</i>
EGTA	<i>Ethylene GlycolTetraacetic Acid</i>
EMX	Enzyme du Métabolisme des Xénobiotiques
ERO	Espèces réactives de l'Oxygène
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide

FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FMN	Flavine Mononucléide
FPP	Farnésylpyrophosphate
FTase	Farnésyltransférase
GDP	Guanosine DiPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HAT	Histone Acétyltransférase
HBP	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HDAC	Histone Déacétylase
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IGF	<i>Insulin Growth Factor</i>
InVS	Institut national de Veille Sanitaire
K _i	Constante d'inhibition
LDS	<i>Lithium Dodecyl Sulfate</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LH-RH	<i>Luteinizing Hormone Releasing Hormone</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein (MAP) kinases</i>
MDR	<i>Multi Drug Resistance</i>
MGB	<i>Minor Groove Binder</i>
miARN	microARN
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
MTT	bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAT	N-Acétyl-Transférase
NFκB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PARP	<i>Poly ADP Ribose Polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCB	Polychlorobiphényles
PEGM	<i>Prostate Epithelial Cell Growth Medium</i>
PIPES	<i>Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>

PMSF	<i>PhenylMethaneSulphonylFluoride</i>
PPAR	<i>Peroxisome Proliferative Activated Receptor</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PXR	<i>Pregnane X-Receptor</i>
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
RhoB	<i>Ras homolog</i>
RQI	<i>RNA Quality Indicator</i>
RQ	<i>Relative Quantification</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SVF	<i>Sérum de Veau Foetal</i>
TLDA	<i>TaqManTM Low Density Arrays</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
UNG	<i>Uracile N-Glycosylase</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor Apoptosis Protein</i>
XRE	<i>Xenobiotic Response Element</i>

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La conception rationnelle d'un médicament implique en tout premier lieu la bonne connaissance des cibles potentielles présentes, souvent dérégulées dans le tissu touché par la pathologie et impliquées dans le déclenchement ou l'évolution de la maladie. A mesure que les connaissances en biologie humaine s'étoffent, on sait par exemple dans le cancer, qu'un certain nombre de récepteurs membranaires de sites actifs enzymatiques... souvent produits d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, peuvent être visés par de petites molécules chimiques et des études de relation structure-activité permettent continuellement d'optimiser, régulièrement, l'interaction entre la molécule à visée thérapeutique et sa cible moléculaire. Cependant, ces études « *in vitro* » menées sur des enzymes isolées, des récepteurs clonés ou des cellules isolées doivent être complétées par des études pharmacocinétiques pour suivre le comportement et le devenir du composé dans un organisme vivant.

C'est l'objet des études pharmacocinétiques (ADME) effectuées sur un médicament qui consistent à modéliser son **A**bsorption, sa **D**istribution dans l'organisme, son **M**étabolisme, c'est-à-dire comment l'organisme procède à sa transformation et enfin son **E**limination. Ces tests menés sur l'animal en essais précliniques puis sur l'Homme en essais cliniques de phase I permettent d'identifier le devenir de la nouvelle molécule au sein de l'organisme en fonction de son mode d'administration et de révéler une éventuelle modification de son efficacité et/ou de sa toxicité en relation, en particulier, avec son métabolisme *in vivo*.

La précocité de cette étape reconnue maintenant comme capitale par l'industrie pharmaceutique ne prend cependant pas en compte la susceptibilité individuelle des patients. Cette notion, très difficile à évaluer de manière systématique, devrait pouvoir considérer les différences émanant du patient lui-même (telles que les polymorphismes) mais également les dérégulations au niveau cellulaire par rapport aux habitudes de vie du malade et aux conditions environnementales auxquelles il est soumis, en particulier de part la nature des pollutions qui constituent son environnement personnel ou professionnel.

Cette recherche de « thérapies personnalisées » passe donc entre autres par la recherche des modifications induites par cet environnement sur les schémas classiques de biotransformation des médicaments candidats.

Etant donné l'expertise de notre groupe de recherche dans la conception rationnelle de molécules à visée anticancéreuse potentiellement actives dans le traitement du cancer de la prostate, nous avons retenu cette pathologie pour essayer de développer un schéma d'étude du retentissement de l'environnement sur l'efficacité d'un médicament, schéma qui pourrait être

par la suite élargi à toutes les enzymes du métabolisme des xénobiotiques et à des mélanges de polluant.

Après avoir justifié successivement la pathologie et la cible retenue, le choix de nous focaliser sur le métabolisme *via* les cytochromes P450, et l'importance du polluant retenu, le cadmium, dans le contexte de notre région, nous présenterons dans ce travail de thèse les résultats obtenus concernant l'effet de ce polluant (alimentaire et atmosphérique) sur l'efficacité d'un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, la Phenstatine (et de ses métabolites) sur la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques. L'explication de ces activités pharmacologiques a ensuite été recherchée en suivant les variations d'expression des gènes CYPs induits par la présence de cadmium et les modifications post-transcriptionnelles qui pourraient survenir au niveau des microARNs.

ÉTAT ACTUEL DU SUJET

PARTIE 1 : INTÉRÊT D'UNE NOUVELLE VOIE DE RECHERCHE DANS LE TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE

Même s'il apparaît un léger ralentissement dans l'augmentation de l'incidence du cancer de la prostate en France (168 850 cas en 1980, 319 380 en 2005, 346 900 en 2009 et 357 700 en 2010) (Fig. 1), cette pathologie reste la première cause de mortalité avec, en 2010, près de 150 000 décès. Sur la base d'une connaissance, en perpétuel progrès, de la maladie, la recherche essaie d'innover dans le traitement de cette pathologie liée à une dérégulation du programme génétique en intervenant aux différents stades de la progression tumorale.

La multiplication anarchique qui apparaît à la suite d'une dérégulation du processus de division cellulaire (altération génétique au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans la survenue, la progression du processus tumoral et le contrôle du cycle cellulaire) a, depuis plusieurs dizaines d'années, constitué la cible des traitements dits « cytotoxiques » (anti-métabolites, agents alkylants, intercalants...). A l'heure actuelle, des stratégies faisant appel à des traitements dits « cytostatiques » sont ainsi développées et présentent l'intérêt de jouer sur l'aspect « vitesse de multiplication » et donc de pallier ainsi le manque de spécificité de la chimiothérapie.

Il est cependant maintenant bien connu qu'après une première phase de croissance locale, la tumeur induit la formation de nouveaux vaisseaux dans le but de s'approvisionner en nutriments et en oxygène nécessaires à sa survie et son extension. Cette phase, responsable de la dissémination des cellules cancéreuses et de la formation de métastases, constitue une cible essentielle pour parvenir à ralentir le cancer dans l'organisme. Les traitements anti-angiogéniques et/ou anti-vasculaires qui visent la production de facteurs pro-angiogéniques (en particulier le VEGF) ou, plus directement, la cellule endothéliale, constituent un complément indispensable à la chimiothérapie anti-proliférative (Schultz *et al*, 2011).

C'est cette nouvelle stratégie « couplée » qui nous a intéressés dans le cas particulier du cancer de la prostate.

Schultz JD, Mühlheim K, Erben P, Hofheinz R.D, Faber A, Thorn C, Sommer JU, Hörmann K, Sauter A, *Chemotherapeutic alteration of VEGF-/PDGF- and PDGF-Ra/β expression by imatinib in HPV-transformed squamous cell carcinoma compared to HPV-negative HNSCC in vitro*. Oncol Rep, 2011.

Localisation ^a	Homme				Femme			
	Incidence		Mortalité		Incidence		Mortalité	
	Cas ^e	TSM ^d	Décès ^e	TSM ^d	Cas ^e	TSM ^d	Décès ^e	TSM ^d
Lèvre, cavité orale, pharynx	7900	16.6	2650	5.3	3090	5.4	720	1.1
Oesophage	3170	6.0	2720	5.0	1070	1.5	750	0.9
Estomac	4210	7.1	2840	4.6	2250	2.8	1580	1.7
Colon rectum	21000	36.5	9200	14.1	19000	24.5	8200	8.3
Foie ^f	5900	10.9			1750	2.4		
Pancréas ^f	5300	9.5			4840	6.3		
Larynx	2710	5.5	890	1.7	500	0.9	140	0.2
Poumon	27000	51.9	21000	38.6	10000	17.8	7700	12.1
Mélanome de la peau ^b	3870	8.2	870	1.6	4380	8.8	700	1.0
Sein					52500	100.0	11500	16.2
Col de l'utérus ^c					2820	6.4	940	1.6
Corps de l'utérus ^c					6560	10.6	1900	2.2
Ovaire					4530	7.8	3130	4.1
Prostate	71500	128.8	8790	11.2				
Testicule	2220	7.0	87	0.2				
Vessie	8900	14.6	3510	5.2	1800	2.0	1160	1.0
Rein	7000	13.7	2490	4.0	3510	5.6	1300	1.4
Système nerveux central	2550	6.0	1670	3.6	2020	4.2	1270	2.3
Thyroïde	2180	5.4	150	0.2	6820	16.3	230	0.2

Lymphome Malin Non Hodgkinien	5900	11.8	2010	3.2	4930	8.0	1700	1.8
Maladie de Hodgkin	820	2.3	160	0.3	900	3.0	122	0.2
Myélome multiple et maladie immunoproliférative	2950	4.9	1560	2.3	2500	3.3	1440	1.4
Leucémie aigue	1840	4.7	1690	2.9	1590	3.7	1450	1.9
Leucémie lymphoïde chronique	2040	3.5	600	0.8	1230	1.6	460	0.4
Tous cancers ^b	203000	381.8	84500	141.8	154500	267.2	62000	77.5

^a Les lymphomes sont exclus des tumeurs solides.

^b Les cancers de la peau, autres que les mélanomes, sont exclus.

^c Les parts respectives des décès dus au cancer du col de l'utérus et du corps de l'utérus ont été estimées par une méthode spécifique (Belot *et al.*, RESP 2008).

^d Taux standardisé sur la structure d'âge de la population mondiale pour 100 000 personnes-années.

^e Principe des arrondis : quand le nombre de cas/décès est compris entre 0 et 5 000, le nombre est arrondi à la dizaine la plus proche ; quand le nombre de cas/décès est compris entre 5 000 et 10 000, le nombre est arrondi à la centaine la plus proche ; quand le nombre de cas/décès est compris entre 10 000 et plus, le nombre est arrondi par tranche de 500.

^f Les estimations de mortalité ne sont pas présentées en raison de la qualité incertaine des données.

Fig. 1 : Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2010 (INVS)

Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinié F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Trétarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hédelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadié M, MonnerEAU A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Chérié-Challine L, Estève J, Remontet L, Velten M, *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005*. Rev Epidemiol Sante Publique, 2008. **56**(3): p. 159-75.

InVS, 2010 : http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/donnees_generales.pdf

I. Présentation du cancer de la prostate

1. Les chiffres

Le cancer de la prostate constitue le cancer le plus fréquent chez l'homme dans la grande majorité des pays occidentaux. Une certaine stabilisation de son incidence a pu être observée depuis 2005 (Fig. 2) mais avec plus de 71 500 nouveaux cas (Fig. 3) recensés en 2010 (soit 35% des nouveaux cas de cancer, tous types confondus chez l'Homme (InVS)), le cancer de la prostate est devenu, en France, la pathologie tumorale la plus fréquente, tous sexes confondus.

En terme de mortalité, le cancer de la prostate est la troisième cause de décès par cancer chez l'homme dans l'Union Européenne après le cancer du poumon et le cancer colorectal. Avec 8 791 décès, ce cancer se situe, en France, au 3^{ème} rang des décès par cancer chez l'homme, et il est la 4^{ème} cause de décès par cancer dans l'ensemble de la population. Le taux de mortalité standardisé est de 11,2 pour 100 000. Il est responsable d'environ 70 % de l'augmentation globale des cancers chez l'Homme en France ces 25 dernières années.

2. Les causes

L'étiologie du cancer de la prostate reste encore méconnue, mais il n'existe pas vraiment de doutes sur le fait que cette pathologie soit le résultat d'interactions entre des facteurs génétiques de susceptibilité, les hormones stéroïdiennes et des déterminants environnementaux (Gronberg, 2003 ; Bostwick et al, 2004). Bien que d'énormes progrès aient été réalisés au niveau thérapeutique ces dernières années, peu d'avancées ont été constatées sur l'identification de facteurs de risque (Sonn et al, 2005). A l'heure actuelle, il existe un grand débat sur le fait que l'environnement chimique généré par l'activité humaine contribuerait à la survenue du cancer de la prostate. Cette activité s'est fortement développée au niveau industriel et agricole au cours du siècle dernier, coïncidant, malgré une amélioration sanitaire des populations, avec l'augmentation de l'incidence du cancer de la prostate. Il faut de plus signaler que cette augmentation peut être reliée, surtout dans les pays développés avec l'allongement de l'espérance de vie et le diagnostic précoce limité à l'heure actuelle au dosage sanguin de l'antigène spécifique prostatique (PSA).

Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B, *Human prostate cancer risk factors*. Cancer, 2004. **101**(10 Suppl): p. 2371-490.

Gronberg H, *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.

Sonn GA, Aronson W, and Litwin MS, *Impact of diet on prostate cancer: a review*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005. **8**(4): p. 304-10.

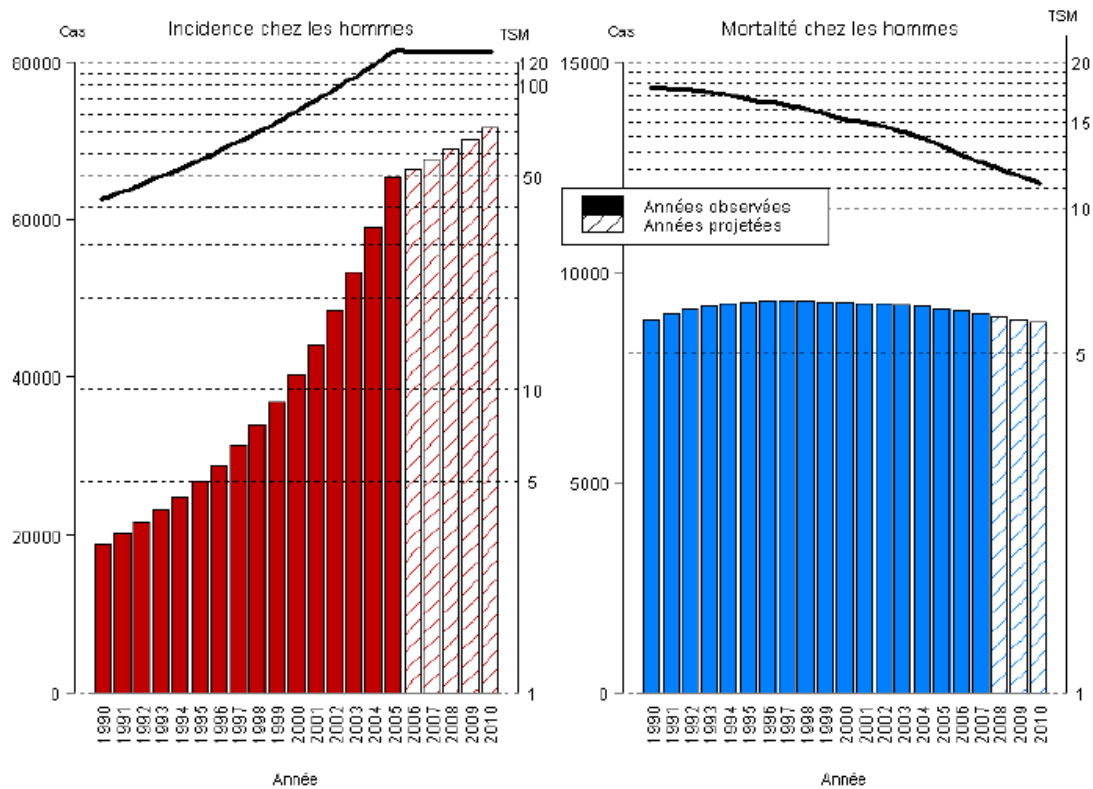


Fig. 2 : Evolution du nombre de cas et de décès (barres) par cancer de la prostate et des taux standardisés mondiaux correspondants (TSM) (courbe, échelle logarithmique) chez l'homme de 1990 à 2010 en France (InVS, 2010).

Homme			
Incidence		Mortalité	
Nombre de cas	Taux std monde	Nombre de décès	Taux std monde
71 577	128.8	8 791	11.2

Fig. 3 : Nombre de cas et de décès et taux correspondants (standardisés dans le monde pour 100 000 personnes-années) par cancer de la prostate chez l'homme pour l'année 2010 en France (InVS, 2010).

Ce dosage de PSA constitue avec l'évaluation de l'extension de la maladie (classification TNM définie par l'OMS) et de l'aspect microscopique du tissu prostatique (score de Gleason) (*Partin et al, 2001*), les bases de la classification de d'Amico qui conditionne les niveaux de risque de progression du cancer et donc les stratégies thérapeutiques qui pourront être envisagées.

3. Les stades d'évolution

Le cancer est localisé au niveau de la portion périphérique de la glande, au contraire de l'hypertrophie prostatique bénigne qui se situe dans la zone centrale, péri-urétrale. La plupart des cancers de la prostate se développent chez des hommes âgés, évoluant très lentement, restant au début localisés et ne dépassant pas la capsule qui entoure la prostate. Cependant, il a été constaté que le cancer prostatique touche également des sujets plus jeunes avec une plus grande agressivité. Quand le cancer évolue, il peut s'étendre au-delà de cette capsule prostatique, par envahissement direct des tissus et organes situés à proximité de la prostate (vessie, vésicules séminales). Il peut ensuite essaimer par voie vasculaire ou lymphatique dans d'autres organes à distance et former des lésions secondaires ou métastases au niveau des os, des poumons, du foie ou du cerveau.

Cette progression est « quantifiée » par le système TNM qui traduit l'évolution de la Tumeur primaire, des Nodules et des Métastases.

La structure tissulaire des cancers de la prostate varie de formes différenciées (cellules cancéreuses ressemblant aux cellules saines), dites de grade 1, aux formes les moins différenciées (cellules cancéreuses présentant beaucoup de caractères atypiques par rapport aux cellules saines), dites de grade 5. Plusieurs grades peuvent se rencontrer au sein d'un même tissu. Le score de Gleason donne la somme des grades les plus représentés. Si la somme est de 6 ou moins, le cancer est dit bien différencié, donc de meilleur pronostic ; 7 : le cancer est moyennement différencié ; 8 ou plus : le cancer est peu différencié, donc de moins bon pronostic.

Enfin, le dosage de PSA couramment utilisé, présente un nombre significatif de faux positifs puisque le marqueur utilisé est également présent dans d'autres affections non cancéreuses comme une augmentation de taille ou une inflammation de la prostate. Par conséquent, beaucoup d'hommes subissent des biopsies inutiles, invasives, chères, pouvant provoquer des infections (*Eberlin et al, 2010*).

Eberlin LS, Dill AL, Costa AB, Ifa DR, Cheng L, Masterson T, Koch M, Ratliff TL, Cooks RG. Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem, 2010. 82(9): p. 3430-4.

Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD, Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium. Urology, 2001. 58(6): p. 843-8.

La classification de d'Amico définit ainsi trois sous-groupes de cancer de la prostate selon leur risque de progression :

Cancer de la prostate :	TNM	Score de gleason	Valeur du PSA (ng/ml)
- Localisé à faible risque	≤ T2a	≤ 6	≤ 10
- A risque intermédiaire	T2b	7	10-20
- Localisé à risque élevé	≥ T2c	≥ 8	> 20

4. Les traitements

La généralisation du test PSA permet le plus souvent (84 % des cas) de diagnostiquer le cancer de la prostate à un stade localisé qui peut être traité efficacement par la chirurgie et la radiothérapie. Néanmoins, dans 10 à 20 % des cas, la maladie n'est révélée qu'à un stade localement avancé voire métastatique. De plus, le cancer peut dans certains cas progresser en dépit de la chirurgie, de la radiothérapie et de la privation hormonale. La mise au point de traitements adaptés aux CRPC (*Castration-Resistant Prostate Cancer*) demeure donc un challenge à l'heure actuelle.

La castration chirurgicale ou clinique, par le biais des agonistes LH-RH reste le premier traitement au stade métastatique avancé mais, après 12 à 20 mois, apparaît ce qui semble être une hormono-indépendance (*Heinlein et Chang, 2004*) mais, qui peut, en fait, être le résultat d'autres mécanismes (*Fig. 4*). De façon très résumée, des mutations au niveau du récepteur aux androgènes et des altérations de l'expression des co-régulateurs de ces récepteurs contribuent, avec l'augmentation de la production de facteurs de croissance, à la reprise de la progression tumorale (c'est ce qu'on appelle aussi le phénomène d'échappement) (*Heinlein et Chang, 2004*). Après les progrès qu'ont constitué successivement l'utilisation, à la fin des années 90, de la Mitoxanthrone (agent intercalant, inhibiteur de la topoisomérase II) et, à partir de 2004, du Docétaxel (agissant sur la polymérisation de la tubuline) un nombre important de nouveaux agents thérapeutiques ont été testés en essais cliniques (*revue de Fizazi et al, 2010*).

Fizazi K, Sternberg CN, Fitzpatrick JM, Watson RW, Tabesh M, *Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer*. *BJU Int*, 2010. **105**(6): p. 748-67.

Heinlein CA and Chang C. *Androgen receptor in prostate cancer*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 276-308.

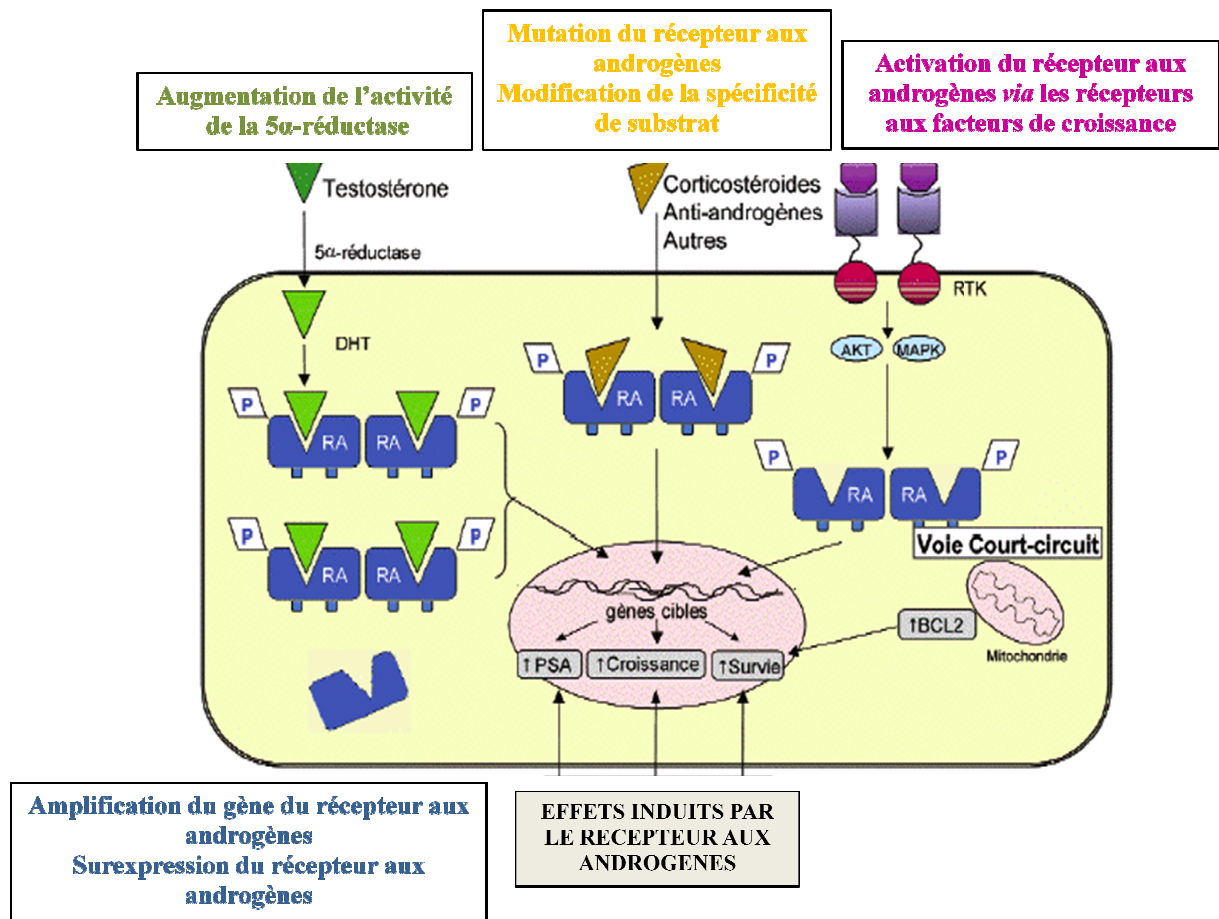


Fig. 4 : Mécanismes impliqués dans le passage à l'hormono-indépendance
(D'après Feldman et Feldman, 2001)

4.1. Nouvelles thérapies hormonales

L'apparition d'une progression tumorale malgré une castration chimique ne traduit pas systématiquement une hormono-indépendance. Une surexpression de récepteurs aux androgènes peut alors être compensée par une nouvelle génération d'antagonistes plus efficace que le Flutamide, le Bicalutamide ou le Nilutamide. Deux nouvelles molécules font, en particulier, l'objet d'essais cliniques : la MDV3100 et la RD162. D'autre part, l'Abiraterone, inhibiteur du cytochrome P17 impliqué dans la synthèse de testostérone, donne des résultats prometteurs sur les patients traités par chimiothérapies notamment lorsque ceux-ci sont traités par le Docétaxel (*Attard et al, 2009*).

4.2. Nouveaux agents de chimiothérapie

Trois bases de réflexion ont conditionné la recherche de nouveaux composés thérapeutiques :

- 1) une efficacité relative du Docétaxel permettant une survie prolongée des patients par rapport au traitement Mitoxanthrone / Prednisone,
- 2) une meilleure connaissance des voies de signalisation impliquées dans le cancer de la prostate (*Fig. 5*) mettant en évidence le « cross-talk » entre les voies de survie et les récepteurs aux androgènes,
- 3) la prise en compte de l'importance du phénomène d'angiogenèse dans la progression de la pathologie cancéreuse.

Ceci a débouché sur l'utilisation de molécules en association avec le Docétaxel ou en traitement de « deuxième intention » dans le cas d'une apparition de résistance à ce composé (*Seruga et al, 2011*) (*Fig. 6*).

Un autre taxane, le Cabazitaxel, et des molécules de mécanismes d'action très proches telles que les épithilones (moins de phénomènes de résistance liés à la glycoprotéine P (*Multi Drug Resistance*)) sont en phase I/II d'essais cliniques.

D'autre part, des composés capables d'agir au niveau des différents stades des voies de signalisation sont en cours d'étude :

- Des inhibiteurs tyrosine-kinase des récepteurs à l'IGF (*Insulin Growth Factor*), au VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou à Src (*Dazatinib, AZD0530*).

Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, Levink R, Coumans F, Moreira J, Riisnaes R, Oommen NB, Hawche G, Jameson C, Thompson E, Sipkema R, Carden CP, Parker C, Dearnaley D, Kaye SB, Cooper CS, Molina A, Cox ME, Terstappen LW, de Bono JS, *Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(7): p. 2912-8.

Seruga B, Ocana A, Tannock IF, *Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011. **8**(1): p. 12-23.

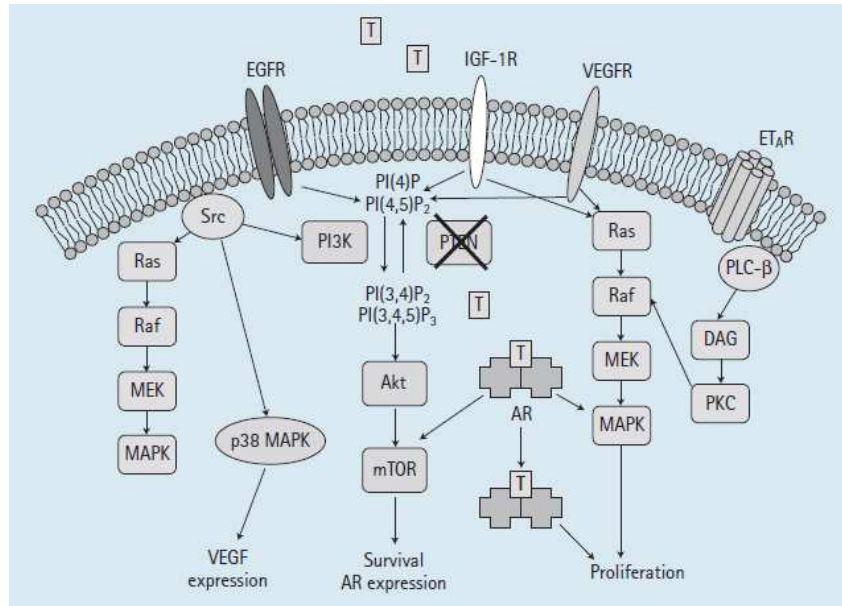


Fig. 5 : Voies de signalisation ayant une importance clinique dans le cancer de la prostate (D'après Fizazi et al, 2010).

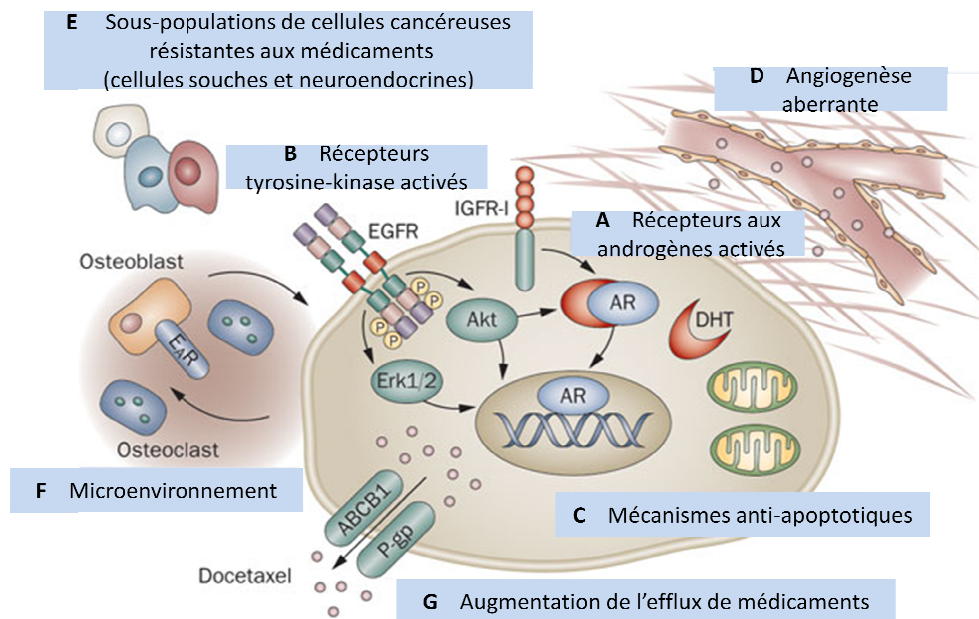


Fig. 6 : Mécanismes de résistance au Docétaxel dans les cancers prostatiques métastatiques (D'après Seruga et al, 2011).

Fizazi K, Sternberg CN, Fitzpatrick JM, Watson RW, Tabesh M, *Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer*. BJU Int, 2010. **105**(6): p. 748-67.

Seruga B, Ocana A, Tannock IF, *Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(1): p. 12-23.

- Des inhibiteurs Akt (MK-2206, GSK690693), mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). La phosphorylation d'Akt peut également être empêchée par l'utilisation d'inhibiteurs d'histone désacétylase (Vorinostat, Trichostatine A, Panobinostat), composés capables d'inhiber l'expression des récepteurs aux androgènes.

Il faut également citer les essais réalisés avec des inhibiteurs du protéasome (induit *in vitro* la mort de cellules tumorales puisque le protéasome est nécessaire à la survie cellulaire), d'HSP90 (*Heat Shock Protein*) qui participe au repliement des protéines une fois synthétisées ou de PARP (*Poly ADP Ribose Polymerase*) impliqué dans la réparation de l'ADN.

Le rôle prépondérant du VEGF dans l'angiogenèse a conduit à la conception d'inhibiteurs du VEGF-R (Sorafenib, Sunitinib), de « VEGF Trap » (Aflibercept) et à l'utilisation d'anticorps anti-VEGF (Bevacizumab). Le thalidomide et son dérivé Lenalidomide montrent une activité anti-angiogénique sans que leur mécanisme d'action ne soit encore bien identifié.

4.3. Autres cibles moléculaires

L'apparition des métastases osseuses fait l'objet d'une attention particulière et des agents actifs au niveau des ostéoblastes ont été synthétisés :

- Le Denosumab est un inhibiteur de RANKL, ligand de NFκB, facteur surexprimé dans les ostéoblastes et impliqué dans le métabolisme osseux.
- L'Atrasentan et le ZD4054 sont des antagonistes du récepteur A de l'endothéline-1 impliquée dans le développement des lésions osseuses.

Enfin, le fait que le cancer de la prostate évolue relativement lentement, justifie le recours à l'immunothérapie avec deux approches, les vaccins thérapeutiques et les anticorps immunomodulateurs contre les CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*).

4.4. Justification de la cible moléculaire retenue dans notre projet

Les progrès apportés ces dernières années dans le traitement du cancer de la prostate, mettent en lumière l'importance de concevoir des traitements capables à la fois de pallier l'apparition de résistance au Docétaxel et également de prendre en compte le phénomène d'angiogenèse responsable du développement de tumeurs et de l'invasion de cellules cancéreuses vers les lieux prioritaires de métastases, les os et le cerveau (*Bracarda, 2011 ; Colloca, 2011*).

Bracarda S, Logothetis C, Sternberg CN, Oudard S, *Current and emerging treatment modalities for metastatic castration-resistant prostate cancer*. BJU Int, 2011. **107** (Suppl 2): p. 13-20.

Colloca G, Venturino A, Checcaglini F, *Second-line chemotherapy in metastatic docétaxel-resistant prostate cancer: a review*. Med Oncol, 2011 Feb 20.

Nous avons donc choisi de mener notre projet avec des molécules capables d'intervenir sur la polymérisation de la tubuline, tel que le Docétaxel, mais présentant de plus une activité anti-angiogénique *via* un effet anti-vasculaire en prenant comme modèle un dérivé de la Combrétastatine-A4, la Phenstatine.

II. Intérêt de concevoir de nouveaux modulateurs de la polymérisation de la tubuline

1. Structure et rôle des microtubules

Les microtubules sont présents dans l'ensemble des cellules eucaryotes. Ils peuvent être fortement représentés dans certains types cellulaires comme les neurones où ils ont un rôle fondamental dans le transport axonal des vésicules, ou dans des cellules à forte activité sécrétoire. Ce sont des structures cytoplasmiques filamenteuses creuses de diamètre extérieur d'environ 25 nm, parfois rayonnant à partir d'un centre organisateur, le centrosome. Ils sont constitués d'un assemblage de 13 protofilaments formés par la polymérisation de dimères de tubuline α et β .

La tubuline est une protéine globulaire de 50 kDa (450 acides aminés) sous forme hétérodimérique associant une molécule de tubuline α et une molécule de tubuline β . Chez l'Homme, il existe 6 et 7 isoformes respectivement pour chaque type α et β , avec un profil et un taux d'expression variable selon les tissus et les types cellulaires. Des modifications post-traductionnelles différentes (polyglutamylation, polyglycylation...) et des mutations peuvent conditionner des associations différentes et intervenir, comme nous le verrons par la suite, dans des phénomènes de sensibilité ou de résistance à certains composés thérapeutiques agissant sur la polymérisation de la tubuline (Verdier-Pinard *et al*, 2003). Ces modifications post-traductionnelles contrôlent les fonctions des microtubules formés et ceci peut expliquer les rôles différents assurés par ces structures complexes dans de nombreux processus cellulaires tels que le transport intracellulaire, la mobilité cellulaire, la croissance neuronale ainsi que la mitose... (Hammond *et al*, 2008 ; Wloga *et Gaertig*, 2010).

Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. *Tubulin modifications and their cellular functions*. Curr Opin Cell Biol, 2008. 20(1): p. 71-6.

Verdier-Pinard P, Wang F, Burd B, Angeletti RH, Horwitz SB, Orr GA, *Direct analysis of tubulin expression in cancer cell lines by electrospray ionization mass spectrometry*. Biochemistry, 2003. 42(41): p. 12019-27.

Wloga D and Gaertig J, *Post-translational modifications of microtubules*. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 20): p. 3447-55.

De par leurs propriétés de polymérisation et de dépolymérisation, les microtubules assurent la ségrégation des chromosomes dupliqués aux pôles de la cellule (Fig. 7). Plus précisément, en prométaphase après la disparition de l'enveloppe nucléaire, les microtubules (en rouge) s'attachent aux chromosomes (en bleu) au niveau de leur kinétochore (en vert). Ils s'allongent ensuite pour amener les chromosomes au niveau du plan équatorial de la cellule en métaphase (phase dite de congression), puis séparent les chromosomes à une seule chromatide vers les pôles de la cellule lors de l'anaphase aboutissant en télophase à deux cellules filles identiques. Il suffit qu'un seul chromosome ne soit pas attaché aux microtubules lors de la métaphase pour induire un arrêt de la division cellulaire et une mort de la cellule par apoptose (Jordan et Wilson, 2004).

De plus, il a été démontré que le réarrangement dynamique du cytosquelette et des microtubules était nécessaire au phénomène d'angiogenèse (Hayot et al, 2002) puisque ce réarrangement induit une augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et l'adrénomédulline (Fernandez-Sauze, 2004), se traduisant par une croissance tumorale importante due à l'augmentation de la prolifération, de la différenciation ainsi que de la migration des cellules endothéliales. Tout ceci explique donc le rôle capital de l'instabilité dynamique des microtubules dans l'angiogenèse. Cette dynamique étant indispensable au bon déroulement de la mitose, les composés interférant avec celle-ci constitue, par conséquent, une stratégie efficace pour empêcher les cellules tumorales d'entrer en mitose et d'envahir les tissus environnants.

Les microtubules sont des structures polarisées comme l'actine des microfilaments, avec une extrémité (+) à croissance rapide dirigée vers la périphérie de la cellule et une extrémité (-) qui est associée au centrosome. Le centrosome est un complexe protéique situé près du noyau et constitué de deux centrioles eux-mêmes constitués de tubuline α , β mais également γ , δ et ϵ . Les centrosomes participent à la constitution du microscopie cellulaire et du fuseau mitotique. L'assemblage des dimères de tubuline en une structure microtubulaire se fait en plusieurs étapes (Fig. 8) : on a dans un premier temps, la polymérisation de dimères de tubuline α et β (chargées de GTP). Ces dimères s'associent « tête-bêche » pour former un protofilament.

Fernandez-Sauze S, Delfino C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin PM, Grisoli F, Ouafik L, Boudouresque F, *Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors.* Int J Cancer, 2004. **108**(6): p. 797-804.

Hayot C, Farinelle S, De Decker R, Decaestecker C, Darro F, Kiss R, Van Damme M, *In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton.* Int J Oncol, 2002. **21**(2): p. 417-25.

Jordan MA and Wilson L, *Microtubules as a target for anticancer drugs.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.

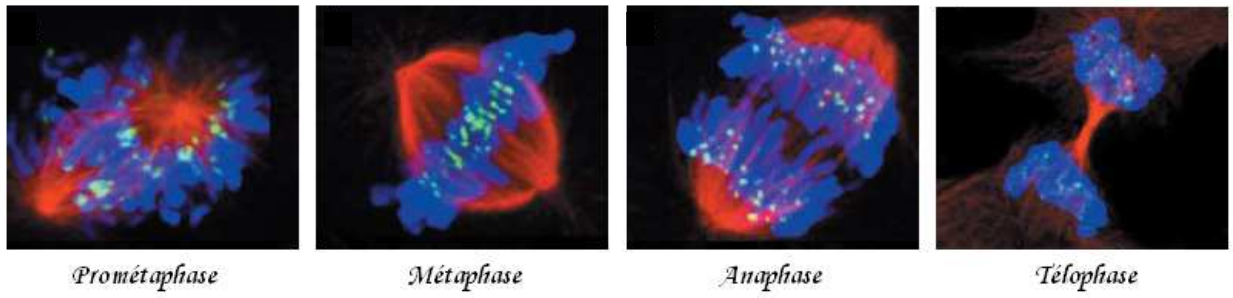


Fig. 7 : Les différentes étapes de la mitose
(D'après Jordan et Wilson, 2004)

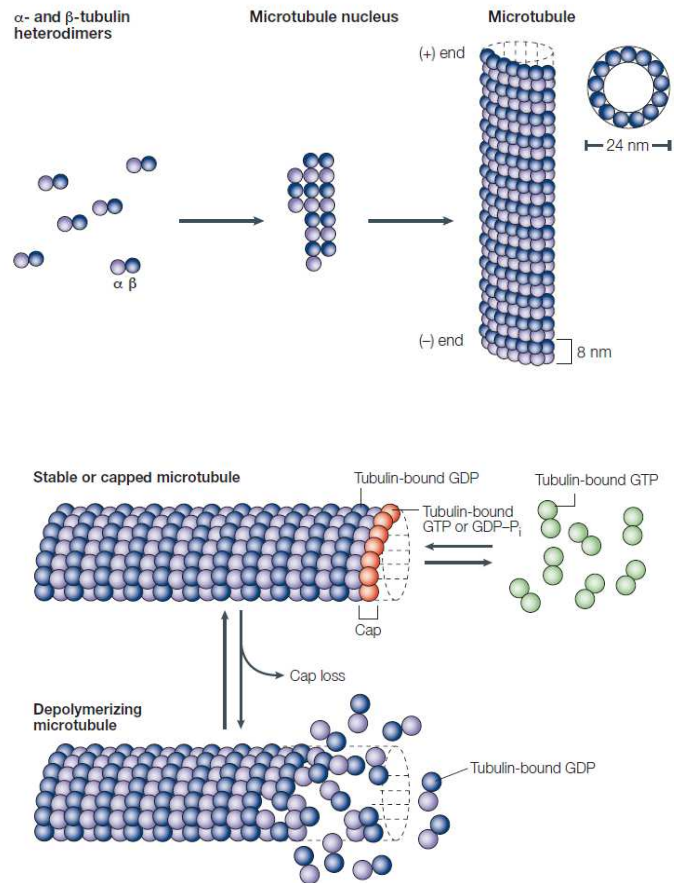


Fig. 8 : Dynamique de la polymérisation des microtubules
(D'après Jordan et Wilson, 2004)

Puis, un fragment de microtubule va se former par association latérale de 13 protofilaments et repliement du feuillet pour donner une structure rigide, et ainsi permettre l'élongation du microtubule par polymérisation (ajout de dimères) à l'extrémité (+).

Cette élongation se fait par l'ajout de dimères de tubuline-GTP qui est hydrolysée en tubuline-GDP au moment de l'accrochage à l'extrémité du microtubule, ce qui fournit l'énergie nécessaire à la dynamique de polymérisation (Fig. 8). Le « capping » formé par la tubuline β liée au GDP régule le passage polymérisation/dépolymérisation (Fig. 9). De nombreux facteurs contrôlent cette dynamique à la fois dans le temps et dans l'espace pour permettre le fonctionnement correct de ces microtubules dans ses différents rôles (Etienne-Manneville, 2010). Ces polymères de tubuline sont donc capables de fixer diverses protéines de régulation mais sont également susceptibles de fixer certaines molécules d'origine synthétique qui peuvent ainsi altérer la masse et la dynamique des microtubules. C'est sur cette constatation que repose la recherche de nouvelles molécules à visée anti-cancéreuse capables de concurrencer les composés ciblant l'ADN.

2. Mécanismes d'action des poisons du fuseau

Les poisons du fuseau sont, le plus souvent, des médicaments d'origine naturelle. Ils jouent sur la dynamique de polymérisation en se liant à différents endroits du microtubule et sur la tubuline soluble (Fig. 10).

Il existe deux principaux groupes d'agents ciblant les microtubules (Jordan et Kamath, 2007 ; Dumontet et Jordan, 2010) (Fig. 11 et 12) :

1) les agents qui déstabilisent la dynamique des microtubules par inhibition de la polymérisation des microtubules (Hsu et al, 2011) tels que la colchicine, les vinca-alcaloïdes (vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine, vinflunine...), et les combrétastatines. Les vinca-alcaloïdes ont été découverts dans les années 1950 dans le cadre d'un criblage de produits naturels qui a permis d'identifier dans la pervenche de Madagascar, *Catharanthus roseus*, un composé, la vinblastine, susceptible d'inhiber la croissance de la lignée cancéreuse L1210 (leucémie murine) (Kuehne et al, 2003).

Dumontet C and Jordan MA. *Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(10): p. 790-803.

Etienne-Manneville S, *From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players*. Curr Opin Cell Biol, 2010. 22(1): p. 104-11.

Hsu LC, Durrant DE, Huang CC, Chi NW, Baruchello R, Rondanin R, Rullo C, Marchetti P, Grisolia G, Simoni D, Lee RM. *Development of hemiassterlin derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization and synergize with a stilbene tubulin inhibitor*. Invest New Drugs, 2011.

Jordan MA and Kamath K, *How do microtubule-targeted drugs work? An overview*. Curr Cancer Drug Targets. 2007. 7(8): p. 730-42.

Kuehne ME, Bornmann WG, Markó I, Qin Y, LeBoulluec KL, Frasier DA, Xu F, Mulamba T, Ensinger CL, Borman LS, Huot AE, Exon C, Bizzarro FT, Cheung JB, Bane SL, *Syntheses and biological evaluation of vinblastine congeners*. Org Biomol Chem, 2003. 1(12): p. 2120-36.

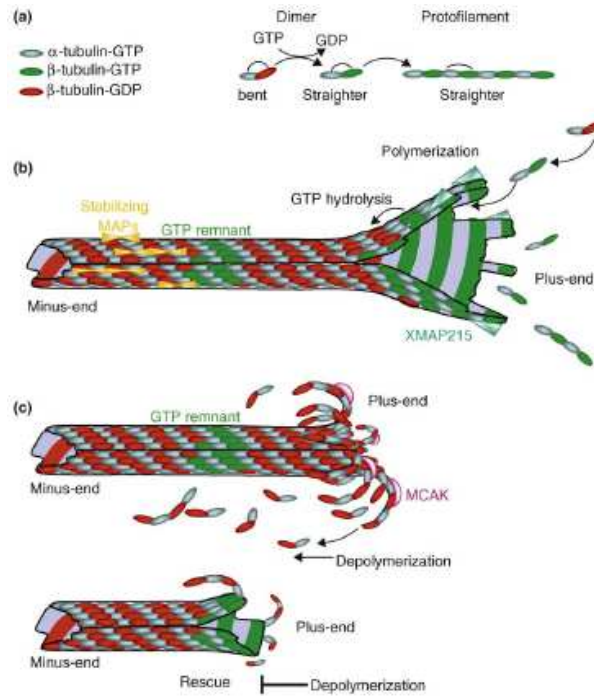


Fig. 9 : Conformation de proto-filament dans la dynamique des microtubules
(D'après Etienne-Manneville, 2010)

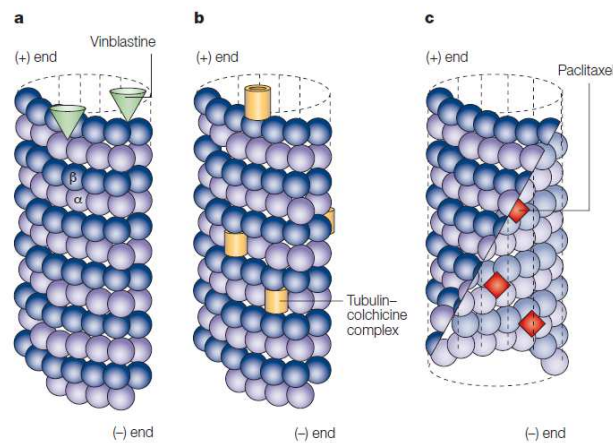
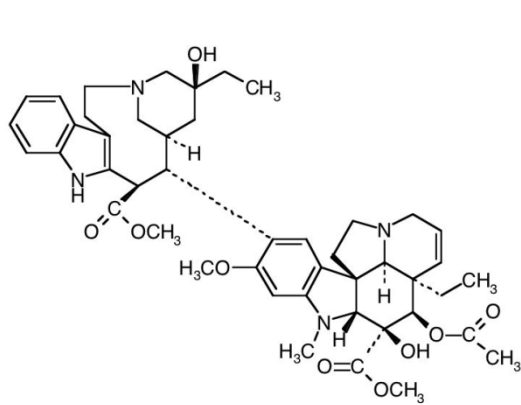
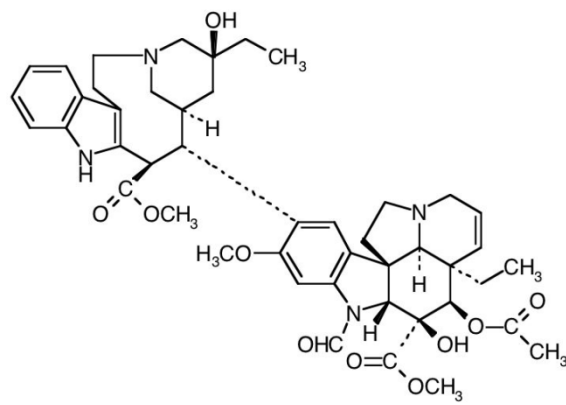


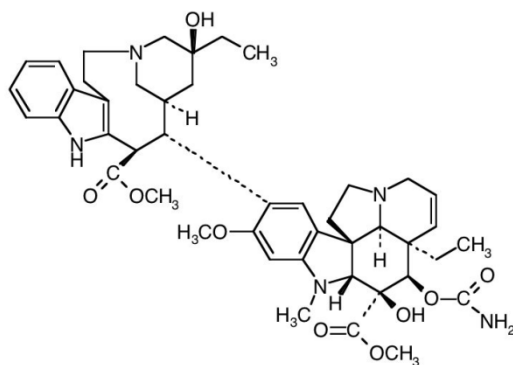
Fig. 10 : Liaison d'anti-mitotiques à différents sites des microtubules
(D'après Jordan et Wilson, 2004)



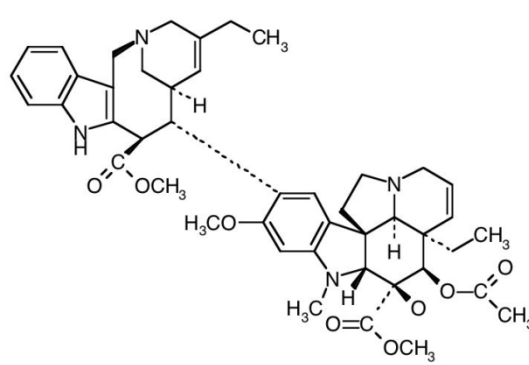
Vinblastine



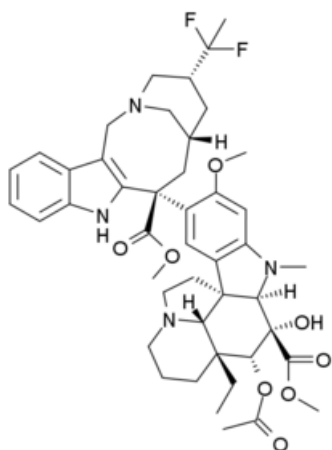
Vincristine



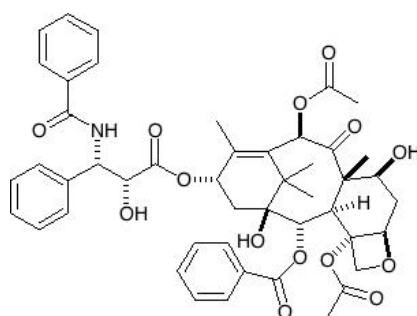
Vindésine



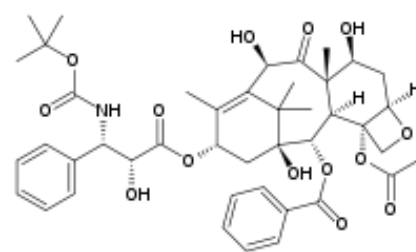
Vinorelbine



Vinflunine

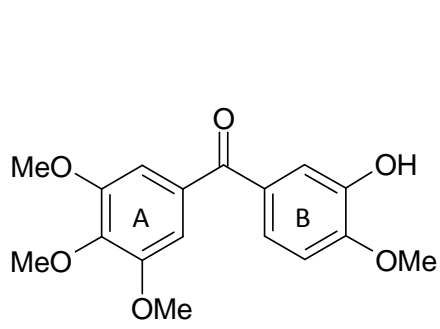


Taxol

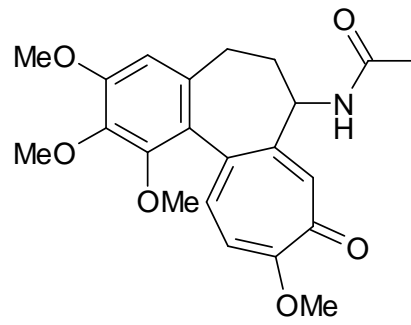


Taxotère

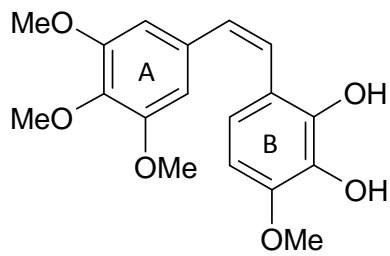
Fig. 11 : Structures des principaux composés anti-microtubulaires



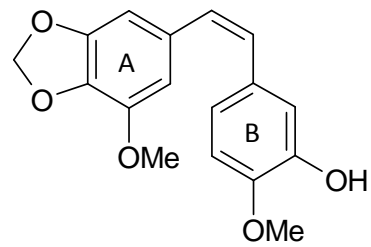
Phenstatine



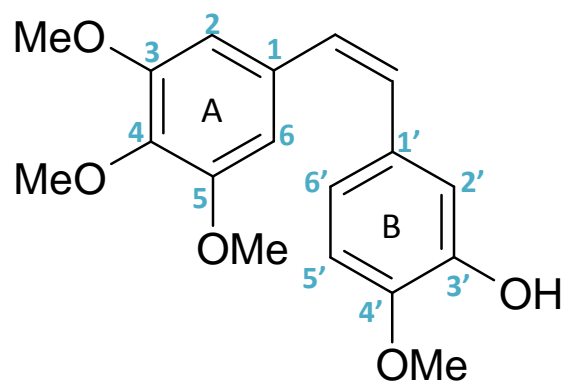
Colchicine



Combrétastatine A-1



Combrétastatine A-2



Combrétastatine A-4

Fig. 12 : Structures de la Phenstatine, de la Colchicine et des Combrétastatines A-1, A-2 et A-4

Les vinca-alcaloïdes se lient, de façon rapide et réversible à la sous-unité β de la tubuline qu'elle soit soluble ou insérée à l'extrémité du microtubule. Ces composés sont capables de réduire de 50 % la dynamique de polymérisation en augmentant le temps de pause (blocage en métaphase et apoptose). La colchicine, qui n'est pas utilisée comme médicament anti-cancéreux étant donnée sa grande toxicité, ne se lie aux microtubules qu'après formation d'un complexe avec la tubuline soluble. Le site de liaison de la colchicine est ciblé dans la mise au point de dérivés originaux des combretastatines. Nous présenterons ces études dans le paragraphe suivant.

2) les agents qui stabilisent la dynamique des microtubules par stimulation de la polymérisation des microtubules tels que les taxanes, vont quant à eux inhiber la dépolymérisation (Tabaczar *et al*, 2010). En se fixant sur la tubuline β dans la surface interne des microtubules, ils vont induire la formation de microtubules stables.

Ainsi, la persistance du fuseau lors de la mitose va empêcher la cellule de se diviser car la dépolymérisation des microtubules au niveau des kinétochores, étape cruciale lors de la séparation des chromosomes, ne pourra pas avoir lieu.

Les taxanes sont des alcaloïdes issus de l'if. Le premier d'entre eux, le Taxol® ou Paclitaxel, fut obtenu au début des années 60, également dans le cadre du criblage du NCI (National Cancer Institute) à partir de l'écorce de l'if du Pacifique, *Taxus brevifolia*. La mise au point de son héli-synthèse à partir des aiguilles de l'arbre puis de sa synthèse totale (Nicolaou *et al*, 1994) a contribué au développement de son utilisation clinique dans un grand nombre de cancers, en particulier dans le cancer de la prostate.

Les taxanes, le Docétaxel (TAXOTERE®) en particulier, ont montré une efficacité dans le traitement du cancer de la prostate en échappement hormonal. Un tournant de la chimiothérapie du cancer de la prostate évolué a été l'étude de phase III du Docétaxel (TAX 327) dans laquelle les auteurs ont comparé l'association Docétaxel / Prednisone à l'association Mitoxantrone / Prednisone chez des patients ayant un cancer de la prostate métastatique en échappement hormonal après un traitement hormonal de première ligne (Tannock *et al*, 2004). Pour cela, 1 006 patients ont été randomisés en 3 groupes.

Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K. *Total synthesis of taxol*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 630-4.

Tabaczar S, Koceva-Chyla A, Matczak K, Gwozdziński K. *Molecular mechanisms of antitumor activity of taxanes. I. Interaction of docétaxel with microtubules*. Postepy Hig Med Dosw, 2010. **64**: p. 568-81.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators. *Docétaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1502-12.

La durée médiane de survie a été de 18,9 mois dans le groupe recevant le Docétaxel toutes les 3 semaines, et de 16,5 mois dans le groupe traité par la Mitoxantrone. L'avantage de survie apporté par le Docétaxel a été constant dans les différents sous groupes définis par la présence ou pas de douleurs, l'état général et l'âge. La réduction des douleurs a également été plus fréquente chez les patients traités par Docétaxel toutes les 3 semaines, et le taux de réponse sur le PSA était significativement plus élevé dans les groupes traités au Docétaxel. Cette étude TAX 327 a donc montré que le Docétaxel donné toutes les trois semaines, associé à la Prednisone, pouvait significativement améliorer la survie chez les patients ayant un cancer de la prostate en échappement hormonal, et cette combinaison est désormais le traitement de référence chez ces patients. Sous Docétaxel, un avantage de survie est observé chez les patients traités avec dix cycles. La douleur et l'augmentation du PSA sous traitement par Docétaxel ne sont pas un critère de progression fiable et ne doivent pas systématiquement faire arrêter le traitement. L'introduction plus précoce du Docétaxel au cours de la maladie pourrait encore améliorer la survie.

Ces agents présentent des activités variables selon les types de cancer et la recherche actuelle dans ce domaine tend à concevoir des molécules présentant une spécificité tumorale en diminuant les effets secondaires, une neurotoxicité réduite et une insensibilité aux mécanismes de chimio-résistance tels que la surexpression des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*).

Il est important de signaler également que certains de ces agents présentent des effets anti-vasculaires en induisant la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette des cellules endothéliales principalement au niveau de la vascularisation tumorale immature.

La Combréstatine A-4 a plus particulièrement fait l'objet d'études de pharmacomodulations dans notre groupe de recherche et c'est la raison pour laquelle notre travail a porté sur un dérivé de cette famille : la Phenstatine.

3. La Combrétastatine A-4 (CA-4) et ses dérivés

La combrétastatine A-4 appartient à la famille chimique des stilbènes et a été isolée de l'écorce d'un arbre sud-africain, *Combretum caffrum*. Dès 1981, il avait été démontré que des composés contenus dans les extraits d'écorce possédaient une activité significative sur la maturation des astrocytes et la prolifération des lignées leucémiques lymphocytaires. Après isolement et identification de ces principes actifs, les Combrétastatines (Pettit *et al*, 1982), leur cible cellulaire a été caractérisée comme étant la tubuline (Hamel, 1983). Ces molécules inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules en se fixant sur le site de la colchicine.

Parmi les diverses Combrétastatines isolées de cet arbre, la Combrétastatine A-4 (CA-4), (Z)-1-(3, 4, 5-triméthoxy) phényl-2-(3'-hydroxy-4'-méthoxy) phényléthylène, est la plus cytotoxique (Pettit *et al*, 1989). Elle présente notamment une cytotoxicité bien supérieure à celle de la Combrétastatine A-1 pourvue d'un groupement hydroxy supplémentaire en position 2' sur le cycle B et de la Combrétastatine A-2 présentant un pont méthylène dioxy à la place des deux groupements méthoxy vicinaux sur le cycle A de la CA-4.

La CA-4 présente une certaine analogie structurale avec la colchicine : en particulier, dans les deux cas, les cycles A et B sont orientés de la même façon, le premier étant un triméthoxybenzène. Les travaux de Ravelli *et al* (2004) ont démontré que la colchicine en se liant au dimère de tubuline (sur la sous-unité β), en modifiait la conformation (Fig. 13).

La tubuline passe d'une conformation droite à une conformation courbe favorisant la perte d'adhésion avec les autres sous-unités de tubuline d'où perte des contacts entre les sous-unités indispensables pour maintenir la cohésion du protofilament et donc du microtubule, et la dépolymérisation.

La liaison de la colchicine à la tubuline est considérée comme quasi irréversible et lente. Par contre, la liaison de la CA-4 est réversible et rapide. Ceci pourrait justifier la moindre toxicité de la CA-4 par rapport à la colchicine. Des études de modélisation moléculaire menées dans le cadre de stratégies de « *drug-design* », ont permis de déterminer le mode de liaison de la CA-4 dans le site de la colchicine (Fig. 14) :

Hamel E and Lin CM. *Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimitotic agent, with tubulin*. Biochem Pharmacol, 1983. 32(24): p. 3864-7.

Pettit GR, Cragg GM, Herald DL, Schmidt JM, Lohavanijaya P, *Isolation and structure of combretastatin*. Can J Chem, 1982. 60: p.1374-6.

Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, Garcia-Kendall D. *Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4*. Experientia. 1989. 45(2): p. 209-11.

Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M. *Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain*. Nature, 2004. 428(6979): p. 198-202.

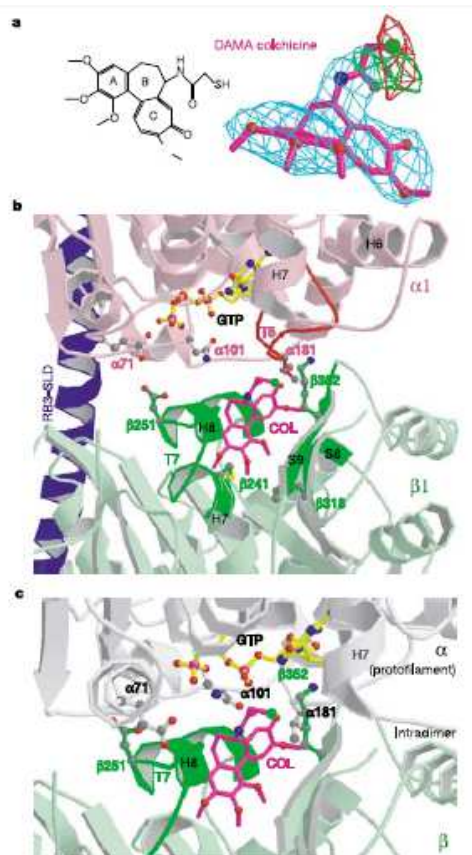


Fig. 13 : Site de liaison de la colchicine sur la tubuline (D'après Ravelli, 2004)

Un complexe dans lequel la colchicine a été remplacée par la DAMA-colchicine (N-désacétyl-N-(2-mercaptoacétyl)-colchicine) a permis de localiser le groupement N-acétyl et de définir sans ambiguïté l'orientation de la colchicine (a). Le site de la colchicine est surtout enfoui dans le domaine intermédiaire de la sous-unité β , entouré des bandes S8 et S9, de la boucle T7 et des hélices H7 et H8. La colchicine interagit avec la boucle T5 au voisinage de la sous-unité α (b). Il existe une interférence entre la liaison de la colchicine et la conformation de la tubuline au niveau des proto-filaments. La sous-unité α est à proximité de la sous-unité liée à la colchicine.

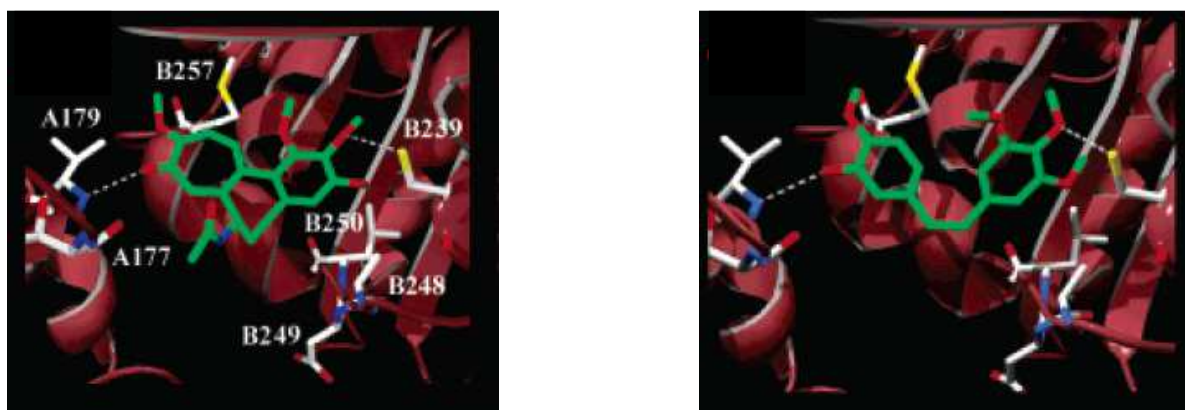


Fig. 14 : Modèle de liaison de la colchicine (à gauche) et de la CA-4 (à droite) au dimère de tubuline (D'après Nguyen et al, 2005)

Le squelette de la tubuline est représenté par les rubans de couleur **marron**. Les chaînes latérales au niveau du site de la colchicine (Thr α 177, Val α 179, Cys β 239, Ala β 248, Asp β 249 et Leu β 250), sont représentées en blanc (atomes de carbone de la tubuline) et en **vert** (atomes de carbone du site de la colchicine). Les atomes d'azote sont de couleur **bleu**, les atomes d'oxygène en **rouge** et les atomes soufrés en **jaune**. Les lignes blanches en pointillés montrent les ponts hydrogène inter-moléculaires.

- la liaison hydrogène entre le OH phénolique (accepteur de liaison hydrogène) et la fonction amide de la Val α 179.

- la liaison hydrogène entre le groupement méthoxy en position 4 du cycle A, avec le groupement thiol de la Cys β 239.

- les interactions hydrophobes entre le groupement méthoxy du cycle B et la chaîne latérale de la Val α 179 et la Met β 257.

- les interactions hydrophobes entre le groupement triméthoxybenzène et des résidus hydrophobes Leu β 255, Ala β 316, Val β 318 et Ile β 378.

- une contrainte conformationnelle imposée par le pont éthylénique de configuration *cis* (angle dièdre de 66°).

De part cette activité « anti-tubuline », la CA-4 possède *in vitro* non seulement des propriétés anti-prolifératives vis-à-vis d'un grand nombre de cellules cancéreuses, mais également des propriétés anti-vasculaires liées à une modification de la morphologie des cellules endothéliales proliférantes. Il a d'ailleurs été montré qu'*in vivo*, son action anti-tumorale était directement liée à cette activité anti-vasculaire (Sanna *et al*, 2010).

Les mécanismes d'action de la CA-4 ne sont pas encore élucidés de manière exhaustive. Les observations faites *in vitro* et *in vivo* mettent en évidence des effets dépendant de la concentration et du temps d'incubation retenus. Des mécanismes ont été proposés (Tozer *et al*, 2005) mais ne suffisent pas à expliquer tous les effets observés.

1) La CA-4, en empêchant la formation du fuseau mitotique présente un effet anti-prolifératif (voire cytotoxique à de fortes concentrations) vis-à-vis d'un large spectre de cellules tumorales y compris des cellules à résistance pléiotropique. Cette inhibition de la croissance cellulaire et/ou cette nécrose peut aussi se manifester vis-à-vis des cellules endothéliales.

2) La CA-4 peut également déstructurer les microtubules interphasiques des cellules qui ne se divisent pas. Suite à une dépolymérisation des microtubules, sous l'effet de la CA-4, une activation de la GTPase Rho A (Fig. 15 et 16) (liée à la libération du facteur GEF-H1) (Krendel *et al*, 2002) va induire la formation de fibres de stress d'actine (fibres d'actinomyosine) qui va déboucher sur une restructuration du cytosquelette.

Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 2002. 4(4): p. 294-301.

Sanna VK, Jaggi M, Kumar V, Burman AC, Evaluation of 5-hydroxy-2,3-diaryl (substituted)-cyclopent-2-en-1-ones as cis-restricted analogues of combretastatin A-4 as novel anti angiogenic and anticancer agents. *Invest New Drugs*, 2010. 28(4): p. 363-80.

Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC, Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(6): p. 423-35.

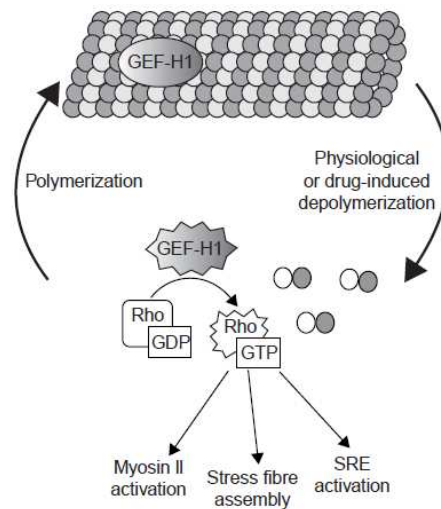


Fig. 15 : Activation de la GTPase Rho par GEF-H1
(D'après Krendel et al, 2002).

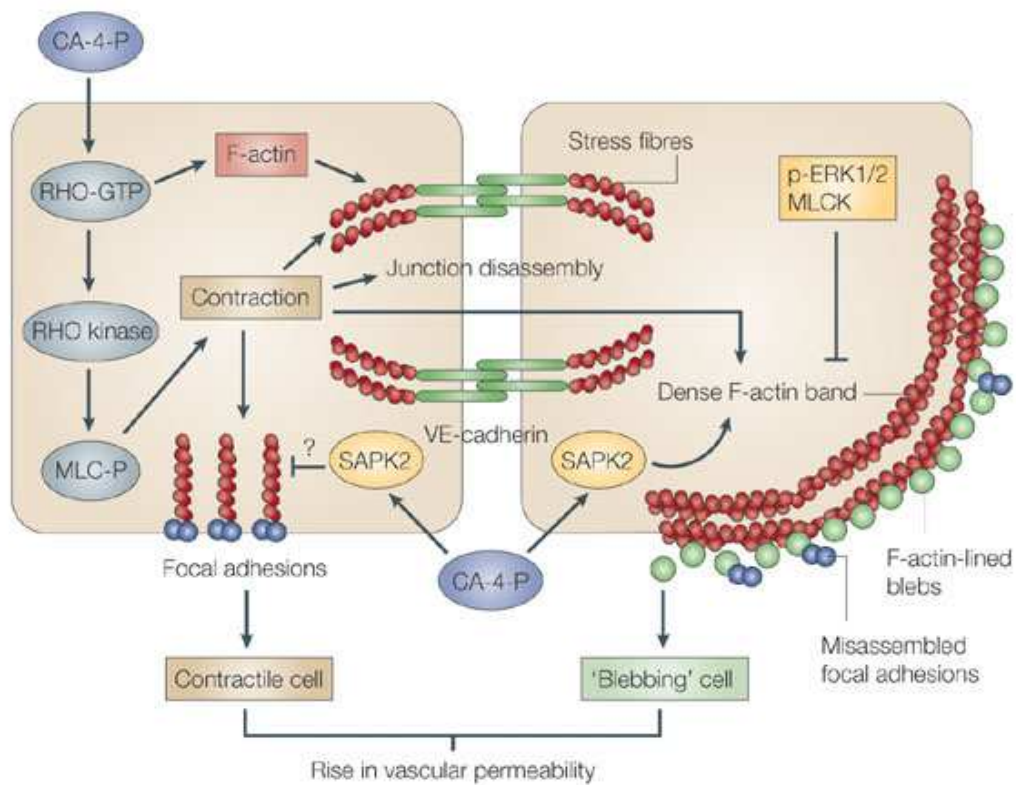


Fig. 16 : Voies de signalisation stimulées lors de la dépolymérisation des microtubules par la CA-4P associées à une augmentation de la perméabilité vasculaire
(D'après Tozer et al, 2005).

En effet, comme ces fibres d'actinomyosine sont reliées aux cadhérines, leur contraction va provoquer une perte d'adhésion entre les cellules (dissociation des jonctions intercellulaires) et donc, en particulier dans l'endothélium vasculaire, une augmentation de la perméabilité du vaisseau sanguin tumoral. Cette restructuration du cytosquelette s'accompagne également de l'apparition de « blebs », bourgeonnement qui serait sélectif de la cellule endothéliale reflétant des différences dans la composition et la régulation du cytosquelette selon le type cellulaire impliqué.

3) La désorganisation du cytosquelette d'actine, en modifiant les forces contractiles de la cellule et donc la motilité cellulaire, explique l'effet anti-angiogénique de la CA-4, c'est-à-dire son action vis-à-vis de la néo-angiogenèse. En intervenant sur la GTPase Rho A et sur la dynamique des microtubules, la CA-4 modifie les interactions cellule-matrice d'où diminution de la migration cellulaire.

Ces différents mécanismes expliquent en grande partie les effets de la CA-4P (forme soluble de la CA-4) (Pettit *et al*, 1998 et 2002), *in vivo*, après libération du principe actif par action des phosphatases alcalines présentes en grande quantité aux abords des cellules endothéliales.

Toutes ces données sur l'activité anti-tumorale de la CA-4 justifient les nombreuses recherches qui ont été menées pour résoudre les problèmes liés à la faible disponibilité et à l'instabilité chimique de ce composé d'origine naturelle. Les pharmacomodulations ont concerné les trois parties de la molécule : le groupement triméthoxybenzène A, le noyau méthoxyphénol B et le pont éthylénique. De plus, des articles-revues sont régulièrement publiés (Tron *et al*, 2006 ; Chaudhary *et al*, 2007 ; Shan *et al*, 2011 ; Marrelli *et al*, 2011) afin d'établir des relations structures-activités pour ces nombreux composés originaux.

Parmi les différentes classes de molécules modulées au niveau du connecteur reliant les deux noyaux de la CA-4, la famille des benzophénones a suscité un intérêt particulier suite aux travaux de l'équipe de Pettit et à la découverte à la fin des années 1990 de la Phenstatine (Pettit *et al*, 1998).

Chaudhary A, Pandeya SN, Kumar P, Sharma PP, Gupta S, Soni N, Verma KK, Bhardwaj G, *Combretastatin a-4 analogs as anticancer agents*. Mini Rev Med Chem, 2007. 7(12): p. 1186-205.

Marrelli M, Conforti F, Statti GA, Cachet X, Michel S, Tillequin F, Menichini F, *Biological potential and structure-activity relationships of most recently developed vascular disrupting agents: an overview of new derivatives of natural combretastatin a-4*. Curr Med Chem, 2011. 18(20): p. 3035-81.

Pettit GR, Toki B, Herald DL, Verdier-Pinard P, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK, *Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate*. J Med Chem, 1998. 41(10): p. 1688-95.

Pettit GR, Grealish MP, Jung MK, Hamel E, Pettit RK, Chapuis JC, Schmidt JM, *Antineoplastic agents. 465. Structural modification of resveratrol: sodium resverastatin phosphate*. J Med Chem, 2002. 45(12):2534-42.

Shan Y, Zhang J, Liu Z, Wang M, Dong Y. *Developments of combretastatin A-4 derivatives as anticancer agents*. Curr Med Chem, 2011. 18(4): p. 523-38.

Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA, *Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions*. J Med Chem, 2006. 49(11): p. 3033-44.

La Phenstatine est reconnue au niveau du site de la colchicine par le biais d'un jeu d'interactions similaires à celles de la CA-4, la seule différence structurale résidant au niveau du pont reliant les deux noyaux aromatiques. En effet, le remplacement du pont éthylénique par un motif carbonyle, accepteur de liaison hydrogène, augmente le potentiel d'interactions avec les résidus de la sous-unité β de la tubuline. Plus précisément, sur la base du modèle de liaison préalablement décrit (Nguyen *et al*, 2005), il a été démontré que des liaisons hydrogène s'établissent entre l'oxygène du carbonyle et les hydrogènes des fonctions amides des résidus Ala β 248 - Asp β 249 - Leu β 250. Ces liaisons hydrogène supplémentaires pourraient être responsables d'une affinité supérieure pour la tubuline (IC₅₀ de 0,4 μ M pour la Phenstatine au lieu de 2,2 μ M pour la CA-4). Cette molécule présente une activité cytotoxique équivalente à celle de la CA-4 sur une large gamme de lignées cancéreuses. De plus, le groupement carbonyle évite l'isomérisation en forme *trans* moins active, rencontrée avec la CA-4.

Sur la base de ce deuxième chef de file et de son dérivé hydroxyphenstatine (Pettit *et al*, 2000), de nouveaux inhibiteurs du site de la colchicine ont été synthétisés (Alvarez *et al*, 2009 ; Messaoudi *et al*, 2009) et ont présenté des activités diverses sur les lignées cancéreuses. Certains dérivés sont actuellement en essais précliniques (Pettit *et al*, 2000 ; Magalhães *et al*, 2011 ; Pettit *et al*, 2005).

Bien que la Phenstatine n'ait pas connu de développement clinique, elle semble donc posséder une structure intéressante pour progresser vers la conception de composés anti-microtubulaires. C'est pourquoi nous avons retenu cette molécule pour mener notre étude de métabolisation et suivre l'influence de l'environnement sur son activité *in vivo*.

Alvarez R, Alvarez C, Mollinedo F, Sierra BG, Medarde M, Peláez R, *Isocombretastatins A: 1,1-diarylethenes as potent inhibitors of tubulin polymerization and cytotoxic compounds*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(17): p. 6422-31.

Magalhães HI, Bezerra DP, Cavalcanti BC, Wilke DV, Rotta R, de Lima DP, Beatriz A, Alves AP, Bitencourt Fda S, de Figueiredo IS, Alencar NM, Costa-Lotufu LV, Moraes MO, Pessoa C. *In vitro and in vivo antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011. **68**(1): p. 45-52.

Messaoudi S, Tréguier B, Hamze A, Provot O, Peyrat JF, De Losada JR, Liu JM, Bignon J, Wdzieczak-Bakala J, Thoret S, Dubois J, Brion JD, Alami M, *Isocombretastatins a versus combretastatins a: the forgotten isoCA-4 isomer as a highly promising cytotoxic and antitubulin agent*. *J Med Chem*, 2009. **52**(14): p. 4538-42.

Nguyen TL, McGrath C, Hermone AR, Burnett JC, Zaharevitz DW, Day BW, Wipf P, Hamel E, Gussio R, *A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach*. *J Med Chem*, 2005. **48**(19): p. 6107-16.

Pettit GR, Grealish MP, Herald DL, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK, *Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug*. *J Med Chem*, 2000. **43**(14): p. 2731-7.

Pettit GR, Anderson CR, Gapud EJ, Jung MK, Knight JC, Hamel E, Pettit RK. *Antineoplastic agents. 515. Synthesis of human cancer cell growth inhibitors derived from 3,4-methylenedioxy-5,4'-dimethoxy-3'-amino-Z-stilbene*. *J Nat Prod*, 2005. **68**(8): p. 1191-7.

PARTIE 2 : IMPLICATION DE LA MÉTABOLISATION VIA LES CYTOCHROMES P450 SUR LE DEVENIR D'UNE MOLÉCULE A VISÉE THÉRAPEUTIQUE

Le chapitre précédent a permis de mettre en évidence l'intérêt de progresser dans la conception de nouveaux composés inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline. Cependant, à ce stade de la conception, il est essentiel de se pencher sur le devenir dans l'organisme des molécules synthétisées, c'est-à-dire sur les différentes voies de métabolisation qu'elles pourront subir sous l'effet d'une transformation biologique ou modifiée par des conditions physiologiques ou environnementales. Dans cette deuxième partie, nous allons donc évoquer certains des principaux facteurs endogènes et/ou exogènes qui peuvent intervenir dans la métabolisation d'un composé à visée thérapeutique. Cette étape doit absolument être prise en compte et étudiée précocement puisqu'il est indispensable d'évaluer le degré de contribution de métabolites actifs dans les effets thérapeutiques observés. De plus, cette identification des métabolites peut représenter un outil dans l'optimisation des chefs de file et certains métabolites se sont même retrouvés sur le marché avec des activités améliorées par rapport au composé initial (*Fura et al, 2004 ; Huttunen et al, 2008*).

Après **absorption** dans l'organisme et **distribution** vers les différents organes et tissus par le biais de la circulation sanguine, le médicament subit des transformations au niveau hépatique et extra-hépatique. Cette **biotransformation**, nécessaire à l'**élimination** de la molécule, est parfois indispensable à son efficacité (on peut donner comme exemples les « prodrugs ») mais peut également modifier, de façon non recherchée, son activité et sa toxicité. Essayer de prévoir le devenir d'une molécule à visée thérapeutique dans un organisme, en particulier lorsque cet organisme est soumis à l'influence des facteurs exogènes, constitue donc une étape essentielle pour progresser dans la définition de thérapie personnalisée.

Après avoir rappelé des données récentes concernant le rôle des cytochromes P450 dans le métabolisme des xénobiotiques, nous résumerons quelques facteurs susceptibles de réguler ce système et d'influencer ainsi les effets des thérapies.

Fura A, Shu YZ, Zhu M, Hanson RL, Roongta V, Humphreys WG, *Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery*. J Med Chem, 2004. **47**(18): p. 4339-51.

Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J, *Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery*. Curr Med Chem, 2008. **15**(23): p. 2346-65.

I. Métabolisme des xénobiotiques – Implication des cytochromes P450

La prise en charge des xénobiotiques est assurée par des systèmes enzymatiques agissant en synergie et regroupés sous le terme d'Enzymes du Métabolisme des Xénobiotiques (EMX). Ces EMX peuvent être classées en enzymes de **phase I** (dites de fonctionnalisation) et de **phase II** (dites de conjugaison). Les molécules hydrophiles obtenues par l'action de ces EMX sont excrétées de la cellule par les **transporteurs (phase III)**. De plus, des **facteurs nucléaires** coordonnent le métabolisme et le transport de ces composés.

Les enzymes de phase I comprennent essentiellement des hydrolases et des oxydo-réductases. Ces réactions sont principalement catalysées par les enzymes de la superfamille des mono-oxygénases à cytochromes P450 (P450 ou CYPs) qui catalysent des transformations chimiques (hydroxylation, époxydation, réduction, désalkylation et oxydation) sur des atomes de carbone, d'azote et de soufre. Il existe de nombreuses isoformes (18 familles et 57 gènes identifiés chez l'Homme, répartis sur 15 chromosomes (*David Nelson's P450 Home page*). Ces enzymes présentent une spécificité relative et chevauchante car un CYP peut métaboliser plusieurs substrats et un substrat peut être métabolisé par plusieurs CYPs. D'autres enzymes peuvent également intervenir dans ces réactions de phase I tels que les flavines mono-oxygénases (*Cashman et Zhang, 2006 ; Cashman, 2008*), les alcools déshydrogénases, les estérases et les monoamines oxydases.

Les réactions de phase II sont assurées par des transférases (UDP-glucuronyl-transférase, méthyl transférases, acyl CoA transférases...) qui catalysent après fonctionnalisation, l'ajout d'un radical hydrophile (acide glucuronique, méthyl, acétate, glutathion, glycine, sulfate) pour permettre l'élimination du conjugué dans la bile ou les urines.

Les transporteurs permettent l'excrétion des xénobiotiques hydrophiles ou de leurs métabolites issus de la phase II hors de la cellule. Cette étape est assurée par des protéines de transport de type ATP-dépendantes telles que les ABC (*ATP-Binding Cassette*) ou appartenant à la superfamille des SLC (*Solute Carriers*). Ces transporteurs membranaires peuvent se situer sur la face apicale ou baso-latérale des cellules et ainsi éliminer les composés conjugués dans le sang, la lumière intestinale, la bile ou l'urine.

Cashman JR, Zhang J, *Human flavin-containing monooxygenases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. 46: p. 65-100.

Cashman JR, *Role of flavin-containing monooxygenase in drug development*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. 4(12): p. 1507-21.

Nelson D, <http://dnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>

Les transporteurs « Multiple Drug Resistance (MDR) » ont été les premiers étudiés du fait de leur rôle dans les chimiorésistances des cellules cancéreuses (*Bradley et al, 1988*). Il a été montré que la protéine MDR1 également appelée P-170 ou glycoprotéine-P est exprimée dans le foie et le petit intestin (*Schuetz et al, 1995*), avec comme fonction d'exporter les substances exogènes hors de la cellule (*Schinkel et al, 1996 ; Schuetz et al, 1996*). Par la suite de nombreuses protéines possédant également ces fonctions ont été caractérisées. La diffusion passive des médicaments à l'intérieur et à l'extérieur des cellules est fréquente mais les transporteurs peuvent avoir des effets importants sur la sélectivité tissulaire des médicaments (*Zhang et al, 2010*). Les transporteurs peuvent stimuler ou limiter l'absorption ou l'excrétion de substances exogènes d'un organe ou d'un tissu et induire des effets additifs sur les activités biologiques des xénobiotiques (*Westlind-Johnsson et al, 2003 ; Yano et al, 2000*).

Le niveau d'expression de ces enzymes est sous la dépendance de cascades de régulation qui font généralement intervenir des récepteurs nucléaires également appelés xénosenseurs. Le rôle de tels récepteurs consiste à détecter la présence des xénobiotiques dans la cellule et à coordonner l'expression des gènes codant pour les EMX et les transporteurs les mieux appropriés pour activer, désactiver et/ou éliminer ces composés. Parmi ces xénosenseurs, on distingue notamment l'Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), le Pregnane X-Receptor (PXR) et le Constitutive Androstane Receptor (CAR) (*Fig. 17*) (*Ingelman-Sundberg, 2004*).

La régulation des transporteurs implique les mêmes systèmes que celle des CYPs. Par exemple, les glycoprotéines-P et les CYPs de la sous-famille 2C et 3A sont régulés positivement ou négativement par le PXR (*Schuetz et al, 1996*). Les glycoprotéines-P peuvent, en diminuant le taux de médicaments, inhiber certains CYPs (*Schuetz et al, 1999 ; Yasuda et al, 2002*).

Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **948**(1): p. 87-128.

Ingelman-Sundberg M, *Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(1): p. 89-104.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs*. J Clin Invest, 1996. **97**(11): p. 2517-24.

Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD, *Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(2): p. 1011-8.

Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD, *P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4001-5.

Schuetz EG, Schinkel AH, *Drug disposition as determined by the interplay between drug-transporting and drug-metabolizing systems*. J Biochem Mol Toxicol, 1999. **13**(3-4): p. 219-22.

Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M, *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(6): p. 755-61.

Yano JK, Koo LS, Schuller DJ, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL, *Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon Sulfolobus solfataricus*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31086-92.

Yasuda K, Lan LB, Sanglard D, Furuya K, Schuetz JD, Schuetz EG, *Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(1): p. 323-32.

Zhang Y, Zhao T, Li W, Vore M, *The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation*. Mol Pharmacol, 2010. **77**(2): p. 237-46.

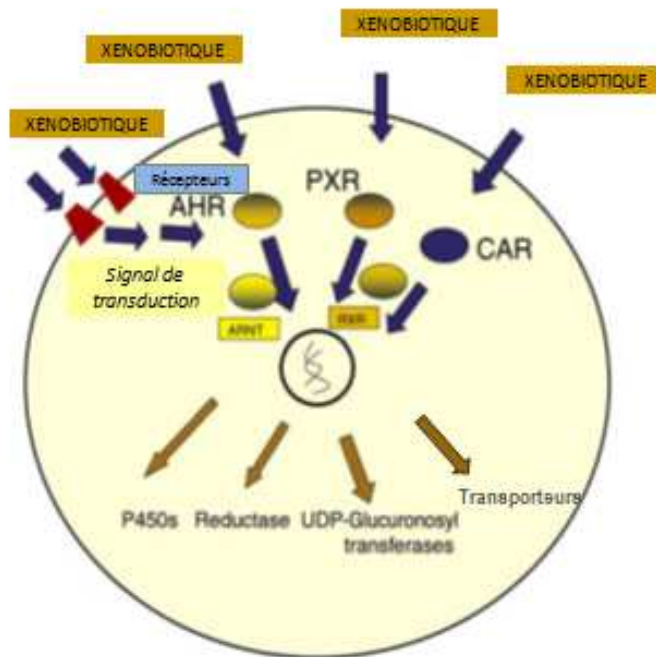


Fig. 17 : Mécanismes simplifiés de la régulation de l'expression des CYPs et d'autres enzymes du métabolisme des xénobiotiques
 (D'après Ingelman-Sundberg, 2004)

Un grand nombre de xénobiotiques, dont les facteurs environnementaux, et de pathologies influencent par ce biais l'activité et/ou l'expression des CYPs et des transporteurs et peuvent, par conséquent, avoir des effets sur l'activité biologique finale, l'efficacité des médicaments et/ou d'autres substances chimiques. A l'origine de toute cette cascade de biotransformations, le métabolisme oxydatif induit par les cytochromes P450 représente une voie métabolique privilégiée (*Rendic, 2002*) et a, plus particulièrement, retenu notre attention.

1. Généralités – structures et mécanismes d'action des cytochromes P450

Les CYPs sont des hémoprotéines (*Fig. 18*), initialement identifiées comme des pigments dans les microsomes hépatiques de rat (*Klingenberg, 1958*), et qui correspondent à une famille multi-génique comprenant de nombreuses isoformes réparties chez tous les êtres vivants (des bactéries aux mammifères). Le nom de cytochrome P450 provient de la propriété de ces pigments d'émettre un pic d'absorbance à 450 nm, spécifique de ces hémoprotéines (*Omura et Sato, 1962*). Ces enzymes ont une structure globulaire constituée de sous-unités α et β et d'un groupement prosthétique, l'hème (*Danielson, 2002*).

Les CYPs sont formés d'environ 500 acides aminés. L'alignement de toutes les séquences d'acides aminés des CYPs fait apparaître une très faible conservation et seuls trois acides aminés sont parfaitement conservés (*Mestres, 2005*). La partie la plus conservée est retrouvée dans le cœur de la protéine et reflète le mécanisme commun de transfert d'électrons et de protons et d'activation d'oxygène. La région la plus variable correspond à la partie amino-terminale impliquée dans l'adressage et l'ancrage à la membrane, et à la séquence de liaison et de reconnaissance du substrat (*Werck-Reichhart et al, 2000*). Contrairement aux CYPs bactériens, les CYPs eucaryotes sont associés à la membrane externe du réticulum endoplasmique ou se trouvent dans les mitochondries (membrane interne, externe ou matrice). L'association CYPs / bicouche phospholipidique est un critère important pour le maintien d'une orientation correcte de la protéine et donc un transfert d'électrons efficace à partir du partenaire redox, la NADPH cytochrome P450 réductase (*Williams et al, 2000 ; Nussio et al, 2010*).

Danielson PB, *The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans*. *Curr Drug Metab*, 2002. **3**(6): p. 561-97.

Klingenberg M, Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1958. **75**(2): p. 376-86.

Mestres J, *Structure conservation in cytochromes P450*. *Proteins*, 2005. **58**(3): p. 596-609.

Nussio MR, Voelcker NH, Miners JO, Lewis BC, Sykes MJ, Shapter JG, *AFM study of the interaction of cytochrome P450 2C9 with phospholipid bilayers*. *Chem Phys Lipids*, 2010. **163**(2): p. 182-9.

Omura T, Sato R, *A new cytochrome in liver microsomes*. *J Biol Chem*, 1962. **237**: p. 1375-6.

Rendic S, *Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data*. *Drug Metab Rev*, 2002. **34**(1-2): p. 83-448.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R, *Cytochromes P450: a success story*. *Genome Biol*, 2000. **1**(6): p.1-9.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE, *Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity*. *Mol Cell*, 2000. **5**(1):121-31.

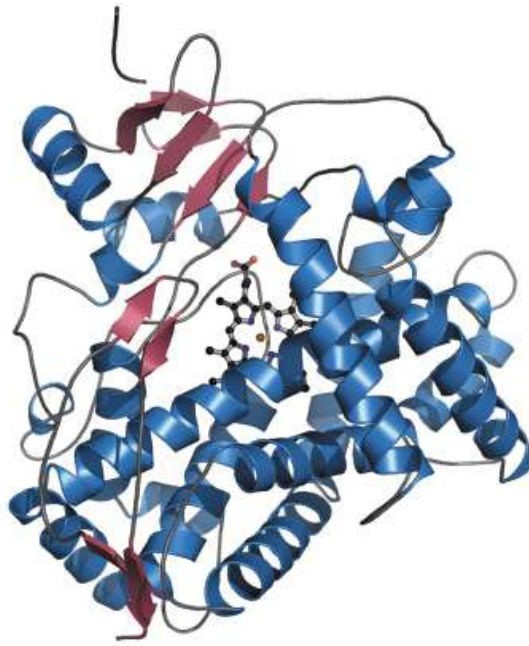


Fig. 18 : Structure du CYP2D6 : les hélices α (bleu), les feuillets β (rouge). L'hème est représenté au centre de la structure (D'après Yarnell, 2009).

La nature de la chaîne lipidique joue un rôle important dans la régulation fonctionnelle du CYP (Ahn *et al*, 2007). L'extrémité amino-terminale de la protéine (riche en acides aminés hydrophobes) est ancrée dans la membrane et ceci permet au domaine catalytique de se trouver à la surface cytoplasmique du réticulum endoplasmique et ainsi, les substrats hydrophobes peuvent pénétrer directement dans le site actif de l'enzyme. De plus, la partie de l'enzyme liant l'hème est perpendiculaire à la surface membranaire ce qui facilite l'interaction avec le NADPH cytochrome P450 réductase. L'échange d'électrons entre le NADPH et l'hème se ferait *via* un changement conformationnel de la cytochrome P450 réductase au niveau de la bicouche lipidique (Laursen *et al*, 2011). Une structure ouverte de la cytochrome P450 réductase liée au NADPH et à ses co-enzymes, FMN (Flavine Mononucléide) et FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), faciliterait le transfert d'électrons vers l'hème du CYP alors qu'une structure fermée permettrait le transfert de l'électron du FAD au FMN (Fig. 19). Le cycle catalytique qui succède à cette première étape a été largement étudié et relativement bien caractérisé même s'il reste encore des controverses et des débats quant à la nature des espèces oxygénées impliquées dans les réactions catalysées par les CYPs (Newcomb *et al*, 2003 ; McLean *et al*, 2007). Après transfert de l'électron sur le Fe^{3+} de l'hème et sa réduction en Fe^{2+} , une liaison réversible avec O_2 donne un complexe fer-ion superoxyde. Une seconde réduction (par un second électron transféré du partenaire redox) donne une espèce « fer lié à un peroxyde d'hydrogène ». Une protonation sur l'oxygène distal forme un intermédiaire fer-hydroperoxy et une seconde protonation sur l'oxygène distal aboutit à une forme oxo-fer et une perte d'une molécule d'eau (une protonation sur l'oxygène proximal peut donner une forme hydroperoxyde qui se dissocie). Enfin, cette forme hautement réactive de l'oxygène peut permettre l'hydroxylation du substrat présent dans le site actif (Fig. 20).

Si les séquences en acides aminés impliquées dans cette réaction catalytique sont bien conservées dans les différents cytochromes, il n'en est pas de même pour le reste de la protéine et en particulier pour ce qui est du site de fixation du substrat.

Ahn T, Kim M, Yun CH, Chae HJ, *Functional regulation of hepatic cytochrome p450 enzymes by physicochemical properties of phospholipids in biological membranes*. *Curr Protein Pept Sci*, 2007. **8**(5): p. 496-505.

Laursen T, Jensen K, Møller BL, *Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1814**(1): p. 132-8.

McLean KJ, Girvan HM, Munro AW, *Cytochrome P450/redox partner fusion enzymes: biotechnological and toxicological prospects*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2007. **3**(6): p. 847-63.

Newcomb M, Hollenberg PF, Coon MJ, *Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations*. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **409**(1): p. 72-9.

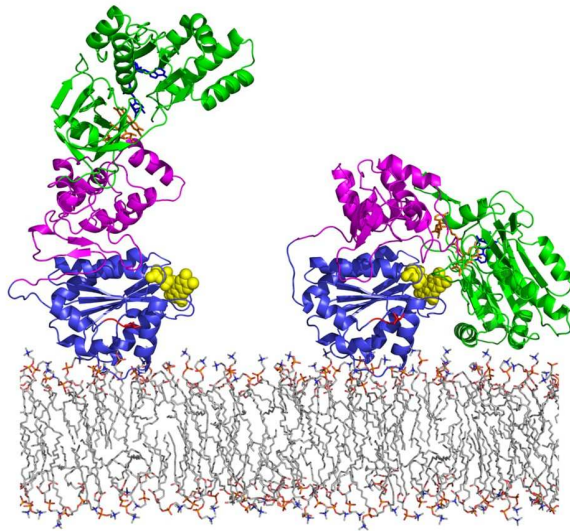


Fig. 19 : Modèle de conformations ouverte et fermée de la Cytochrome P450 réductase dans la bicouche lipidique
(D'après Laursen et al, 2011).

La structure ouverte (à gauche) est compatible avec le transfert d'électrons de l'hème au FMN (bleu).
La structure fermée (à droite) est optimale pour le transfert d'électrons du FAD au FMN (rose).
Le domaine de liaison au NADPH est en vert, la coenzyme FMN représentée par des sphères jaunes, la coenzyme FAD par le squelette de couleur orange et le NADPH par le squelette de couleur bleu.

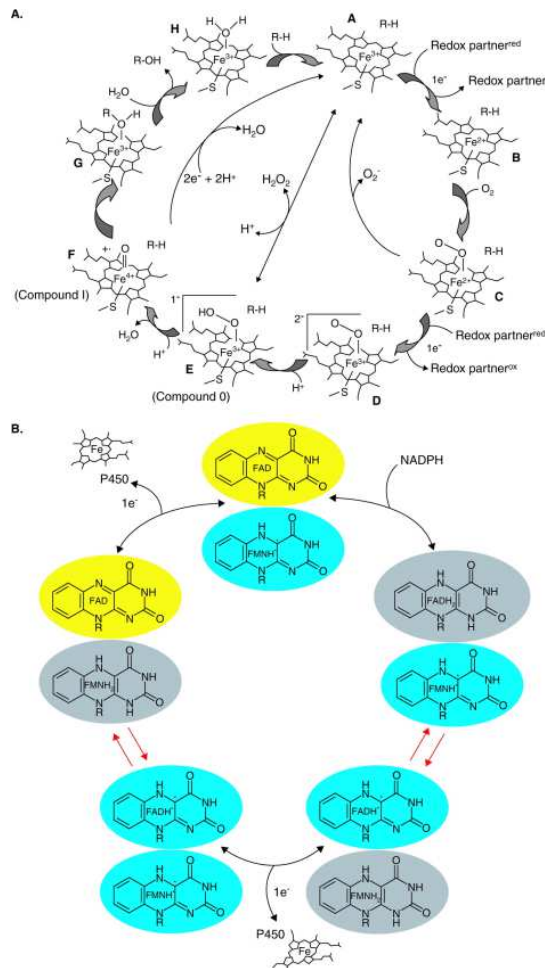


Fig. 20 : Cycles catalytiques des CYPs et de la CYP réductase
(D'après McLean et al, 2007)

Ces différences ont permis d'établir une classification des CYPs et également de distinguer des polymorphismes ou des mutations qui peuvent avoir des conséquences pharmacologiques considérables (Wang *et al*, 2009 ; Lewis *et Ito*, 2010).

2. Classification

Plus de 7 000 séquences de gènes de CYPs ont été identifiées toutes espèces confondues. Le génome humain possède 57 gènes (et 58 pseudogènes) codant pour les CYPs et les enzymes correspondantes qui sont classées en familles (≥ 40 % d'homologie de séquence : CYP1, CYP2...) et en sous-familles (≥ 55 % d'homologie de séquence : CYP1A, CYP1B...) (Fig.21).

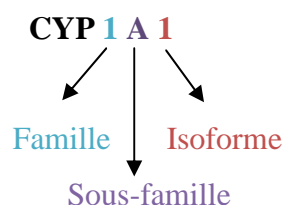


Fig. 21 : Nomenclature des cytochromes P450

Chaque sous-famille peut contenir plusieurs isoformes bien distinctes ayant plus de 97% de similitudes, allèles compris (Danielson, 2002) de type CYP3A4, CYP2D6... Chaque type de cytochrome P450 a une fonction différente (Brown *et al*, 2008). Ils catalysent de nombreuses réactions métaboliques ayant des effets sur l'activité biologique de substances endogènes (stéroïdes, acides gras, éicosanoïdes, vitamines...) ou, pour quinze d'entre eux, exogènes (xénobiotiques, dont font partie les médicaments). 75% des réactions de biotransformation des médicaments sont catalysées par les CYPs (Williams *et al*, 2000 ; Wienkers *et Heath*, 2005) et parmi les réactions impliquant les CYPs, 90 à 95% sont catalysées par cinq des 57 CYPs humains : les CYPs 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 et 3A4, cette dernière isoforme intervient dans environ 50% des réactions (Williams *et al*, 2000 ; Wienkers *et Heath*, 2005).

Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN, *Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates*. Drug Metab Rev, 2008. **40**(1): p. 1-100.

Danielson PB, *The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans*. Curr Drug Metab, 2002. **3**(6): p. 561-97.

Lewis DF, Ito Y, *Human CYPs involved in drug metabolism: structures, substrates and binding affinities*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010. **6**(6): p. 661-74.

Wang JF, Zhang CC, Chou KC, Wei DQ, *Structure of cytochrome p450s and personalized drug*. Curr Med Chem, 2009. **16**(2): p. 232-44.

Wienkers LC, Heath TG, *Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 825-33.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE, *Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity*. Mol Cell, 2000. **5**(1):121-31.

Il existe d'autres CYPs impliqués dans ces réactions telles que les CYP 2A6, 2B6 et 2C8. Toutes les isoformes diffèrent entre elles par la séquence du gène qui code la protéine, la structure de la chaîne polypeptidique et la spécificité des substrats.

Les substrats appartiennent à plusieurs classes chimiques mais certaines caractéristiques moléculaires (telles que la taille, le caractère lipophile et la configuration tridimensionnelle) et les sous-structures (telles que les groupements fonctionnels, l'encombrement stérique et la stéréochimie), peuvent avoir une influence non négligeable sur leur capacité à se lier sur chacune des isoformes de CYPs.

Des mises à jour paraissent régulièrement dans la littérature scientifique, pour compléter les données relatives aux substrats et aux inhibiteurs des principales familles et sous-familles de CYPs (*Guengerich et al, 2002 ; Ingelman-Sundberg, 2004 ; Pelkonen et al, 2008 ; Brown et al, 2008 ; Guengerich et Rendic, 2010*). Concernant les trois principales familles impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, on peut tirer les informations suivantes :

- **La famille CYP1**

Cette famille est composée de trois gènes (CYP1A1, 1A2 et 1B1). CYP1A2 est la seule isoforme hépatique, CYP1A1 est la forme extra-hépatique principale et CYP1B1 est présent dans pratiquement tous les autres tissus.

Les substrats des CYP1 sont souvent des molécules planes telles que les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), incluant les formes nitrogénées, et les polluants environnementaux tels que le pesticide chlorpyrifos et les polychlorobiphényles (PCBs) (*Boon et al, 2001*). Parmi les substrats de l'isoforme CYP1A1, il y a des arènes hydrophobes de taille moyenne tels que les benzo[a]pyrènes et les PCBs, tandis que ceux du CYP1A2 sont des hétérocycles plus polaires et des arylamines telles que la caféine et l'aminopyrine (*Boon et al, 2001*). La réaction caractérisant le 1A2 est la N-déméthylation bien qu'il puisse hydroxyler l'œstradiol. Le CYP1B1 est impliqué dans l'activation de substances procancérogènes bien que sa fonction primaire soit l'hydroxylation de l'œstradiol. Les principales biotransformations de cette sous-famille incluent les N-hydroxylations, les O-déalkylations et les époxydations (*Boon et al, 2001*).

Boon JP, Lewis WE, Goksøyr A, *Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus)*. *Aquat Toxicol*, 2001. **52**(3-4): p. 297-309.

Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN, *Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates*. *Drug Metab Rev*, 2008. **40**(1): p. 1-100.

Guengerich FP, Wheeler JB, Chun YJ, Kim D, Shimada T, Aryal P, Oda Y, Gillam EM, *Use of heterologously-expressed cytochrome P450 and glutathione transferase enzymes in toxicity assays*. *Toxicology*, 2002. 181-182: p. 261-4.

Guengerich FP, Rendic S, *Update information on drug metabolism systems--2009, part I*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(1): p. 1-3.

Ingelman-Sundberg M, *Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004. **369**(1): p. 89-104.

Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H, *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status*. *Arch Toxicol*, 2008. **82**(10): p. 667-715.

CYP1A2 est inhibée par la Furafylline, la Fluvoxamine, la Ciprofloxacine et le Rofecoxib. Les contraceptifs oraux et les traitements hormonaux substitutifs peuvent également inhiber les métabolismes médiés par le CYP1A2. La famille CYP1 est régulée au niveau transcriptionnel par la voie AhR-ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor – Arylhydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*).

AhR est structurellement distinct de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'un facteur de transcription présentant des domaines d'interaction hélice-boucle-hélice. On le retrouve chez les vertébrés au niveau de la prostate, de la glande mammaire, le foie, le système nerveux central, le système cardiovasculaire, et l'utérus (*Mimura et Fujii-Kuriyama, 2003*). Une fois lié à son ligand, il est transloqué dans le noyau et s'associe avec son partenaire ARNT. Le dimère ARNT-AhR avec son ligand peut alors se fixer en amont des gènes cibles au niveau des promoteurs pour moduler leur activité transcriptionnelle. AhR fixe une dioxine, le 2,3,7,8 TCDD (tétrachlorodibenzo-p-dioxin), ainsi que d'autres molécules d'hydrocarbures aromatiques polycycliques fortement hydrophobes, telles que les furanes. De plus, l'activité transcriptionnelle d'AhR peut être inhibée par le resvératrol et un oxystérol, le 7-cétocholestérol (*Savouret et al, 2001*).

- **La famille CYP2**

La famille CYP2 est la plus grande famille chez l'Homme. Les spécificités d'expression tissulaire, de substrats et de systèmes de régulation sont très différentes.

Les substrats sont généralement des molécules de faible ou moyen poids moléculaire avec un large éventail de polarité.

CYP2A6 est l'isoforme prédominante chez l'Homme qui catalyse l'hydroxylation de la coumarine et la transformation de la nicotine en un métabolite intermédiaire qui sera ensuite métabolisé en cotinine (*Pearce, 1992*).

CYP2A13 est étroitement lié à CYP2A6 avec 93,5 % d'homologie de séquence, des spécificités de substrats chevauchantes mais avec des efficacités catalytiques différentes (*Fukami et al, 2007*).

Fukami T, Nakajima M, Sakai H, Katoh M, Yokoi T, *CYP2A13 metabolizes the substrates of human CYP1A2, phenacetin, and theophylline*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(3): p. 335-9.

Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, [*Xenobiotics and transcriptional regulation*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2003. **48**(16): p. 2261-6.

Pearce R, Greenway D, Parkinson A, *Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation*. Arch Biochem Biophys, 1992. **298**(1): p. 211-25.

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF, *7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3054-9.

On retrouve CYP2A13 de façon prédominante dans les voies respiratoires, principalement dans la muqueuse nasale, et d'autres tissus extra-hépatiques mais ne contribue pas majoritairement dans la métabolisation de médicaments et a également un rôle dans l'activation d'agents cancérogènes (*He P et al, 2006 ; Von Weymarn et Murphy, 2003*).

CYP2B6 contribue aux N-déméthylations et à l'hydroxylation de nombreux substrats. Ces substrats ont tendance à être non-planaires ayant au moins un cycle aromatique, présentant un caractère lipophile important et des groupements formant une ou deux liaisons hydrogène (*Boon et al, 2001*). L'agent anti-cancéreux ThioTepa est un inhibiteur sélectif de ce CYP.

Les substrats de CYP2C8 et CYP2C9 possèdent des propriétés acides faibles et de multiples cycles aromatiques (*Boon et al, 2001*). De nombreux xénobiotiques incluant l'Ibuprofène et la Warfarine subissent des hydroxylations par le biais de ces enzymes. Le Paclitaxel est hydroxylé en 6 α par le CYP2C8 et est utilisé en tant que marqueur pour cette isoenzyme (*Vaclavikova et al, 2004*). Le Tolbutamide est hydroxylé par CYP2C9 au niveau du groupement methyl, l'acide arachidonique endogène, un composé biologiquement actif dans la signalisation cellulaire, est aussi transformé en acide époxyeicosatriénoïque par CYP2C8 (*Pearce et al, 1996*).

CYP2C19 a environ 90 % d'homologie de séquence avec le CYP2C9 (*Mitsuda M et al, 2006 ; Ridderström M et al, 2001*) et a un intérêt certain dû à son métabolisme polymorphe de nombreux médicaments (*Vaclavikova et al, 2004*) tels que le Diazépam, l'Amitriptyline, la Phénytoïne et la plupart des inhibiteurs de la pompe à protons.

CYP2D6 métabolise un grand nombre de médicaments fréquemment utilisés tels que des analgésiques (exemple du Dextrométorphane), des antiarythmiques, des antidépresseurs, des antihistaminiques, des inhibiteurs de l'acétylcholine estérase et des hallucinogènes. Il faut aussi signaler son importance dans le métabolisme de certains neurotransmetteurs.

Boon JP, Lewis WE, Goksøyr A, *Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus)*. *Aquat Toxicol*, 2001. **52**(3-4): p. 297-309.

He P, Court MH, Greenblatt DJ, von Moltke LL, *Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(7): p.1198-207.

Mitsuda M, Iwasaki M, Asahi S, *Cynomolgus monkey cytochrome P450 2C43: cDNA cloning, heterologous expression, purification and characterization*. *J Biochem*, 2006. **139**(5): p. 865-72.

Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A, *Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **331**(2): p. 145-69.

Ridderström M, Zamora I, Fjellström O, Andersson TB, *Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRID/CPCA*. *J Med Chem*, 2001. **44**(24): p. 4072-81.

Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L, Anzenbacher P, Simek P, Guengerich FP, Gut I, *Different in vitro metabolism of paclitaxel and docétaxel in humans, rats, pigs, and minipigs*. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(6): p. 666-74.

Von Weymarn LB, Murphy SE. *CYP2A13-catalysed coumarin metabolism: comparison with CYP2A5 and CYP2A6*. *Xenobiotica*, 2003. **33**(1): p. 73-81.

Les substrats de CYP2E1 sont généralement de petite taille tels que les alcanes halogénés, les alcènes et les aromatiques (comme le benzène et l'aniline) ainsi que des molécules hydrophiles tels que l'éthanol et la caféine. CYP2E1 est impliqué dans l'activation hépatotoxique du paracétamol par oxydation et transformation en N-acétylparabenzoinimine (Boon et al, 2001).

Les récepteurs nucléaires des prégnanes PXR (*Pregnane X Receptor*), des acides gras polyinsaturés PPAR (*Peroxisome Proliferative Activated Receptor*) et de l'androstérone CAR (*Constitutive Androstane Receptor*) contrôlent l'expression de ces enzymes. PXR possède une cavité de liaison au ligand importante qui lui permet d'interagir avec de nombreux composés de tailles et de structures variées (stéroïdes, antibiotiques, antifongiques, anti-cancéreux...). Toutefois, son domaine de liaison aux différents ligands est très peu conservé entre les espèces ce qui rend l'extrapolation des études menées sur l'animal à l'Homme très limitée. PXR est présent dans peu de tissus et principalement dans le foie et l'intestin grêle. Selon les auteurs, PXR serait exclusivement nucléaire ou ne passerait dans le noyau qu'après fixation du ligand. A ce stade, il s'hétérodimérise avec un autre récepteur nucléaire RXR pour se fixer à l'ADN. Les gènes cibles dans la famille CYP2 sont CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 et CYP2C19.

CAR est très proche de PXR mais présente un éventail de ligands plus étroit. Comme PXR, il est surtout présent dans le foie (et le rein) et s'hétérodimérise avec RXR. Ce récepteur est un facteur de transcription régulé négativement par des ligands endogènes de type androstanol et androsténol, deux métabolites de la testostérone. CYP2B6, CYP2C9 et CYP2C19 sont induits par CAR ce qui démontre l'existence d'un « crosstalk » entre les xénosenseurs (Pascussi et al, 2008) avec partage des ligands, des cofacteurs et/ou des éléments de liaison à l'ADN.

Une activation de la transcription de gènes CYP2A, CYP2C et CYP2E par les récepteurs PPAR a été reportée plus particulièrement chez les rongeurs.

Boon JP, Lewis WE, Goksøyr A, *Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus)*. *Aquat Toxicol*, 2001. **52**(3-4): p. 297-309.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P, *The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. **48**: p. 1-32.

- **La famille CYP3**

La famille CYP3 représente chez l'Homme environ 30 % du contenu en cytochromes P450 hépatiques. Elle comprend seulement une sous-famille incluant trois protéines fonctionnelles : CYP3A4, CYP3A5 et CYP3A7 mais elle est considérée comme étant la famille la plus importante dans la métabolisation de substances médicamenteuses chez l'Homme, tout particulièrement le CYP3A4, qui transforme la majorité des composés exogènes et quelques substrats endogènes tels que les stéroïdes (*Boon et al, 2001 ; Pearce et al, 1996*). Leurs substrats sont variables et difficiles à classer mais sont le plus souvent des molécules de haut poids moléculaire, pour la plupart faiblement polaires et porteurs de cycles aromatiques.

Alors que CYP3A4 est le CYP le plus abondant dans le foie humain, CYP3A5 n'est exprimé que chez 25 % des caucasiens (*Vaclavikova et al, 2004*) où il représente 17 à 50 % des CYP3A (*Daly, 2006*).

CYP3A7 est une forme fœtale de CYP3A que l'on retrouve au niveau du foie et d'autres tissus fœtaux mais on le retrouve également dans le foie et d'autres tissus chez certains adultes (*Daly, 2006*). La spécificité de substrats, la régiospécificité et les cinétiques de CYP3A5 et CYP3A7 sont semblables à celles de CYP3A4, même si des différences existent entre ces isoformes.

L'activation de ces enzymes est sous la dépendance des récepteurs PXR.

II. Importance clinique et toxicologique des dérégulations du métabolisme par les CYPs

Quelles que soient les pathologies, on peut estimer que les traitements médicamenteux sont encore trop souvent inefficaces. 30 à 60 % des patients répondraient positivement aux antidépresseurs, β -bloquants, statines et anti-psychotiques. De plus, les effets toxiques des médicaments représenteraient aux Etats-Unis, 7 % des admissions en service hospitalier (30 % chez les sujets de plus de 70 ans) et ces chiffres seraient en augmentation croissante.

Boon JP, Lewis WE, Goksøyr A, *Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus)*. *Aquat Toxicol*, 2001. **52**(3-4): p. 297-309.

Daly AK, *Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms*. *Clin Pharmacokinet*, 2006. **45**(1): p. 13-31.

Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A, *Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **331**(2): p. 145-69.

Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L, Anzenbacher P, Simek P, Guengerich FP, Gut I, *Different in vitro metabolism of paclitaxel and docétaxel in humans, rats, pigs, and minipigs*. *Drug Metab Dispos*, 2004. **32**(6): p. 666-74.

La cause de ces différences interindividuelles dans la réponse à un traitement est une différence dans les paramètres pharmacocinétiques du médicament selon les patients et donc surtout des différences dans l'activité des CYPs et plus particulièrement des CYPs 1, 2 et 3 qui contribuent au métabolisme de 90 % des médicaments. Ces modifications dans le fonctionnement des cytochromes P450 trouvent tout d'abord leur origine dans le polymorphisme des gènes qui codent pour ces enzymes.

Mais des phénomènes d'inhibition/induction (interactions médicamenteuses par exemple) ou des processus épigénétiques peuvent également participer à ces réactions inattendues à un traitement.

1. Inductions – Inhibitions

Depuis de nombreuses années, on sait que la biodisponibilité des médicaments peut être affectée par des interactions médicamenteuses entraînant une toxicité ou l'inefficacité thérapeutique (Guéguen *et al*, 2006) :

Inhibition de l'activité enzymatique

L'inhibition de l'activité enzymatique peut s'effectuer par une interaction entre deux molécules agissant sur le même site catalytique, provoquant ainsi une inhibition compétitive, avec la possibilité ou non de détruire définitivement l'activité métabolique. Dans la mesure où la majorité des médicaments est prise en charge par CYP3A4, la cinétique métabolique de cette enzyme est l'une des plus étudiées et lors d'essais cliniques, si la molécule d'intérêt est la cible de CYP3A4, des essais d'interférence médicamenteuse sont alors réalisés. Les molécules les plus affectées sont généralement celles présentant des marges thérapeutiques étroites telles que la Cyclosporine A. Largement décrites pour des molécules thérapeutiques, dont les macrolides, ces inhibitions peuvent également survenir avec des produits de consommation courante, comme les jus de fruits. Le cas du jus de pamplemousse a été mis en exergue au début des années 1990 car sa consommation régulière conduisait à une inhibition du métabolisme de certains médicaments *via* l'inhibition de CYP3A. Dans certains cas cette propriété d'inhibition des CYPs peut être bénéfique : le Ritonavir, un inhibiteur de CYP3A, permet de réduire les posologies des autres antirétroviraux utilisés dans le traitement du SIDA.

- Induction de l'activité enzymatique

L'augmentation de l'activité enzymatique peut avoir des effets nocifs ou bénéfiques. En règle générale l'induction d'une voie métabolique va limiter l'efficacité d'un médicament. Il est donc conseillé de vérifier l'éventuel potentiel inducteur de la prescription, afin de ne pas perturber un traitement déjà équilibré. L'induction du métabolisme du Cyclophosphamide augmente la production du métabolite pharmacologiquement actif, cette particularité pouvant être exploitée dans certains protocoles thérapeutiques.

CYP2C9/19, CYP2B6 et CYP3A sont régulés par les facteurs de transcription du fait de la présence de séquences consensus dans les promoteurs des gènes. Ainsi, l'utilisation de molécules inductrices doit-elle être réalisée avec prudence afin de ne pas perturber les traitements en cours.

Les principaux agents inducteurs sont la Rifampicine, certains anticonvulsivants (Carbamazépine, Phénytoïne, Phénobarbital), les glucocorticoïdes, le Modafinil, les glitazones ainsi que certains anti-rétroviraux (Efavirenz, Nevirapine). Lorsque l'activation du métabolisme conduit à une augmentation de la concentration des métabolites toxiques, dans la plupart des cas ceux-ci sont éliminés. La limitation de cette détoxification réside dans la saturation des systèmes d'élimination entraînant ainsi une augmentation des accidents thérapeutiques. L'exemple le plus caricatural est celui de l'alcool qui, en induisant CYP2E1, augmente la toxicité hépatique du paracétamol chez l'alcoolique.

Les industries pharmaceutiques se soucient maintenant, de plus en plus précocément, de ce que l'on appelle l'inhibition irréversible ou « inhibition-suicide » (*Nettleton et Einolf, 2011*). En effet, l'existence d'une éventuelle liaison irréversible entre un nouveau composé à visée thérapeutique et le site actif d'un cytochrome P450 peut mener à des effets catastrophiques sur la santé de futurs patients. Cette liaison se réalise le plus souvent (dans 80 % des cas) avec un métabolite de la substance mère (*VandenBrink et Isoherranen, 2010*) et deux mécanismes sont décrits : l'alkylation de la protéine ou de l'hème et la formation d'un complexe intermédiaire (*Tableau 1*). Cependant, de nombreux mécanismes restent encore inconnus. Quelques revues permettent, à l'heure actuelle, de prédire les risques d'inhibition irréversible de nouvelles entités chimiques (*Fontana et al, 2005*).

Fontana E, Dansette PM, Poli SM, *Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity*. *Curr Drug Metab*, 2005. **6**(5): p. 413-54.

Nettleton DO, Einolf HJ, *Assessment of cytochrome p450 enzyme inhibition and inactivation in drug discovery and development*. *Curr Top Med Chem*, 2011. **11**(4): p. 382-403.

VandenBrink BM, Isoherranen N, *The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: focus on irreversible cytochrome P450 inhibition*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010. **13**(1): p. 66-77.

Médicament	Métabolites inactivant	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4	Métabolites circulants
Cimétidine	Inconnu						X ^{*f}		Sulfoxyde, hydroxyméthyl cimétidine
Delavirdine	Inconnu							X ^{*f}	N-désisopropyl, N-désalkyl delavirdine
Lopinavir	Inconnu							X ^{*p}	
Phénelzine	Inconnu ¹	X		X	X			X	
Saquinavir	Inconnu							X ^{*p}	Mono- et di-hydroxylé saquinavir
Thiotepa	Inconnu		X						Tepa
Zileuton	Inconnu	X ^{*m}							N-déhydroxylé
Zolpidem	Inconnu							X ^{*f}	

Tableau 1 : Inhibiteurs qui inactivent les CYPs par un mécanisme inconnu.

*DDI (*Drug-Drug Interactions*) indiqué *in vivo* (f = faible, m = modéré, p = puissant), ¹la destruction de l'hème du P450 impliqué est basée sur le mécanisme d'action.

(D'après vandenBrink et Isoherranen, 2010)

Cette étape est maintenant nécessaire pour dépasser le simple stade de l'évaluation pharmacologique des métabolites, à la recherche d'une activité principale, d'une activité résiduelle ou d'une toxicité secondaire.

2. Polymorphisme génétique des cytochromes P450

(Ingelman-sundberg, 2007 ; Zhou,2009 ; Ingelman-Sundberg et Sim, 2010 ; Johansson, 2011)

Le polymorphisme génétique, défini comme une variation stable au niveau d'un locus donné d'une séquence génétique et présente dans au moins 1 % de la population, se manifeste dans l'expression de tous les intervenants du métabolisme des xénobiotiques, même s'il existe moins d'exemples de polymorphismes des transporteurs et des xénosenseurs dans la littérature. Nous n'évoquerons ci-dessous que les polymorphismes touchant les CYPs impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques CYP 1, 2 et 3. Les bases moléculaires à l'origine de variations d'expression et/ou d'activité de ces enzymes sont connues.

D'une part, elles se composent de microlésions (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), c'est-à-dire de mutations faux sens ou de mutations ponctuelles telles que celles entraînant un décalage du cadre de lecture (ou *frameshift*) ou un codon stop, de mutations ponctuelles pouvant affecter la séquence non codante des gènes et être à l'origine d'un défaut d'épissage, ou lorsqu'elles sont situées dans la région promotrice, d'une expression de la protéine altérée. D'autre part, elles regroupent des macrolésions (comme des insertions, des délétions complètes du gène ou à l'inverse une amplification génique), regroupées sous le terme de variation du nombre de copies de gènes (CNV, *Copy Number Variation*).

Quatre phénotypes en découlent (Fig. 22) :

- **Les métaboliseurs ultra-rapides** : deux gènes actifs codant pour un CYP donné ou l'expression augmentée d'un seul gène. Les patients présentant ce phénotype ne répondent pas aux doses normales de médicaments et peuvent transformer excessivement les « prodrugs » ou former trop de métabolites toxiques.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects.* Pharmacol Ther, 2007. **116**(3): p. 496-526.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, *Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 90-4.

Johansson I, Ingelman-Sundberg M, *Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450.* Toxicol Sci, 2011. **120**(1): p. 1-13.

Zhou SF, Liu JP, Chowbay B, *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact.* Drug Metab Rev, 2009. **41**(2): p. 89-295.

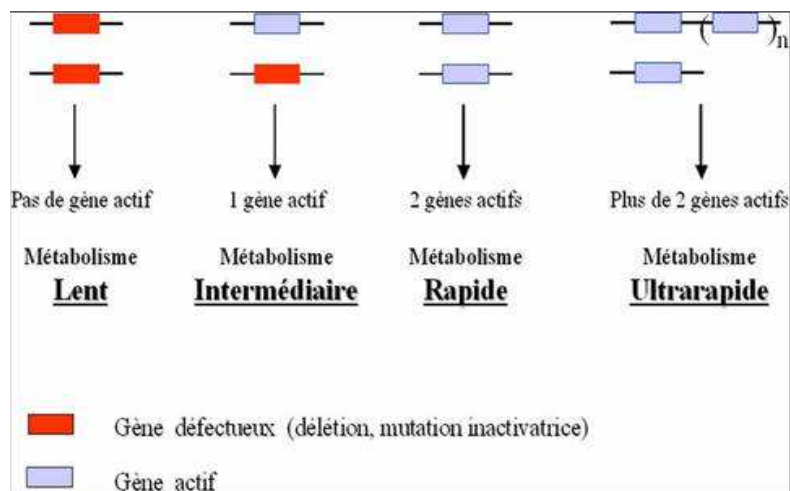


Fig. 22 : Bases moléculaires des polymorphismes génétiques
 (D'après De Chaisemartin et Lorient, 2005)

- *Les métaboliseurs extensifs ou rapides* : deux allèles fonctionnels.
- *Les métaboliseurs intermédiaires* : un gène délétère ou deux gènes partiellement délétères.
- *Les métaboliseurs lents* : deux gènes délétères. Ce phénotype expose aux risques de réactions toxiques à certains médicaments ou à l'absence d'activité de médicaments nécessitant un métabolisme.

Globalement, tous les gènes codant pour les CYPs sont polymorphes (360 allèles fonctionnels différents) mais à des degrés variables. Les enzymes métabolisant les médicaments sont en règle générale plus polymorphes que les enzymes responsables de la métabolisation des composés endogènes. Les enzymes impliquées dans l'activation des pro-cancérogènes (CYPs 1A1, 1A2, 2E1 et 3A4) sont moins polymorphes ou leur polymorphisme n'influe pas sur leur fonction (Tableau 2). Les CYPs 2B6, 2C9, 2C19 et 2D6 sont particulièrement polymorphes avec, respectivement, 29, 34, 26 et 78 allèles fonctionnels différents.

Beaucoup d'exemples de conséquences cliniques de ces polymorphismes sont retrouvés dans la littérature (Ingelman-Sundberg et al, 2007 ; Johansson et Ingelman-Sundberg, 2011) et certains sont répertoriés dans le Tableau 3. Ils peuvent être classés par CYP ou par pathologie. Si on prend l'exemple du cancer pour lequel les agents thérapeutiques sont en général non spécifiques et d'index thérapeutique étroit, on peut comprendre les toxicités fréquentes sévères et même fatales qui peuvent apparaître. Des conséquences dramatiques sont également répertoriées avec des médicaments du système nerveux central (suicides causés par une absence d'efficacité des antidépresseurs), du système cardiovasculaire (agents anticoagulants) ou du SIDA.

3. Pharmacogénétique

Elucider les polymorphismes présents sur les CYPs et leurs conséquences fonctionnelles n'est pas suffisant pour expliquer les différences inter-individuelles observées dans la réponse à un médicament. Aussi, depuis le début des années 2000, plusieurs équipes se sont penchées sur la régulation épigénétique qui pourrait se produire sous l'effet de l'« environnement » du gène au sens large, et en particulier, sous l'effet des polluants environnementaux.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 2007. **116**(3): p. 496-526.
 Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450. *Toxicol Sci*, 2011. **120**(1): p. 1-13.

Enzyme	Substrats	Fréquence de polymorphisme	Effets fonctionnels	Variants polymorphes les plus importants
CYP1A1	Cancérogènes	Relativement haute	Non prouvés	Aucun variant allélique fonctionnel important
CYP1A2	Médicaments, cancérogènes	Haute	Rares	CYP1A2*1F, CYP1A2*1K
CYP1B1	Cancérogènes, œstrogènes	Allèles « null » rares, mutations faux-sens fréquentes	Au moins 7 haplotypes avec une activité similaire	CYP1B1*7
CYP2A6	Nicotine, médicaments, cancérogènes	Elevée chez les Orientaux, moins fréquente chez les Caucasiens	Importants dans le métabolisme de la nicotine	CYP2A6*1B, CYP2A6*4, CYP2A6*9, CYP2A6*12
CYP2B6	Médicaments	Haute	Métabolisme des médicaments réduits	CYP2B6*5, CYP2B6*6, CYP2B6*16
CYP2C8	Quelques médicaments	Haute	Métabolisme des médicaments réduits	CYP2C8*3
CYP2C9	Médicaments	Relativement rare chez les Caucasiens	Très significatifs	CYP2C9*2, CYP2C9*3
CYP2C19	Médicaments	Haute	Très significatifs	CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17
CYP2D6	Médicaments	Très haute	Très significatifs	CYP2D6*2xn, CYP2D6*4, CYP2D6*5, CYP2D6*10, CYP2D6*17
CYP2E1	Cancérogènes, solvants, quelques médicaments	Faible	Aucun cas significatif n'a été démontré	Aucun variant allélique fonctionnel important
CYP3A4	Médicaments, cancérogènes	Faible	Aucun ou peu	CYP3A4*1B
CYP3A5	Médicaments, cancérogènes	Haute	Significatifs	CYP3A5*3, CYP3A5*6, CYP3A5*7
CYP3A7	Médicaments, cancérogènes	Faible	Quelques-uns	CYP3A7*2

Tableau 2: Importance des CYPs polymorphes sur le métabolisme de médicaments et d'agents cancérogènes

(D'après Johansson et Ingelman-Sundberg, 2011)

Phénotype	Base génétique	Conséquences cliniques	Exemples d'allèles causant le phénotype	Exemples de conséquences cliniques
Métaboliseur ultra-rapide	Plus de 2 copies de gènes actifs sur le même allèle, ou expression augmentée d'un seul gène	Manque de réponse du médicament Augmentation des ADRs due à une augmentation de métabolite ou de production de médicament actif	CYP2C19*17 CYP2D6*1/*2 x N (duplication de gènes / multi-duplication)	CYP2C19 : augmentation du risque de saignement avec le clopidogrel CYP2D6 : pas de réponse avec les antiémétiques, les antidépresseurs et augmentation du risque de suicide. ADRs après un traitement à la caféine et au tramadol
Métaboliseur extensif	2 allèles fonctionnels	Réponse normale	CYP2C9*1, CYP2C19*1, CYP2D6*1	Métabolisme normal
Métaboliseur intermédiaire	1 allèle défectueux ou 2 allèles partiellement défectueux	Augmentation de concentration du médicament Diminution de la formation de métabolite	CYP2C9*2, CYP2D6*10, CYP2D6*41	Réponse réduite avec un traitement avec des analgésiques et le tamoxifen
Métaboliseur pauvre	2 allèles défectueux	De plus hauts taux de médicaments Augmentation du risque pour les ADRs	CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*4, CYP2D6*5	Augmentation d'ADRs Réponse réduite avec les analgésiques et le tamoxifen

Tableau 3 : Phénotypes des CYPs intervenant dans le métabolisme de médicaments et allèles des CYPs polymorphes ayant une importance dans la réponse modifiée aux médicaments

(D'après Ingelman-Sundberg et Sjö, 2010)

L'épigénétique s'intéresse à l'étude des modifications transmissibles dans l'expression d'un gène sans changement dans la séquence de l'ADN et sans altérations des séquences nucléotidiques. Ces changements épigénétiques peuvent être acquis pendant toute la vie d'un individu. Les études concernant ces changements épigénétiques associés aux enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont relativement récentes (*Ingelman-Sundberg et Gomez, 2010*).

Dans un premier temps, ce sont surtout des changements dans le taux de méthylation (moyen de régulation de l'expression des gènes dont dispose la cellule) des gènes codant pour les CYPs qui ont été mis en évidence (*Tableau 4*) mais à l'heure actuelle, on sait que d'autres mécanismes épigénétiques (*Fig. 23*) participent à la régulation des gènes codant pour les enzymes du métabolisme, les transporteurs, les facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires (*Kacevska et al, 2011 ; Baer-Dubowska et al, 2011*). On peut résumer ces mécanismes en trois types (*Choudhuri, 2010*) :

- **La méthylation de l'ADN**
- **Les modifications de la chromatine au niveau des histones**
- **L'expression de microARNs non codants**

Dans le génome des mammifères, la méthylation est un des événements épigénétiques les plus retrouvés. Elle résulte par l'addition covalente d'un groupement méthyl provenant de la S-adénosylméthionine sur le carbone en position 5 du cycle pyrimidique de la cytosine (*Das et Singal, 2004*) donnant ainsi, la 5-méthylcytosine, catalysée par les DNMTs (*DNA MéthylTransférases*) telles que DNMT1, DNMT3a et DNMT3b (*Yokochi et Robertson, 2002*).

La fonction des sites de méthylation, que l'on retrouve au niveau des îlots CpG des régions promotrices de l'ADN de mammifères, est liée à l'empreinte génomique et à la régulation des facteurs de transcription (*Li et al, 1993 ; Ferguson-Smith et al, 1993; Nan et al,*

Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Cichocki M, *Pharmacoeugenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(2): p. 293-304.

Choudhuri S, *Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology*. J Biochem Mol Toxicol, 2010. **24**(3): p. 195-216.

Das PM and Singal R, *DNA methylation and cancer*. J Clin Oncol, 2004. **22**(22): p. 4632-42.

Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanaach BM, Surani MA, *Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 751-5.

Ingelman-Sundberg M, Gomez A, *The past, present and future of pharmacoeugenomics*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(5): p. 625-7.

Kacevska M, Ivanov M, Ingelman-Sundberg M, *Perspectives on epigenetics and its relevance to adverse drug reactions*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(6): p. 902-7.

Li E, Beard C, Jaenisch R, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. Nature, 1993. **366**(6453): p. 362-5.

Nan X, Campoy FJ, Bird A, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell, 1997. **88**(4): p. 471-81.

Yokochi T, Robertson KD, *Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a*. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11735-45.

Gène	Méthylation de l'ADN	Références
CYP1A1	Fumer affecte la méthylation du CYP1A1.	Anttila S <i>et al</i> , 2003
CYP1A2	Les variations inter-individuelles se situent au niveau des sites CpG spécifiques et l'épigénétique présage la réponse aux stimuli environnementaux.	Nakajima, M <i>et al</i> , 2003 Hammons GJ <i>et al</i> , 2001
CYP1B1	Une méthylation aberrante de l'ADN dans le cancer affecte l'expression de CYP1B1.	Nakajima, M <i>et al</i> , 2003 Tokizane T <i>et al</i> , 2005
CYP2A6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1	La présence d'un haut taux de dinucléotide CG est indicatif du rôle de la méthylation de l'ADN pour ce gène.	Ingelman-Sundberg M <i>et al</i> , 2007
CYP2E1	L'expression pendant les étapes du développement est liée au taux de méthylation de l'ADN du gène.	Jones SM <i>et al</i> , 1992
CYP2W1	L'expression de CYP2W1, spécifique de la tumeur, due à une méthylation aberrante de l'ADN constitue une stratégie thérapeutique prometteuse dans le cancer	Gomez A <i>et al</i> , 2007 Karlgren M <i>et al</i> , 2006
CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7	Le traitement des cellules HepG2 avec la 5-aza-2'-désoxycytidine et/ou la trichostatine A et l'analyse de modifications dans l'expression du gène au niveau génomique montre un effet sur l'expression de ce gène.	Dannenberg LO <i>et al</i> , 2006

Tableau 4 : Quelques membres de CYPs, impliqués dans la métabolisation de médicaments, régulés par la méthylation de l'ADN
(D'après Gomez et Ingelman-Sundberg, 2009).

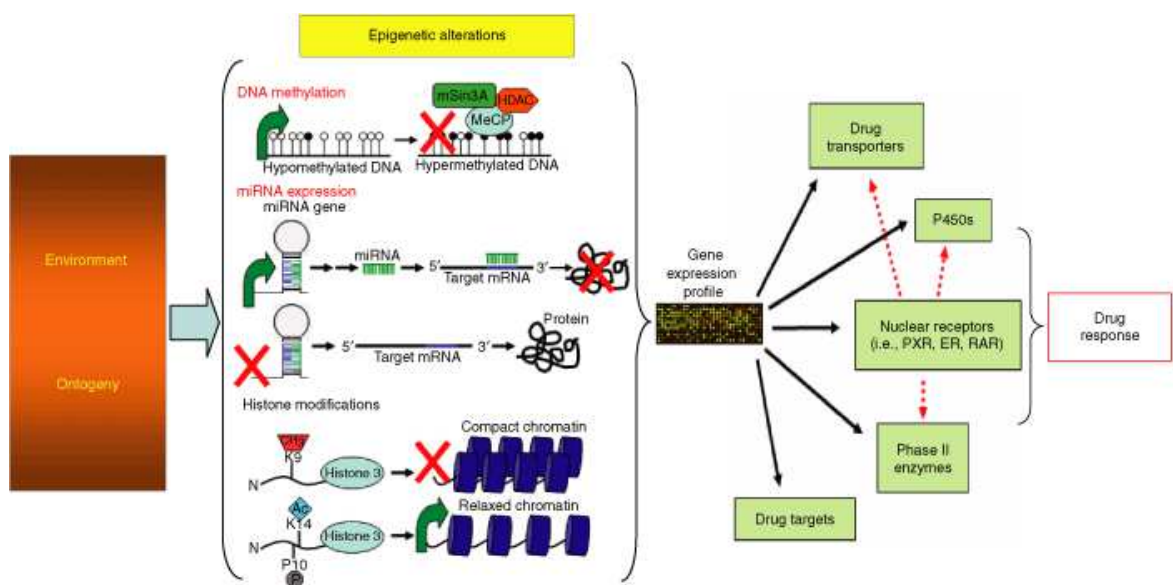


Fig. 23 : Les facteurs environnementaux génèrent un éventail de phénotypes dans la population à travers la participation de mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation de l'expression des microARNs. (D'après Gomez et Ingelman-Sundberg, 2009)

1998 ; Goodman et Watson, 2002 ; Attwood et al, 2002). La majorité des dinucléotides CpG ont été éliminés du génome au cours de l'évolution.

Ils sont conservés au niveau des promoteurs d'environ 50% des gènes humains et ceux retrouvés dans les promoteurs, sont le plus souvent non méthylés (Herman et Baylin, 2003). Cependant, les séquences d'ADN dont les sites sont méthylés se situent préférentiellement dans les régions non promotrices. Des études ont montré que la méthylation aberrante de l'ADN telle que l'hyperméthylation et l'hypométhylation joue un rôle important dans la cancérogenèse (Zhao et al, 1997 ; Lee et al, 1998).

La régulation de l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN s'effectue par deux mécanismes. En effet, la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes va empêcher la liaison des facteurs de transcription aux sites de liaison de l'ADN (Tate et Bird, 1993 ; Rountree et al, 2001) ou peut engendrer par des mécanismes indirects complexes des changements de conformation de la chromatine (Keshet et al, 1986 ; Nan et al, 1998 ; Stirzaker et al, 2004 ; Caiafa et Zampieri, 2005 ; Padjen et al, 2005).

L'interaction de l'ADN méthylé avec des protéines capables de détecter cet ADN et d'autres protéines de remodelage de la chromatine mène à l'altération de la chromatine et empêche l'expression des gènes (Rountree et al, 2001).

Des études ont montré que l'expression des CYPs était modifiée par la méthylation de l'ADN. En effet, des altérations aberrantes dues à la méthylation au niveau des sites CpG, sites cibles de la DNMT ont été retrouvées dans le promoteur et les régions stimulatrices du CYP1B1 dans le cancer de la prostate (Tokizane et al, 2005).

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC, *DNA methylation and the regulation of gene transcription*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(2): p. 241-57.

Caiafa P and Zampieri M, *DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 257-65.

Goodman JI and Watson RE, *Altered DNA methylation: a secondary mechanism involved in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 501-25.

Herman JG and Baylin SB, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.

Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H, *DNA methylation affects the formation of active chromatin*. Cell, 1986. **44**(4): p. 535-43.

Lee YW, Broday L, Costa M, *Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels*. Mutat Res, 1998. **415**(3): p. 213-8.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A, *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.

Padjen K, Ratnam S, Storb U, *DNA methylation precedes chromatin modifications under the influence of the strain-specific modifier Ssm1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4782-91.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB, *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. Oncogene, 2001. **20**(24):3156-65.

Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ, *Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3871-7.

Tate PH and Bird AP, *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 226-31.

Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R, *Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5793-801.

Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP, *Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10907-12.

L'activation du CYP1B1 passant par la voie AhR/ARNT nécessite la reconnaissance de l'élément de réponse à la dioxine (DRE pour *Dioxin Response Element* ou XRE pour *Xenobiotic Response Element*) qui comporte le site CpG cible de la DNMT.

L'expression de ce CYP est plus élevée dans le cancer de la prostate que dans l'hyperplasie bénigne prostatique. Cela s'explique par la déméthylation des sites CpG au niveau de l'élément de réponse DRE dans le cancer de la prostate. Le facteur de transcription Sp1 liant le site GGGCGG est déméthylé dans les tissus cancéreux prostatiques mais reste méthylé dans l'hyperplasie. Ainsi, l'hypométhylation de ces sites dans le promoteur et les régions stimulatrices du CYP1B1 permet la liaison aux facteurs de transcription et donc l'expression du CYP1B1 dans le cancer de la prostate (Tokizane et al, 2005).

Par contre, l'expression de CYP1A1 est atténuée en réponse à une hyperméthylation. La région régulatrice du CYP1A1, possédant un îlot CpG, est méthylée dans la lignée cancéreuse prostatique LNCaP alors qu'elle ne l'est pas dans la lignée prostatique normale RWPE-1. Cette méthylation a pour conséquences des changements de structure dûs à des modifications des histones (Okino et al, 2006). La méthylation, conduisant à la cancérisation, influe sur l'expression du CYP2W1 (Gomez et al, 2007). Il a été démontré que les différents niveaux d'expression de ce CYP dans les lignées cellulaires humaines sont dus aux variations de méthylation dans les îlots CpG du promoteur proximal de ce gène (Karlgrén et al, 2006). L'équipe de Ingelman-Sundberg a analysé les sites de méthylation potentiels en s'appuyant sur la localisation des sites CpG de plusieurs gènes de la famille des cytochromes P450 (Fig. 24) tels que CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1 et CYP2W1.

Les histones sont sujet à plusieurs types de modifications post-traductionnelles covalentes et réversibles : acétylation, méthylation, phosphorylation ADP-ribosylation, ubiquitination et sumoylation (Choudhuri et al, 2010). Il existe un « cross-talk » entre la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Les exemples concernant une régulation de l'expression des CYPs par modifications des histones sont encore peu nombreux.

Choudhuri S, Cui Y, Klaassen CD, *Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **245**(3): p. 378-93.

Gomez A, Karlgrén M, Edler D, Bernal ML, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M, *Expression of CYP2W1 in colon tumors: regulation by gene methylation*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(10): p. 1315-25.

Karlgrén M, Gomez A, Stark K, Svärd J, Rodríguez-Antona C, Oliv E, Bernal ML, Ramón y Cajal S, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, *Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 451-8.

Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Dahiya R, *Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7420-8.

Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R, *Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5793-801.

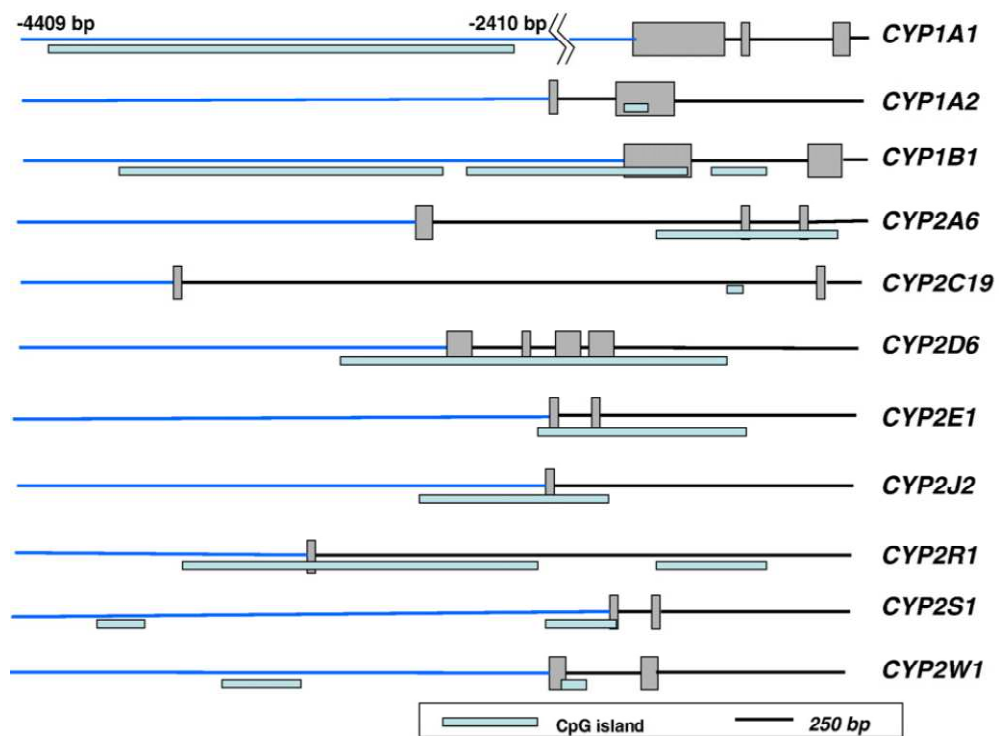


Fig. 24 : Prédiction des îlots CpG dans le promoteur et les régions 5' des gènes CYPs. Sont représentés en **gris** les exons et en **bleu** les sites CpG comprenant au moins 200 paires de bases de longueur et au moins 50% de bases G+C (D'après Ingelman-Sundberg et al, 2007).

On peut citer une étude montrant le rôle d'une méthylation d'histones dans le contrôle de l'expression du CYP3A mais seulement au cours d'une maturation post-natale (*Li et al, 2009*).

La mise en évidence de l'influence de l'impact de l'environnement sur les altérations épigénétiques impliquées dans la pharmacocinétique et à la réponse à un médicament passera, dans le futur proche, par la connaissance de la régulation épigénétique par les microARNs (miRNAs) (*Choudhuri, 2010 ; Ingelman-Sundberg et al, 2007 ; Gomez et Ingelman-Sundberg, 2009 ; Baer-Dubowska et al, 2011*). Les miARNs font partie, avec les siRNAs (*small interfering RNAs*) et les piRNAs (*piwi interfering RNAs*), des petits ARNs non codants récemment découverts et dont l'intérêt fait maintenant l'objet de nombreuses études.

Ces miARNs sont des molécules d'ARN simple brin de 21 à 24 nucléotides qui peuvent provoquer une régulation post-transcriptionnelle par liaison aux régions 3'-UTR des ARNm ciblés et induire leur dégradation, leur cassure ou interférer avec leur traduction (*Fig. 25*). Quelques exemples de régulation des CYPs existent déjà dans la littérature. miR-27b régule l'expression du CYP1B1, dans les cellules MCF-7, en se fixant sur une séquence cible du CYP1B1-ARNm (*Tsuchiya et al, 2006*). Dans des hépatocytes, les miARNs responsables de la régulation de CYP2E1 ont pu être identifiés (*Hudder et Novak, 2008*) et surtout l'équipe de Takagi (*Takagi et al, 2008*) a étudié la régulation de l'expression du CYP3A4, une des plus importantes enzymes du métabolisme des xénobiotiques responsables de la biotransformation de 50 % des médicaments. Cette régulation implique miR-148 qui, en se liant à la région 3'-UTR du PXR, conditionne l'induction de l'expression du CYP3A4.

Il est donc maintenant tentant de suivre l'influence des xénobiotiques sur la biosynthèse et l'expression de ces miARNs puisque ce mécanisme pourrait constituer le lien entre les polluants de l'environnement et la réponse d'un patient à un médicament donné. Ce rôle potentiel des miARNs dans la toxicogénomique a déjà été reporté (*Hudder et Novak, 2008*). Des équipes ont montré l'influence de la dioxine, des irradiations γ , de l'arsenite de sodium, du paracétamol et du tétrachlorure de carbone sur l'expression des miARNs.

Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Cichocki M, *Pharmacoeigenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(2): p. 293-304.

Choudhuri S, *Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology*. J Biochem Mol Toxicol, 2010. **24**(3): p. 195-216.

Gomez A, Ingelman-Sundberg M, *Epigenetic and microRNA-dependent control of cytochrome P450 expression: a gap between DNA and protein*. Pharmacogenomics, 2009. **10**(7): p. 1067-76.

Hudder A, Novak RF. *miRNAs: effectors of environmental influences on gene expression and disease*. Toxicol Sci, 2008. **103**(2): p. 228-40.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects*. Pharmacol Ther, 2007. **116**(3): p. 496-526.

Li Y, Cui Y, Hart SN, Klaassen CD, Zhong XB, *Dynamic patterns of histone methylation are associated with ontogenic expression of the Cyp3a genes during mouse liver maturation*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(5): p. 1171-9.

Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T, *Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9674-80.

Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T, *MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9090-8.

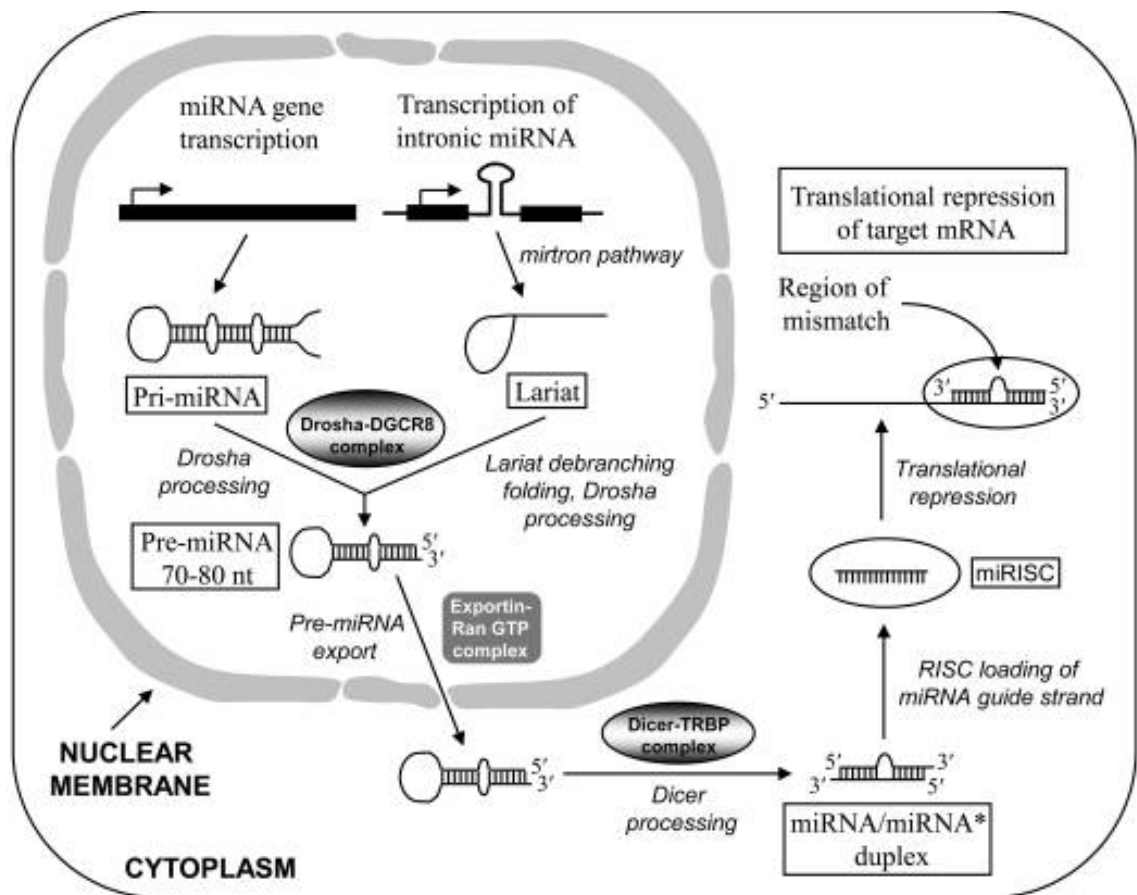


Fig. 25 : Biogenèse et fonction des microARNs
(D'après Choudhuri et al, 2010)

III. La prostate : siège d'une métabolisation extra-hépatique

Le foie est quantitativement l'organe principal dans le métabolisme des xénobiotiques et en particulier dans leur élimination. Cependant, tous les autres organes expriment des EMX et il existe une très grande variabilité qualitative et/ou quantitative de cette distribution tissulaire (Pavek et Dvorak, 2008). Ainsi, l'expression, basale ou induite, des enzymes de biotransformation et de transport des xénobiotiques peut contribuer à la formation de métabolites dont la production *in situ* peut être à l'origine d'une toxicité spécifique dans certains organes (Ding et Kaminsky, 2003). Mais cette expression peut également affecter de manière significative la réactivité locale des xénobiotiques ou des composés endogènes au sein des tissus périphériques et ainsi modifier leurs effets pharmaco/toxicologiques ou encore influencer sur leur absorption dans la circulation générale (Pavek et Dvorak, 2008).

Un certain nombre d'études ont montré que, dans le cas particulier de la prostate, la présence d'enzymes de métabolisation de phases I et II et de transporteurs pouvait influencer notamment l'efficacité et/ou la toxicité des médicaments ciblant le cancer et l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) (Obligacion et al, 2006).

Des travaux ont mis en évidence l'existence de certaines de ces EMX dans le tissu prostatique (Nishimura et Naito, 2006 ; Bièche et al, 2007 ; Zencir et al, 2008 ; Rendic et Guengerich, 2010) mais d'autres études ont permis d'aboutir à des données plus précises quant à la répartition de ces enzymes en fonction de la nature du tissu (sain, hyperplasique ou cancéreux) (Finnström et al, 2001 ; Leskelä et al, 2007 ; Fujimura et al, 2009) et de la localisation dans l'organe.

Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I, *Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues*. Pharmacogenet Genomics, 2007. **17**(9):731-42.

Ding X, and L.S. Kaminsky, *Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 149-73.

Finnström N, Bjellman C, Söderström TG, Smith G, Egevad L, Norlén BJ, Wolf CR, Rane A. *Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(10): p. 880-6.

Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S, *Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer*. Urology, 2009. **74**(2): p. 391-7.

Leskelä S, Honrado E, Montero-Conde C, Landa I, Cascón A, Letón R, Talavera P, Cózar JM, Concha A, Robledo M, Rodríguez-Antona C, *Cytochrome P450 3A5 is highly expressed in normal prostate cells but absent in prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(3): p. 645-54.

Nishimura M, Naito S, *Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes*. Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(5): p. 357-74.

Obligacion R, Murray M, Ramzan I, *Drug-metabolizing enzymes and transporters: expression in the human prostate and roles in prostate drug disposition*, 2006. **27**(2): p. 138-50.

Pavek P, Dvorak Z, *Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(2): p. 129-43.

Rendic S, Guengerich FP, *Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters*. Curr Drug Metab, 2010. **11**(1): p. 4-84.

Zencir S, Alptekin D, Celiktas M, Canturk P, Colak D, Caner V, Luleyap UH, Topcu Z, *Detection of cytochrome P450-2A6, -3A5 and -4B1 with real-time polymerase chain reaction in prostate tissue*. Z Naturforsch, 2008. **63**(9-10): p. 780-4.

La prostate est essentiellement constituée de trois zones (Fig. 26) :

- la zone périphérique (PZ), composée de tissu sécrétoire, représente 70% de la glande. Elle est située à l'arrière de la prostate. C'est dans cette zone que naissent 70% des cancers de la prostate.
- la zone de transition (TZ) représente 5% de la masse totale de la glande. 20 à 25% des cancers prennent naissance dans ce territoire.
- la zone centrale (CZ), au contact de l'urètre, qui représente 25% de la glande, voit se développer 5 à 10% des cancers prostatiques.

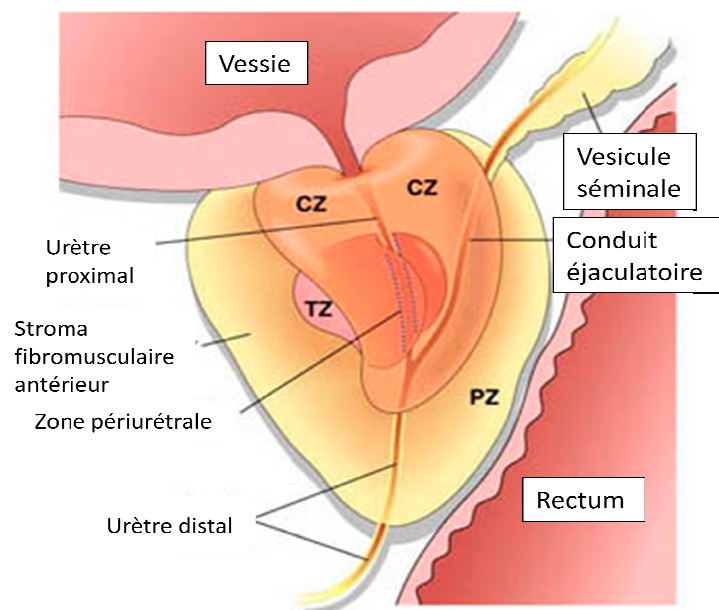


Fig. 26 : Schéma général représentant les trois zones de la prostate

La zone périphérique, plus sujette à développer un cancer est également la plus riche en enzymes d'activation et/ou de détoxification (Ragavan *et al*, 2004). Cependant, il a été démontré que la présence d'adduits à l'ADN formés après exposition aux Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), était observée aussi bien dans la zone périphérique que dans la zone de transition (John *et al*, 2009).

De part l'intérêt clinique évident que cela pourrait avoir, un nombre croissant de travaux visent à relier un polymorphisme ou une surexpression des EMX à un risque accru de cancer prostatique.

John K, Ragavan N, Pratt MM, Singh PB, Al-Buheissi S, Matanhelia SS, Phillips DH, Poirier MC, Martin FL, *Quantification of phase I/II metabolizing enzyme gene expression and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in human prostate*. Prostate, 2009. **69**(5): p. 505-19.

Ragavan N, Hewitt R, Cooper LJ, Ashton KM, Hindley AC, Nicholson CM, Fullwood NJ, Matanhelia SS, Martin FL, *CYP1B1 expression in prostate is higher in the peripheral than in the transition zone*. Cancer Lett, 2004. **215**(1): p. 69-78.

Une surexpression (Nwosu et al, 2001 ; Tokizane et al, 2005 ; Martin et al, 2010 ; Singh et al, 2010) ou un polymorphisme (Murata et al, 2001 ; Tanaka et al, 2002 ; Suzuki, 2003 ; Beuten et al, 2008) du gène CYP1B1 ont été associés au risque de tumeurs prostatiques. Le même type de conclusions ressort d'études menées sur le CYP2B6 (Kumagai J et al, 2007), le CYP2D6 (Wadelius et al, 1999) et les CYP3A (Zeigler-Johnson et al, 2004 ; Stone et al, 2005 ; Daly, 2006).

Par contre, deux équipes (Lima et al, 2008 ; Kumar et al, 2010) ont montré l'absence de corrélation entre les polymorphismes du CYP1A1 et la susceptibilité à développer un cancer de la prostate. De plus, il faut bien sûr avoir en tête que les différences d'expression en CYPs sont fortement dépendantes de l'exposition des individus au tabac, à l'alcool et/ou à différents polluants environnementaux tels que les amines aromatiques (Turesky, 2004), les HAPs (Sterling et Cutroneo, 2004), les polychlorobiphényles (Green et al, 2008) ou la dioxine (Schaufler et al, 2002).

- Beuten J**, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Price DK, Leach RJ, *CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians. Carcinogenesis*, 2008. **29**(9): p. 1751-7.
- Daly AK**, Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet*, 2006. **45**(1): p. 13-31.
- Green RM**, Hodges NJ, Chipman JK, O'Donovan MR, Graham M, *Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls. Mutagenesis*, 2008. **23**(6): p. 457-63.
- Kumagai J**, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S, *Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. Prostate*, 2007. **67**(10): p. 1029-37.
- Kumar V**, Yadav CS, Singh S, Goel S, Ahmed RS, Gupta S, Grover RK, Banerjee BD, *CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer. Chemosphere*, 2010. **81**(4): p. 464-8.
- Lima MM Jr**, Oliveira MN, Granja F, Trindade AC, De Castro Santos LE, Ward LS, *Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients. Folia Biol (Praha)*, 2008. **54**(3): p. 102-8.
- Martin FL**, Patel II, Sozeri O, Singh PB, Ragavan N, Nicholson CM, Frei E, Meinel W, Glatt H, Phillips DH, Arlt VM, *Constitutive expression of bioactivating enzymes in normal human prostate suggests a capability to activate pro-carcinogens to DNA-damaging metabolites. Prostate*, 2010. **70**(14): p. 1586-99.
- Murata M**, Watanabe M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Nagao M, Katoh T, Kamataki T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T, *Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population. Cancer Lett*, 2001. **165**(2): p. 171-7.
- Nwosu V**, Carpten J, Trent JM, Sheridan R, *Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. Hum Mol Genet*, 2001. **10**(20): p. 2313-8.
- Schaufler K**, Haslmayer P, Jäger W, Pec M, Thalhammer T, *The environmental toxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces cytochrome P450 activity in high passage PC 3 and DU 145 human prostate cancer cell lines. Int J Mol Med*, 2002. **9**(4): p. 411-6.
- Singh PB**, Ragavan N, Ashton KM, Basu P, Nadeem SM, Nicholson CM, Krishna RK, Matanhelia SS, Martin FL, *Quantified gene expression levels for phase I/II metabolizing enzyme and estrogen receptor levels in benign prostate from cohorts designated as high-risk (UK) versus low-risk (India) for adenocarcinoma at this organ site: a preliminary study. Asian J Androl*, 2010. **12**(2): p. 203-14.
- Sterling KM Jr**, Cutroneo KR, *Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells. J Cell Biochem*, 2004. **91**(2): p. 423-9.
- Stone A**, Ratnasinghe LD, Emerson GL, Modali R, Lehman T, Runnells G, Carroll A, Carter W, Barnhart S, Rasheed AA, Greene G, Johnson DE, Ambrosone CB, Kadlubar FF, Lang NP, *CYP3A43 Pro(340)Ala polymorphism and prostate cancer risk in African Americans and Caucasians. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(5): p. 1257-61.
- Suzuki K**, Matsui H, Nakazato H, Koike H, Okugi H, Hasumi M, Ohtake N, Nakata S, Takei T, Hatori M, Ito K, Yamanaka H, *Association of the genetic polymorphism in cytochrome P450 (CYP) 1A1 with risk of familial prostate cancer in a Japanese population: a case-control study. Cancer Lett*, 2003. **195**(2): p. 177-83.
- Tanaka Y**, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R, *Polymorphisms of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **296**(4): p. 820-6.
- Tokizane T**, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R, *Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. Clin Cancer Res*, 2005. **11**(16): p. 5793-801.
- Turesky RJ**, *The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines. Curr Drug Metab*, 2004. **5**(2): p. 169-80.
- Wadelius M**, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A, *Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer. Pharmacogenetics*, 1999. **9**(3): p. 333-40.
- Zeigler-Johnson C**, Friebe T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB, Rebbeck TR, *CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8461-7.

Il est donc bien établi que la prostate possède un système de métabolisation des xénobiotiques qualitativement proche de celui retrouvé au niveau hépatique. Cependant, d'un point de vue quantitatif, les CYPs sont bien entendu plus abondants dans le tissu hépatique.

Le profil d'expression et/ou le polymorphisme peuvent donc retentir sur la réponse des tissus prostatiques aux traitements qui leur sont appliqués. Une revue (*Obligacion et al, 2006*) reporte à la fois l'influence des principaux traitements (anti-androgènes, inhibiteurs de la 5 α -réductase, antagonistes α -adrénergiques, agents cytotoxiques) sur certains CYPs présents dans la prostate (3A4, 1B1, 2C8) et les CYPs responsables de leur métabolisation au niveau prostatique.

Tout ceci justifie donc encore notre objectif : connaître l'influence de l'environnement et en particulier du cadmium, sur un maximum de capacités métabolisantes présentes au niveau de la prostate.

PARTIE 3 : INFLUENCE DU CADMIUM SUR LA METABOLISATION DES XENOBIOTIQUES

L'organisme humain est susceptible de subir des expositions multiples à des agents physiques, chimiques et biologiques, au contact des différents compartiments (air, sol, eau) de l'environnement dans lequel il évolue. L'impact sanitaire potentiel de ces expositions peut se manifester à court, moyen ou long terme et se traduire par des effets toxiques, infectants et allergisants.

Les contaminants chimiques peuvent être classés selon leur structure, on distinguera alors, par exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (type benzo(a)pyrène), les organochlorés et organobromés (pesticides, dioxines, PCB, polybromés), les amines aromatiques, les organophosphorés (sarin, chlorpyrifos), les nitrosamines, les fibres (amiante), les métaux lourds, les toxines (aflatoxine), les mélanges (fumées de cigarettes, particules fines, goudrons...) ou selon leur mode d'action probable, on distinguera alors les agents génotoxiques (directs ou après métabolisation) tels que le benzo(a)pyrène, les aflatoxines, les fibres d'amiante... des agents non génotoxiques tels que les dioxines (action par une signalisation cellulaire propre), les pesticides (perturbateurs cellulaires), les perturbateurs endocriniens (inhibition ou activation d'une signalisation cellulaire), les organophosphorés (perturbateurs enzymatiques), les métaux, les dépôts de particules (stress cellulaire de type oxydant) (*INSERM, 2008*).

Les effets de certains de ces polluants sur des isoformes du cytochrome P450 ont déjà été décrits au niveau hépatique (*Rendic et Guengerich, 2010*) ou extra-hépatique (*Pavek et Dvorak, 2008*). L'exposition à la fumée de cigarettes a été particulièrement étudiée et des modifications dans l'expression et l'activité CYP1A2, 1B1 et 3A5 ont pu être démontrées. Toutefois, les résultats obtenus sur l'activité de tels mélanges complexes ou à partir de prélèvements d'échantillons atmosphériques dans des zones polluées, sont difficilement interprétables en terme de mécanisme d'action. Pour cette raison, nous avons décidé de nous focaliser sur un élément trace, le cadmium, particulièrement présent dans l'environnement de notre région (0,56 ng/m³ en 2006 avec des maxima de 0,74 ng/m³ dans la région de Dunkerque) et également au niveau de l'organe cible qui a retenu notre attention dans ce travail de thèse.

Pavek P, Dvorak Z, *Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues*. *Curr Drug Metab*, 2008. **9**(2): p. 129-43.

Rendic S, Guengerich FP, *Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(1): p. 4-84.

I. Sources d'exposition au cadmium et métabolisme

Le cadmium est un métal lourd peu répandu à l'état naturel et présent à l'état d'impuretés dans divers minerais tels que le zinc, le plomb et le cuivre (Andujar et Nemery, 2009). On le retrouve sous plusieurs formes : oxyde (CdO), chlorure (CdCl₂), bromure (CdBr), nitrate (Cd[NO₃]₂), cyanure (Cd[CN]₂), sulfure (CdS) ou même séléniure (CdSe). Ce métal est en grande partie utilisé dans les batteries et accumulateurs ou piles électriques alcalines sous forme de nickel-cadmium (Ni-Cd), dans les pigments pour peintures, des matières plastiques et également, à moindre mesure, dans le cadmiage de surfaces métalliques (Directives 91/157/CEE, 91/338/CEE et 2002/95/CE) (Andujar et Nemery, 2009). On retrouve également le cadmium en tant que polluant automobile dans la combustion de produits pétrochimiques, dans les engrais phosphatés (Pan et al, 2010) et dans la phase particulaire de la fumée de tabac (Viala et Botta, 2009) dont l'apport dans l'organisme est d'environ 1 µg/cigarette. De plus, le cadmium est stocké dans de nombreux aliments tels que les fruits de mer, les abats, les céréales, les champignons, les légumes et en quantités plus faibles dans le poisson, les fruits et la viande (Andujar et Nemery, 2009). Les principales sources d'exposition de la population au cadmium sont donc l'alimentation (apport quotidien en cadmium compris entre 15 et 20 µg/jour) et le tabagisme ce qui lui confère à la fois une pénétration par les voies digestives et respiratoires.

Le cadmium est une substance toxique cumulative dont la demi-vie dans l'organisme est de 20 à 40 ans (Kim et al, 2002 ; Järup et Akesson, 2009) et qui s'accumule préférentiellement dans le foie et les reins, mais également au niveau des poumons, de la prostate, des cheveux et des phanères. A la naissance, la charge en cadmium est inférieure à 1 µg (le cadmium franchit difficilement la barrière placentaire) mais à l'âge de 50 ans, on estime qu'elle se situe entre 5 et 30 mg et qu'elle peut atteindre 200 à 300 mg chez les sujets professionnellement exposés.

Le cadmium circule dans le sang lié à l'hémoglobine (concentration normale < 0,5 µg/L) et se fixe dans un premier temps au niveau du foie où il est d'abord métabolisé sous la forme d'un complexe Cd²⁺-glutathion puis remis en circulation sous la forme d'un complexe Cd²⁺-métallothionéine. Ce complexe est réabsorbé par les reins où il est rapidement dégradé.

Andujar P, Nemery B, [Acute and subacute chemical pneumonitis]. Rev Mal Respir, 2009. 26(8): p. 867-85.

Järup L, Akesson A, Current status of cadmium as an environmental health problem. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. 238(3): p. 201-8.

Kim BJ, Kim MS, Kim KB, Kim KW, Hong YM, Kim IK, Lee HW, Jung YK, Sensitizing effects of cadmium on TNF-alpha- and TRAIL-mediated apoptosis of NIH3T3 cells with distinct expression patterns of p53. Carcinogenesis, 2002. 23(9): p. 1411-7.

Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C, Cadmium levels in Europe: implications for human health. Environ Geochem Health, 2010. 32(1): p. 1-12.

Viala A et Botta A (Coordonateurs), Toxicologie. 2^{ème} édition, 2009. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Les ions Cd^{2+} ainsi libérés stimulent à leur tour une nouvelle synthèse de métallothionéines et, notamment au niveau des cellules du tubule proximal, un équilibre dynamique Cd^{2+} libre/ Cd^{2+} - métallothionéine s'installe.

Le complexe Cd^{2+} -métallothionéine n'est pas toxique mais une libération de Cd^{2+} par exemple en présence de zinc peut engendrer de graves conséquences si l'accumulation de ce complexe est importante notamment chez les fumeurs.

Les individus présentant une faible expression de métallothionéines sont donc sensibles à la toxicité du cadmium (*Klaassen et al, 2009*). Ces petites protéines ont pour rôle de protéger les cellules contre les dommages induits par les agents alkylants, les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les radiations ionisantes (*Kusakabe et al, 2008 ; Endo et al, 2004 ; Jasani et Schmid, 1997 ; Garrett et al, 1999 et 2000*). Les fonctions des métallothionéines telles que le maintien de l'homéostasie de métaux essentiels comme le zinc, le « scavenging » d'ERO, la régulation génique et la régénération tissulaire (*Cherian et Kang, 2006*) contribueraient à la protection des métallothionéines envers le cadmium et les différences inter-individuelles de l'expression de ces protéines pourraient avoir un impact sur la susceptibilité des hommes envers la toxicité du cadmium (*Klaassen et al, 2009*).

II. Toxicité du cadmium

Les premiers effets du cadmium sur la santé ont été rapportés en 1858 (*Nordberg, 2009*) et au fil des années, des troubles respiratoires, gastriques, osseux, rénaux, cancérogènes ont été décrits. La toxicité du cadmium résulte de phénomènes complexes, parfois indirects et dépend de la voie, de la durée et de la dose d'exposition.

Cherian MG, Kang YJ, *Metallothionein and liver cell regeneration*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. 231(2): p. 138-44.

Endo T, Yoshikawa M, Ebara M, Kato K, Sunaga M, Fukuda H, Hayasaka A, Kondo F, Sugiura N, Saisho H, *Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents*. J Gastroenterol, 2004. 39(12): p. 1196-201.

Garrett SH, Sens MA, Shukla D, Nestor S, Somji S, Todd JH, Sens DA, *Metallothionein isoform 3 expression in the human prostate and cancer-derived cell lines*. Prostate, 1999. 41(3): p. 196-202.

Garrett SH, Sens MA, Shukla D, Flores L, Somji S, Todd JH, Sens DA, *Metallothionein isoform 1 and 2 gene expression in the human prostate: downregulation of MT-1X in advanced prostate cancer*. Prostate, 2000. 43(2): p. 125-35.

Jasani B, Schmid KW, *Significance of metallothionein overexpression in human tumours*. Histopathology, 1997. 31(3): p. 211-4.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA, *Metallothionein protection of cadmium toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. 238(3): p. 215-20.

Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Koyama H, Arakawa K, Nagamine T, *The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure*. Biometals, 2008. 21(1): p. 71-81.

Nordberg GF, *Historical perspectives on cadmium toxicology*. Toxicol Appl Pharmacol. 2009. 238(3): p. 192-200.

1. Intoxications aigüe et chronique

La toxicité aigüe est associée à de sévères douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhées, maux de tête, vertiges, pouvant conduire à la mort dans les 24 heures ou une à deux semaines plus tard selon l'existence de dommages rénaux et hépatiques (Pan et al, 2010). Elle survient lors d'inhalations de fumées d'oxyde de cadmium (générées lorsque les éléments cadmiés sont portés à haute température) ou en cas d'ingestion d'aliments ayant été au contact avec des objets cadmiés. La dose létale par voie orale pour l'Homme se situe entre 350 et 500 mg.

L'intoxication chronique se traduit surtout par une atteinte rénale. La néphropathie cadmique consiste d'abord en une tubulopathie proximale qui provoque une protéinurie tubulaire caractérisée par une excrétion accrue de protéines de faible poids moléculaire qui doivent normalement être réabsorbées au niveau du tubule proximal. A un stade avancé, cette dérégulation fonctionnelle peut s'étendre au tubule distal et une insuffisance rénale progressive peut s'installer. Une concentration urinaire en cadmium de 2 à 2,5 µg/g de créatinine serait associée à des modifications chimiquement significatives de la fonction rénale. Cette néphropathie a été observée chez les patients souffrant de la maladie « Itai-Itai » apparue au Japon chez des femmes âgées de 45 à 75 ans vivant le long d'une rivière en aval d'une mine de zinc et consommant donc de l'eau et du riz fortement contaminés par le cadmium.

La toxicité chronique du cadmium se traduit également par des atteintes osseuses (ostéomalacie, fractures spontanées : WHO, 1992 a et b) et respiratoires (dyspnée, toux, douleurs rétrosternales). Des effets hypertensifs et/ou sur le système reproducteur n'ont pu être attribués de façon certaine à une intoxication par le cadmium.

Enfin, le cadmium a été classé comme agent cancérigène et génotoxique de catégorie 1 en 1993 par l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) bien qu'il ne soit pas directement génotoxique.

Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C, *Cadmium levels in Europe: implications for human health*. Environ Geochem Health, 2010. 32(1): p. 1-12.

WHO, Cadmium : Environmental health criteria, 134 Geneva : World health Organisation. 1992a.

WHO, Cadmium : Environmental aspect, environmental health criteria, 135 Geneva : World health Organisation. 1992b.

2. Mécanismes d'action au niveau cellulaire

Les mécanismes de toxicité aigüe impliquent la déplétion du glutathion et de groupements sulfhydryls liés aux protéines, ce qui résulte en la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que ions superoxydes, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyles (Manca *et al*, 1994 ; Bagchi *et al*, 1997 ; Liu *et Jan*, 2000). Les ERO induits par le cadmium produisent à leur tour une peroxydation lipidique et engendre des dommages à l'ADN. Contrairement à la toxicité aigüe, le rôle des ERO dans la toxicité chronique du cadmium et la cancérogenèse sont controversées. Durant une exposition à long terme et à concentrations faibles, l'accumulation d'ERO n'est pas forcément associée avec une toxicité chronique induite par le cadmium. Des mécanismes adaptatifs incluant l'induction de métallothionéines, de glutathion et d'anti-oxydants cellulaires pourraient diminuer le stress oxydant induit par le cadmium. Cependant, le cadmium inhibe lui-même des enzymes anti-oxydantes telles que les catalases, les glutathion peroxydases et les superoxydes dismutases qui régulent la production d'ERO (Waisberg *et al*, 2003 ; Filipic *et Hei*, 2004 ; Valko *et al*, 2005). La formation d'ERO *via* le cadmium induit des perturbations des chaînes de transfert des électrons dans la mitochondrie et endommage les membranes lysosomales (Haldrud *et Krøkje*, 2009). Le cadmium interfère avec des mécanismes de réparation de l'ADN tels que la réparation d'excision des nucléotides, probablement en compétition avec le zinc dans les protéines à doigts de zinc (Hartwig, 1998 ; Asmuss *et al*, 2000). L'équipe d'Oliveira (2008) a montré que le cadmium peut se lier directement à l'ADN. Asmuss *et al* (2000) montre que la co-exposition de zinc et de cadmium induit moins d'inhibition de la réparation de l'ADN qu'une exposition seule de cadmium, le zinc ayant des propriétés anti-oxydantes liées à la synthèse de métallothionéines (Chan *et Cherian*, 1992).

-
- Asmuss M, Mullenders LH, Hartwig A, *Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins*. Toxicol Lett, 2000. 112-113: p. 227-31.
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ, *Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats*. Free Radic Biol Med, 1997. 22(3): p. 471-8.
- Chan HM, Cherian MG. *Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium*. Toxicology, 1992. 72(3): p. 281-90.
- Filipic M and Hei TK, *Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage*. Mutat Res, 2004. 546(1-2): p. 81-91.
- Haldrud R, Krøkje A, *Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations*. J Toxicol Environ Health A, 2009. 72(3-4): p. 155-63.
- Hartwig A, *Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition*. Toxicol Lett, 1998. 102-103: p. 235-9.
- Liu F and Jan KY, *DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2000. 28(1): p. 55-63.
- Manca D, Ricard AC, Tra HV, Chevalier G, *Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium*. Arch Toxicol, 1994. 68(6): p. 364-9.
- Oliveira SC, Corduneanu O, Oliveira-Brett AM, *In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor*. Bioelectrochemistry, 2008. 72(1): p. 53-8.
- Valko M, Morris H, Cronin MT, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. 12(10): p. 1161-208.
- Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D, *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 2003. 192(2-3): p. 95-117.

Un schéma résumé des conséquences biologiques de l'intoxication par le cadmium au niveau cellulaire a été proposé par Bertin et Averbeck en 2006 (Fig. 27). Les dommages à l'ADN, la résistance à l'apoptose, l'épigénétique par la méthylation de l'ADN et l'expression aberrante de gènes, peuvent jouer un rôle important dans la cancérisation liée au cadmium (Liu et al, 2009) et l'exposition professionnelle au cadmium a été associée à l'apparition de cancers pulmonaires, prostatiques, pancréatiques et rénaux.

Comme le cadmium ne forme pas d'adduits avec l'ADN (Waalkes et Poirier, 1984), il agirait par des mécanismes épigénétiques (Jiang, 2008 ; Baccarelli et Bollati, 2009 ; Ding et Zhu, 2009 ; Arita et Costa, 2009 ; Martinez-Zamudio et Ha, 2011). Le cadmium inhibe l'activité de la DNMT (Poirier et Vlasova, 2002). Cependant, le rôle de la méthylation dans l'effet cancérogène du cadmium est mal connu. D'après Jiang (2008), une exposition chronique au cadmium des cellules HLF (*Human embryo Lung Fibroblasts*) provoque des hyperméthylations de l'ADN et la surexpression de l'ARNm de DNMT1, DNMT3a et DNMT3b. La transcription de ces trois DNMTs est stimulée par les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 (Kishikawa et al, 2002 ; Jinawath et al, 2005) et l'expression du facteur Sp1 est corrélée avec une augmentation de l'expression de DNMT1 et DNMT3a chez des souris traitées au diéthylstilbestrol (Sato et al, 2006). La régulation de la DNMT pourrait passer par cette voie. Le cadmium peut activer des oncogènes ou des gènes associés à la prolifération cellulaire tels que *c-myc*, *c-jun* et *c-fos* (Joseph et al, 2001 ; Spruill et al, 2002).

-
- Arita A**, Costa M, *Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium*. *Metallomics*, 2009. **1**(3): p. 222-8.
- Baccarelli A**, Bollati V, *Epigenetics and environmental chemicals*. *Curr Opin Pediatr*, 2009. **21**(2): p. 243-51.
- Bertin G** and Averbeck D, Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie*, 2006. **88**(11): p. 1549-59.
- Ding YF** and Zhu C, *The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. **386**(1): p. 6-10.
- Jiang G**, Xu L, Song S, Zhu C, Wu Q, Zhang L, Wu L, *Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells*. *Toxicology*, 2008. **244**(1): p. 49-55.
- Jinawath A**, Miyake S, Yanagisawa Y, Akiyama Y, Yuasa Y, *Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins*. *Biochem J*, 2005. **385**(Pt 2): p. 557-64.
- Joseph P**, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong T, *Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species*. *Toxicol Sci*, 2001. **61**(2): p. 295-303.
- Kishikawa S**, Ugai H, Murata T, Yokoyama KK, *Roles of histone acetylation in the Dnmt1 gene expression*. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2002. (2): p. 209-10.
- Liu J**, Qu W, Kadiiska MB, *Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **238**(3): p. 209-14.
- Martinez-Zamudio R**, Ha HC, *Environmental epigenetics in metal exposure*. *Epigenetics*. 2011. **6**(7): p. 820-7.
- Poirier LA**, Vlasova TI, *The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(5): p. 793-5.
- Sato K**, Fukata H, Kogo Y, Ohgane J, Shiota K, Mori C, *Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the epididymis of mice*. *Endocr J*, 2006. **53**(3): p. 331-7.
- Spruill MD**, Song B, Whong WZ, Ong T, *Proto-oncogene amplification and overexpression in cadmium-induced cell transformation*. *J Toxicol Environ Health A*, 2002. **65**(24): p. 2131-44.
- Waalkes MP**, Poirier LA, *In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1984. **75**(3): p. 539-46.

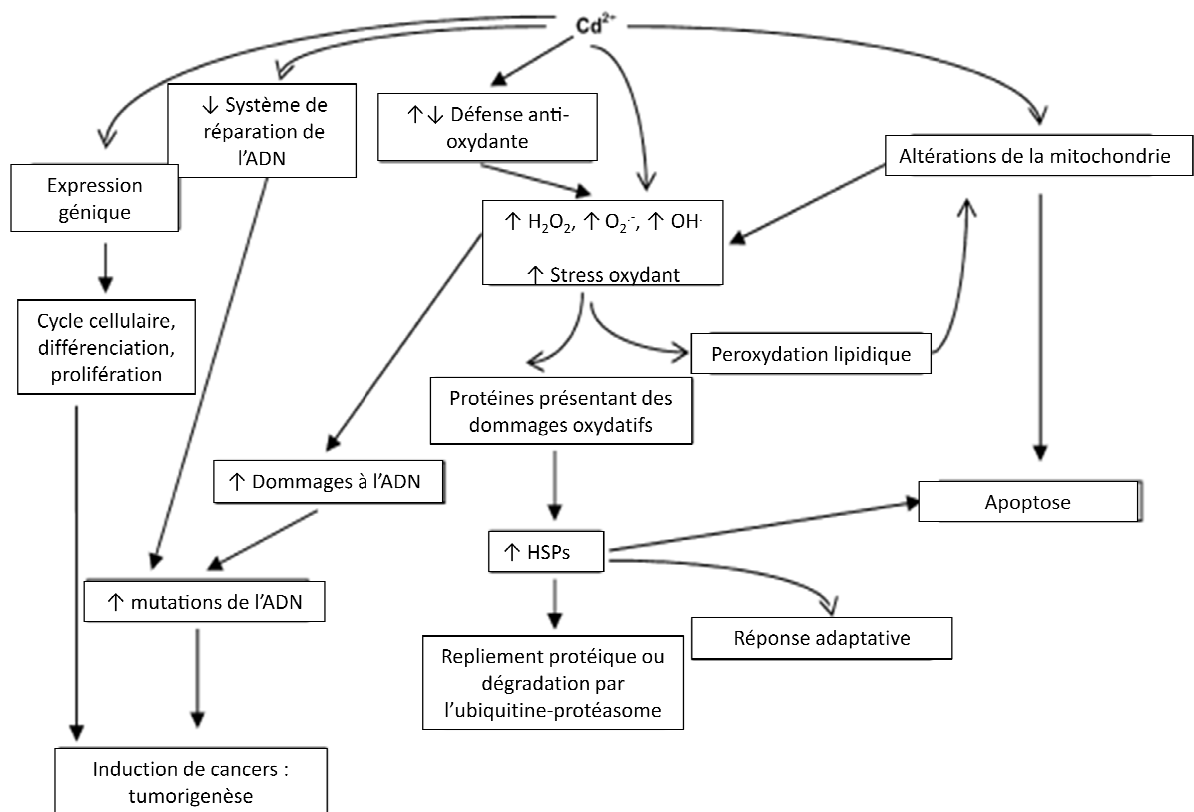


Fig. 27 : Schéma général des conséquences biologiques d'une intoxication au cadmium dans les cellules.

(D'après Bertin et Averbek, 2006)

La méthylation de l'ADN joue un rôle important dans l'activation de ces gènes (Papaggeli *et al*, 2003).

Les altérations de la méthylation de l'ADN induites par des expositions chroniques de cadmium peuvent causer une expression aberrante de gènes importante dans la prolifération cellulaire qui peut résulter aussi bien dans la croissance cellulaire que dans l'altération de la progression du cycle cellulaire. Par conséquent, les erreurs de méthylation de l'ADN engendrées par le cadmium, pourraient induire des lésions moléculaires conduisant à la malignité et pourraient ainsi expliquer les mécanismes cancérigènes du cadmium (Jiang *et al*, 2008).

3. Cas particulier de l'implication du cadmium dans le cancer de la prostate

A l'heure actuelle, quatre métaux (ou métalloïdes) sont connus pour être des acteurs importants dans la survenue du cancer de la prostate : le fer, le zinc, le cadmium et le sélénium (Sarafanov *et al*, 2011).

Comme déjà évoqué précédemment, le cadmium est considéré comme un agent cancérigène de classe 1 par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) (IARC *monographs...*, 1993). Cependant, peu d'études ont montré l'implication de métaux lourds tels que le cadmium dans la survenue du cancer de la prostate (Sarafanov *et al*, 2011). Le cadmium issu de la fumée de cigarettes, de l'environnement et de l'alimentation s'accumule dans la prostate humaine où il induit, comme dans d'autres organes la production d'Espèces Réactives à l'Oxygène, altère le métabolisme des hormones stéroïdiennes et stimule la croissance des cellules épithéliales prostatiques humaines engendrant ainsi leur transformation maligne (Jamba *et al*, 1997 ; Benbrahim-Tallaa *et al*, 2007 ; Achanzar *et al*, 2001 ; Zeng *et al*, 2004). Au niveau de la prostate, le cadmium interagit avec le sélénium de façon à former un complexe protéique cadmium-sélénium (Cd-Se) (Schöpfer *et al*, 2010).

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells*. Cancer Res, 2001. **61**(2): p. 455-8.

Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Dill AL, Webber MM, Waalkes MP, *Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo DNA methyltransferase*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(10): p. 1454-9.

Jamba L, Nehru B, Bansal MP, *Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposures in mice*. Mol Cell Biochem, 1997. **177**(1-2): p. 169-75.

Jiang G, Xu L, Song S, Zhu C, Wu Q, Zhang L, Wu L, *Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells*. Toxicology, 2008. **244**(1): p. 49-55.

Papaggeli PC, Kortsaris AC, Matsouka PT, *Aberrant methylation of c-myc and c-fos protooncogenes and p53 tumor suppressor gene in myelodysplastic syndromes and acute non-lymphocytic leukemia*. J BUON, 2003. **8**(4): p. 341-50.

Sarafanov AG, Todorov TI, Centeno JA, Macias V, Gao W, Liang WM, Beam C, Gray MA, Kajdacsy-Balla AA, *Prostate cancer outcome and tissue levels of metal ions*. Prostate, 2011. **71**(11): p. 1231-8.

Schöpfer J, Drasch G, Schrauzer GN, *Selenium and cadmium levels and ratios in prostates, livers, and kidneys of nonsmokers and smokers*. Biol Trace Elem Res, 2010. **134**(2): p. 180-7.

Zeng X, Jin T, Jiang X, Kong Q, Ye T, Nordberg GF, *Effects on the prostate of environmental cadmium exposure--a cross-sectional population study in China*. Biometals, 2004. **17**(5): p. 559-65.

A de faibles concentrations de cadmium, cette interaction peut être bénéfique dans le sens où cela conduit à sa détoxification (*Bremner et Campbell, 1978*). Par contre, à des doses plus importantes, le cadmium abolit les effets anti-cancérogènes du sélénium et augmente ainsi le risque de cancer prostatique (*Schrauzer, 2008*). Ceci explique pourquoi les fumeurs ont un plus grand risque de développer un cancer prostatique (*Coughlin et al, 1996 ; Plaskon et al, 2003*).

De plus, dans ce tissu, la détoxification du cadmium par les métallothionéines est peu probable ou moins efficace (la prostate présente une faible expression de métallothionéine-1 et 2 ; *Albrecht et al, 2008*) poussant ainsi le cadmium à interagir avec le sélénium d'où augmentation du risque de cancer de la prostate. Cependant, alors que la prostate fait partie des organes qui accumulent de grandes concentrations de cadmium (*Achanzar et al, 2000 ; Bakshi et al, 2008 ; Satarug et al, 2010*), l'équipe de Wu (*Wu et al, 2011*) n'a pu montrer qu'il existait un lien entre le taux de PSA, l'exposition au cadmium et le cancer de la prostate, alors qu'on sait qu'un taux élevé de cadmium peut prédire un phénotype avancé de cancer (*Chen et al, 2009*). Dans leur étude, environ 41,7 % des hommes avaient un taux de PSA > 4 ng/mL, avec des taux de cadmium sanguins et urinaires faibles, ce qui a montré qu'un taux élevé de PSA pouvait être associé de manière significative avec de faibles concentrations de cadmium urinaire et sanguin (Tableau 5). Cependant, des taux de PSA élevés peuvent également être liés à une exposition en cadmium bien plus élevée (*Wu et al, 2011*).

Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2000. **164**(3): p. 291-300.

Albrecht AL, Singh RK, Somji S, Sens MA, Sens DA, Garrett SH, *Basal and metal-induced expression of metallothionein isoform 1 and 2 genes in the RWPE-1 human prostate epithelial cell line*. J Appl Toxicol, 2008. **28**(3): p. 283-93.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RY, Sartor MA, Medvedovic M, Ho SM *Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor*. Environ Health Perspect, 2008. **116**(6): p. 769-76.

Bremner I, Campbell JK, *Effect of copper and zinc status on susceptibility to cadmium intoxication*. Environ Health Perspect, 1978. **25**: p. 125-8.

Chen YC, Pu YS, Wu HC, Wu TT, Lai MK, Yang CY, Sung FC, *Cadmium burden and the risk and phenotype of prostate cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 429.

Coughlin SS, Neaton JD, Sengupta A, *Cigarette smoking as a predictor of death from prostate cancer in 348,874 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Am J Epidemiol, 1996. **143**(10): p. 1002-6.

Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL, Stanford JL, *Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003. **12**(7): p. 604-9.

Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA, *Cadmium, environmental exposure, and health outcomes*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(2): p. 182-90.

Schrauzer GN, *Interactive effects of selenium and cadmium on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice. A model study on the roles of cadmium and selenium in human breast cancer*. Biol Trace Elem Res, 2008. **123**(1-3): p. 27-34.

Wu CC, Pu YS, Wu HC, Yang CY, Chen YC, *Reversed association between levels of prostate specific antigen and levels of blood cadmium and urinary cadmium*. Chemosphere, 2011. **83**(8): p. 1188-91.

	PSA, ng.mL ⁻¹		<i>p</i> -value
	< 4 n (%)	≥ 4 n (%)	
<i>Cadmium sanguin (μg.L⁻¹)</i>			
CdS ≤ 0,493	63 (23,4)	10 (41,7)	0,26
0,493 < CdS ≤ 0,843	69 (25,6)	5 (20,8)	
0,843 < CdS ≤ 1,413	69 (25,6)	4 (16,7)	
CdS > 1,413	68 (25,3)	5 (20,8)	
<i>Cadmium urinaire (μg.g⁻¹)</i>			
CdU ≤ 0,45	64 (23,6)	10 (41,7)	0,20
0,450 < CdU ≤ 0,945	69 (25,5)	5 (20,8)	
0,945 < CdU ≤ 1,73	68 (25,1)	6 (25,0)	
CdU > 1,73	70 (25,8)	3 (12,5)	

Tableau 5 : Relations entre le PSA et le cadmium retrouvé dans le sang et les urines
(D'après Wu et al, 2011).

De manière opposée, de nombreuses études ont montré que des concentrations accrues en cadmium au niveau prostatique étaient associées, d'un point de vue clinique, au cancer de la prostate (Feustel et al, 1982 ; Ogunlewe et Osegbe, 1989 ; Brys et al, 1997).

D'après Sarafanov, le cadmium a longtemps été suspecté d'être un facteur de risque dans ce type de cancer bien que ses concentrations au niveau prostatique soient en deçà des concentrations dites cancérigènes dans des modèles *in vivo* de cancer de la prostate (Waalkes et Rehm, 1994). D'autres travaux vont dans ce sens puisque des hommes présentant un cancer prostatique ont une augmentation du taux de cadmium dans la circulation systémique et dans les tissus prostatiques par rapport aux hommes qui n'ont pas de pathologies ou une hyperplasie bénigne de la prostate (Habib et al, 1976 ; Ogunlewe et Osegbe, 1989 ; Lee et al, 2009 ; Golovine et al, 2010). De même, des études *in vitro* ont mis en avant une transformation en tumeurs malignes des cellules épithéliales prostatiques humaines non tumorigènes après exposition au cadmium (Achanzar et al, 2001 ; Nakamura et al, 2002 ; Zhang et al, 2008). D'autres résultats montrent que le cadmium augmente l'agressivité du cancer dans différents modèles (Waalkes et Rehm, 1994 ; Abshire et al, 1996 ; Haga et al, 1996) et probablement chez l'Homme (Elghany et al, 1990).

La question de savoir si le cadmium induit plus ou moins directement la survenue du cancer de la prostate reste donc encore irrésolue.

-
- Abshire MK**, Devor DE, Diwan BA, Shaughnessy JD Jr, Waalkes MP, *In vitro* exposure to cadmium in rat L6 myoblasts can result in both enhancement and suppression of malignant progression *in vivo*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(6): p. 1349-56.
- Achanzar WE**, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(2): p. 455-8.
- Bryś M**, Nawrocka AD, Miekoś E, Zydek C, Foksiński M, Barecki A, Krajewska WM, *Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms*. *Biol Trace Elem Res*, 1997. **59**(1-3): p. 145-52.
- Elghany NA**, Schumacher MC, Slattery ML, West DW, Lee JS, *Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer*. *Epidemiology*, 1990. **1**(2): p. 107-15.
- Feustel A**, Wennrich R, Steiniger D, Klauss P, *Zinc and cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue and adenofibromyomatosis (BPH)*. *Urol Res*, 1982. **10**(6): p. 301-3.
- Golovine K**, Makhov P, Uzzo RG, Kutikov A, Kaplan DJ, Fox E, Kolenko VM, *Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF-kappaB-independent, proteasome-mediated mechanism*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 183.
- Habib FK**, Lee IR, Stitch SR, Smith PH, *Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate*. *J Endocrinol*, 1976. **71**(1): p. 99-107.
- Haga A**, Nagase H, Kito H, Sato T, *Enhanced invasiveness of tumour cells after host exposure to heavy metals*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(13): p. 2342-7.
- Lee JD**, Wu SM, Lu LY, Yang YT, Jeng SY, *Cadmium concentration and metallothionein expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia of humans*. *J Formos Med Assoc*, 2009. **108**(7): p. 554-9.
- Nakamura K**, Yasunaga Y, Ko D, Xu LL, Moul JW, Peehl DM, Srivastava S, Rhim JS, *Cadmium-induced neoplastic transformation of human prostate epithelial cells*. *Int J Oncol*, 2002. **20**(3): p. 543-7.
- Ogunlewe JO** and Osegbe DN, *Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate*. *Cancer*, 1989. **63**(7): p. 1388-92.
- Waalkes MP**, Rehm S, *Cadmium and prostate cancer*. *J Toxicol Environ Health*, 1994. **43**(3): p. 251-69.
- Zhang LC**, Yu HN, Sun SL, Yang JG, He GQ, Ruan H, Shen SR, *Investigations of the cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate against PC-3 cells in the presence of Cd2+ in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(4): p. 953-60

Des mécanismes d'action cancérigènes ont été proposés classiquement tels que l'expression de gènes aberrants, l'inhibition de systèmes de réparation de l'ADN ainsi que l'induction de stress oxydant (Joseph, 2009). Golovine *et al* (2010) ont mis en évidence le fait que le cadmium diminue l'expression de la protéine XIAP (*X-linked Inhibitor Apoptosis Protein*) dans des cellules cancéreuses prostatiques.

De nombreuses études ont mis en évidence une association entre l'expression de la protéine XIAP et la cancérogenèse (Uren *et al*, 1999 ; Hofer-Warbinek *et al*, 2000 ; Yang *et al*, 2000 ; Eckelman *et al*, 2006 ; Schimmer *et al*, 2006). Une augmentation de l'expression de XIAP est reconnue dans de nombreux cancers notamment celui du cancer de la prostate (Berezovskaya *et al*, 2005 ; Nomura *et al*, 2005). La diminution de l'expression de XIAP, protéine régulée par le facteur de transcription NF- κ B (Stehlik *et al*, 1998), par le cadmium s'effectue au niveau post-transcriptionnel par des mécanismes médiés par le protéasome et indépendants de NF- κ B. L'inhibition de cette protéine dans des cellules cancéreuses induirait ainsi la mort cellulaire et/ou l'accélération de l'effet cytotoxique de chimiothérapies (Golovine *et al*, 2010). Leur étude a également révélé qu'un pré-traitement pendant 16 heures avec 30 μ M de cadmium suivi d'une stimulation en TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) (20 ng/mL) pendant 20 heures induisait une résistance à l'apoptose dans des cellules cancéreuses prostatiques PC3. On peut expliquer ce phénomène de résistance par l'augmentation de l'expression de métallothionéines en réponse d'un traitement au cadmium avec pour conséquence la chélation intracellulaire des ions cadmiques. Le complexe formé métallothionéines/cadmium n'est pas toxique. D'après l'étude de Lee (Lee *et al*, 2009), l'expression de métallothionéines dans l'hyperplasie bénigne de la prostate est trois à quatre fois plus importante que dans le cancer prostatique.

Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, Glinsky GV, *Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells*. *Cancer Res*, 2005. **65**(6): p. 2378-86.

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(10): p. 988-94.

Golovine K, Makhov P, Uzzo RG, Kutikov A, Kaplan DJ, Fox E, Kolenko VM, *Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF-kappaB-independent, proteasome-mediated mechanism*. *Mol Cancer*, 2010. **9**: p. 183.

Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J, de Martin R, *Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22064-8.

Joseph P, *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **238**(3): p. 272-9.

Lee JD, Wu SM, Lu LY, Yang YT, Jeng SY, *Cadmium concentration and metallothionein expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia of humans*. *J Formos Med Assoc*, 2009. **108**(7): p. 554-9.

Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, Mimata H, *Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells*. *Oncol Rep*, 2005. **14**(4): p. 993-7.

Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ, *Targeting XIAP for the treatment of malignancy*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(2): p. 179-88.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J, *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis*. *J Exp Med*, 1998. **188**(1): p. 211-6.

Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T, *Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(18): p. 10170-5.

Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD, *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli*. *Science*, 2000. **288**(5467): p. 874-7.

Cela signifie que de plus grandes concentrations de complexes métallothionéines/cadmium et de plus faibles concentrations de cadmium libre chez des patients atteints d'hyperplasie mènent à moins de toxicité de cadmium et de cancérisation que chez les patients présentant un cancer prostatique. De plus, l'adénome présente de plus hauts taux de cadmium que la prostate normale (*Suzuki et al, 1991*).

Un autre mécanisme d'action a été proposé lié au caractère perturbateur endocrinien du cadmium (*Lacorte et al, 2011*). Ce métal présente des activités délétères sur l'appareil reproducteur puisqu'il exerce des effets androgéniques et œstrogéniques en activant les récepteurs aux androgènes et aux œstrogènes après liaison au site actif endogène (*Stoica et al, 2000 ; Martin et al, 2002 ; Johnson et Wang, 2003 ; Prins, 2008 ; Byrne et al, 2009*). Ceci engendre une augmentation de l'expression des récepteurs aux androgènes après l'administration de cadmium. Cela suggère le fait que de faibles doses de cadmium peuvent mimer l'effet des androgènes dans les cellules épithéliales prostatiques et augmenter ainsi leur activité proliférative (*Lacorte et al, 2011*). Cette même équipe a d'autre part démontré qu'une exposition à de faibles concentrations et à court terme durant la puberté (étape biologique pendant laquelle la maturation et la croissance glandulaire sont importantes) peut induire des changements précoces dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'expression des récepteurs aux androgènes et l'organisation stromale de la prostate. Ces modifications seraient un facteur favorisant dans la survenue de lésions prostatiques au cours de la vie.

Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB. *Cadmium--a metallo hormone?* Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 266-71.

Johnson NP, Wang K. *Is ovarian surgery effective for androgenic symptoms of polycystic ovarian syndrome?* J Obstet Gynaecol, 2003. **23**(6): p. 599-606.

Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Felipe Pinheiro PF, Amorim RL, Felisbino SL. *Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates.* Microsc Res Tech, 2011.

Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, Lu J, Stoica EG, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, Stoica A. *Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity.* Endocrinology, 2002. **143**(1): p. 263-75.

Prins GS. *Endocrine disruptors and prostate cancer risk.* Endocr Relat Cancer, 2008. **15**(3): p. 649-56.

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB. *Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(4): p. 545-53.

Suzuki T, Umeyama T, Ohma C, Yamanaka H, Suzuki K, Nakajima K, Kimura M. *Immunohistochemical study of metallothionein in normal and benign prostatic hyperplasia of human prostate .* Prostate, 1991. **19**(1):35-42.

III. Effets du cadmium sur les enzymes de métabolisation des xénobiotiques

Alors que la toxicité du cadmium est connue depuis longtemps, son impact sur les systèmes de métabolisation n'a été recherché que depuis le début des années 2000 et cet effet a plus particulièrement été discuté dans le monde végétal et marin. C'est ainsi que l'inhibition de la Glutathion-S-Transférase par le cadmium a été observée chez la crevette (*Salazar-Medina et al, 2010*) et le ver marin (*Won et al, 2011*). *Bozcaarmutlu et Arinç (2007)* ont également montré un effet inhibiteur du cadmium sur la NADPH-cytochrome P450 réductase chez le poisson. Certaines études ont toutefois montré la complexité de l'influence du cadmium sur l'activité cytochrome P450 globale ou sur les différents isoformes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques.

Il semble que le cadmium en exposition chronique modifie les concentrations en cytochrome P450 et l'activité de la réductase au niveau rénal (*Plewka et al, 2004*). Cette même activité inhibitrice sur les enzymes oxydantes (aldéhyde oxydase, xanthine oxydase et monoamine oxydase) a été mise en évidence dans les tissus hépatiques et rénaux de rats exposés (*Asagba, 2010*).

Par contre, un effet inducteur a été plus souvent observé sur les isoformes du cytochrome P450. Plusieurs auteurs ont suivi les modifications au niveau du CYP1A1, enzyme hépatique et extra-hépatique régulée par la voie de signalisation du récepteur AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*). L'importance du CYP1A1 vient du fait qu'il a toujours été associé avec le métabolisme de composés pro-cancérigènes (*Maier et al, 2000; Vakharia et al, 2001*) en métabolites hautement cancérigènes. CYP1A1 est devenu un outil thérapeutique dans la bioactivation de prodrugs et tout particulièrement des agents cytotoxiques (*Anwar-Mohamed et al, 2009*).

Anwar-Mohamed A, Elbekai RH, El-Kadi AO, *Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009. **5**(5): p. 501-21.

Asagba SO, *Alteration in the activity of oxidative enzymes in the tissues of male Wistar albino rats exposed to cadmium*. Int J Occup Med Environ Health, 2010. **23**(1): p. 55-62.

Bozcaarmutlu A, Arinç E, *Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (Liza saliens)*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(3): p. 408-16.

Maier A, Dalton TP, Puga A. *Disruption of dioxin-inducible phase I and phase II gene expression patterns by cadmium, chromium, and arsenic*. Mol Carcinog, 2000. **28**(4): p. 225-35.

Plewka A, Plewka D, Nowaczyk G, Brzóska MM, Kamiński M, Moniuszko-Jakoniuk J, *Effects of chronic exposure to cadmium on renal cytochrome P450-dependent monoxygenase system in rats*. Arch Toxicol, 2004. **78**(4): p. 194-200.

Salazar-Medina AJ, García-Rico L, García-Orozco KD, Valenzuela-Soto E, Contreras-Vergara CA, Arreola R, Arvizu-Flores A, Sotelo-Mundo RR. *Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a mu-class glutathione S-transferase from shrimp Litopenaeus vannamei*. J Biochem Mol Toxicol, 2010. **24**(4): p. 218-22.

Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, Kaminsky LS, *Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(7): p. 999-1006.

Won EJ, Kim RO, Rhee JS, Park GS, Lee J, Shin KH, Lee YM, Lee JS, *Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, Perinereis nuntia*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2011. **154**(2): p. 82-92.

Le cadmium induit *in vitro* l'expression constitutive de l'ARNm de cet isoforme de manière dépendante du temps d'incubation aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel *via* l'activation d'AhR par un mécanisme indirect.

Par contre, l'activité du CYP1A1 est inhibée par le cadmium, la dégradation de la protéine intervenant par un mécanisme non encore élucidé qui serait indépendant du protéasome et dans lequel seraient impliquées les EROs et leur liaison au fer (Fe²⁺) de l'hème (*Elbekai et El-Kadi, 2007*). Des inductions au niveau des ARNm, de la protéine et de l'activité ont été rapportées pour CYP2A5, lors d'expositions aiguës chez la souris (*Abu-Bakar et al, 2004*). Enfin, un article-revue de 2010 de Rendic et Guengerich met en avant des travaux concernant l'effet du cadmium sur les CYPs 2A6, 2C9 et 2E1 (augmentation de l'expression de la protéine et de son activité) et sur les CYPs 2C8 et 2C19 (inhibition de l'expression de la protéine dans les microsomes hépatiques).

Il faut toutefois noter que des taux élevés de certaines isoformes de CYPs observées en parallèle d'une accumulation de cadmium peuvent parfois être la cause et non la conséquence d'une telle accumulation. Ces différents résultats émanent donc de travaux ponctuels menés le plus souvent *in vitro* (sur microsomes ou cellules hépatiques transformées) ou en exposition aiguë chez les rongeurs. L'effet du cadmium a, par contre, été étudié de façon plus exhaustive sur l'activité N-Acétyl-Transférase (NAT) aux niveaux moléculaire, cellulaire et *in vivo* chez la souris. Ces enzymes sont capables de détoxifier ou d'activer les amines aromatiques cancérigènes par N-acétylation (détoxification) ou O-acétylation des composés préalablement hydroxylés par les CYPs 1A1 ou 1A2 (activation en espèces électrophiles capables de se lier à l'ADN) (*Hein et al, 1988*). Une co-exposition environnementale par des amines aromatiques et le cadmium par exemple dans la fumée de cigarettes, justifie l'intérêt de connaître l'effet du métal sur cette enzyme. Plusieurs auteurs (*Apostolova et al, 2006 ; Huff et al, 2007 ; Glahn et al, 2008 ; Joseph, 2009*) ont montré l'effet inhibiteur du cadmium sur NAT-1 et NAT-2.

Abu-Bakar A, Satarug S, Marks GC, Lang MA, Moore MR. *Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2*. Toxicol Lett, 2004. **148**(3): p. 199-210.

Apostolova MD, Christova T, Templeton DM. *Involvement of gelsolin in cadmium-induced disruption of the mesangial cell cytoskeleton*. Toxicol Sci, 2006. **89**(2): p. 465-74.

Elbekai RH and El-Kadi AO. *Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium*. Toxicol Lett, 2007. **172**(3): p. 106-19.

Glahn F, Schmidt-Heck W, Zellmer S, Guthke R, Wiese J, Golka K, Hergenroder R, Degen GH, Lehmann T, Hermes M, Schormann W, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Gebhardt R, Hengstler JG, Foth H. *Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors*. Arch Toxicol, 2008. **82**(8):513-24.

Hein DW, Trinidad A, Yerokun T, Ferguson RJ, Kirilin WG, Weber WW. *Genetic control of acetyl coenzyme A-dependent arylamine N-acetyltransferase, hydrazine N-acetyltransferase, and N-hydroxy-arylamine O-acetyltransferase enzymes in C57BL/6J, A/J, AC57F1, and the rapid and slow acetylator A.B6 and B6.A congenic inbred mouse*. Drug Metab Dispos, 1988. **16**(3):341-7.

Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. *Cadmium-induced cancers in animals and in humans*. Int J Occup Environ Health, 2007. **13**(2): p. 202-12.

Joseph P. *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 272-9.

Rendic S, Guengerich FP. *Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters*. Curr Drug Metab, 2010. **11**(1): p. 4-84.

Cette inhibition médiée par la liaison du cadmium au résidu cystéine du site actif de l'enzyme, est irréversible et NAT-1 est plus facilement inhibée que NAT-2 (*Ragunathan et al, 2010*). De plus, le cadmium réagit plus rapidement avec NAT qu'avec GSH.

Toutes ces études montrent que l'effet du cadmium sur les EMX est le résultat de mécanismes complexes intervenant à différents niveaux des voies de régulation des EMX et des CYPs en particulier. L'existence de modifications post-transcriptionnelles voire post-traductionnelles pourrait plaider en faveur d'une régulation épigénétique induite par le cadmium. *Via* un effet inhibiteur sur les ADN méthyltransférases (*Poirier et Vlasova, 2002*), le cadmium pourrait modifier les niveaux de méthylation de l'ADN et ainsi intervenir sur l'expression des CYPs.

Poirier LA and Vlasova TI, *The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity*. Environ Health Perspect, 2002. 110(5): p. 793-5.

Ragunathan N, Dairou J, Sanfins E, Busi F, Noll C, Janel N, Dupret JM, Rodrigues-Lima F, *Cadmium alters the biotransformation of carcinogenic aromatic amines by arylamine N-acetyltransferase xenobiotic-metabolizing enzymes: molecular, cellular, and in vivo studies*. Environ Health Perspect, 2010. 118(12): p. 1685-91.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Objectifs du travail

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Sur la base de toutes les données bibliographiques présentées ci-dessus, les objectifs de ce travail de thèse ont été de trois ordres :

i) confirmer l'intérêt de la Phenstatine, y compris après sa métabolisation hépatique, sur la cible retenue à savoir la polymérisation de la tubuline d'où l'intérêt éventuel dans l'inhibition de la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses,

ii) identifier les différentes isoformes du cytochrome P450 impliquées de façon plus ou moins importante dans la métabolisation de ce chef de file et suivre leur évolution (au niveau du gène et de la protéine) sous l'effet d'un traitement par le cadmium,

iii) aborder une explication possible de l'activité épigénétique du cadmium en suivant la formation de microARNs pouvant être impliqués dans les changements post-transcriptionnels qui interviennent dans la synthèse de ces EMX.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériels et Méthodes

MATÉRIELS ET MÉTHODES**I. Evaluation pharmacologique de la Phenstatine et de ses métabolites**

La Phenstatine et ses métabolites potentiels nous ont été fournis par Alina Ghinet (HEI Lille) qui les a synthétisés dans le cadre de sa thèse de Doctorat ès Sciences du Médicament portant sur la conception de nouveaux inhibiteurs mixtes de la polymérisation de la tubuline et de l'activité ras-farnésyltransférase (*Ghinet et al, 2011*).

1. Mesure de l'inhibition de la polymérisation de la tubuline**1.1. Principe**

La capacité de polymérisation de la tubuline pour former *in vivo* des microtubules peut se traduire *in vitro* par une augmentation de l'absorbance d'une solution étalon de tubuline (à 340 nm). Afin d'évaluer le potentiel inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, des mesures spectrophotométriques ont donc été réalisées (sous la responsabilité du Docteur Jean Pommery). La polymérisation de la tubuline s'effectue en trois phases (*Fig. 28*), une phase lente de nucléation suivie d'une étape rapide de polymérisation, et d'une phase correspondant à un état stationnaire. Pour quantifier l'inhibition de polymérisation, on compare les $\Delta D.O.$ entre le premier et le deuxième plateau et, en testant différentes concentrations, on peut ainsi établir des CI_{50} c'est-à-dire déterminer la concentration de Phenstatine et de ses métabolites qui inhibe de 50 % la polymérisation de la tubuline.

Bien que ce test se réalise assez classiquement dans de nombreux laboratoires, il a nécessité une mise au point rigoureuse pour optimiser les conditions expérimentales. Il est nécessaire de contrôler rigoureusement la température, le pH de la solution tampon et nous avons de plus cherché à miniaturiser au maximum la manipulation.

1.2. Protocole

La polymérisation de la tubuline *in vitro* est suivie par turbidimétrie à une longueur d'onde de 340 nm. La Phenstatine et ses métabolites sont solubilisés dans le DMSO pour obtenir une concentration finale de 10^{-2} M. Chaque composé est déposé dans une micro-cuve en quartz (concentrations finales de 10^{-5} à 10^{-7} M), nous ajoutons la tubuline froide et nous homogénéisons très rapidement le mélange. La tubuline bovine lyophilisée (*Cytoskeleton Inc*) a été préalablement reprise dans un tampon contenant 1 mM de GTP, 80 mM de PIPES (pH 6,9), 2 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM d'EGTA et 5% de glycérol afin d'obtenir une concentration finale en tubuline de 5 mg/mL.

Ghinet A, Rigo B, Hénichart JP, Le Broc-Ryckewaert D, Pommery J, Pommery N, Thuru X, Quesnel B, Gautret P, *Synthesis and biological evaluation of phenstatin metabolites.* Bioorg Med Chem, 2011. 19(20): p. 6042-54.

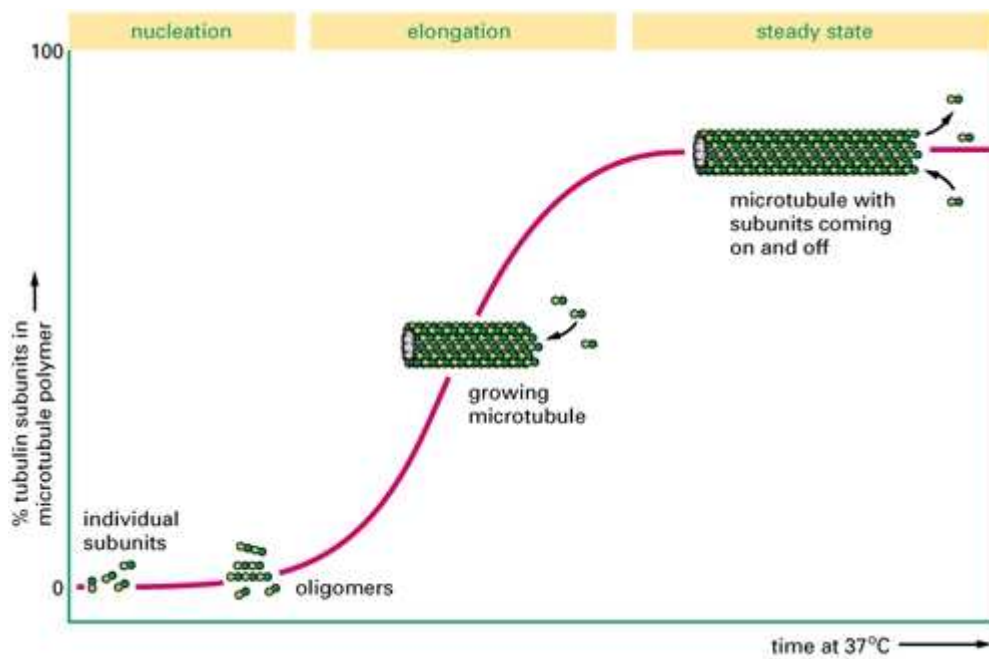


Fig. 28 : Etapes de polymérisation de la tubuline

Cette solution a été « aliquotée » avec les volumes nécessaires pour éviter des congélations/décongélations successives de la tubuline, qui perdrait alors ses capacités initiales à polymériser. Les « aliquots » sont congelés brutalement dans l'azote liquide puis conservés à -80°C ; ainsi la tubuline reste stable pendant 6 mois.

La polymérisation de la tubuline est ensuite évaluée par lecture des densités optiques (spectromètre UV-visible, *Helios Gamma*) toutes les 30 secondes à une longueur d'onde de 340 nm pendant 45 à 60 minutes à 37°C. Les CI_{50} sont ensuite calculées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism V4*. Les tests sont réalisés en triplicate pour chaque concentration.

2. Mesure de l'inhibition de la prolifération cellulaire

2.1. Modèles cellulaires utilisés

Pour rechercher l'activité de la Phenstatine (et de ses métabolites) et les modifications induites par le cadmium sur l'expression des gènes CYPs, nous avons dans un premier temps envisagé l'utilisation possible de plusieurs types cellulaires prostatiques :

- Lignée de cellules normales : RWPE-1
- Lignées de cellules cancéreuses hormono-indépendantes : PC3 et DU145
- Cellules en cultures primaires, issues de tissus tumoraux

Les cellules PC3 (isolées de métastases osseuses de carcinome prostatique humain ; *Kaighn et al, 1979*) et les cellules DU145 (issues de métastases du cerveau ; *Stone et al, 1978*), sont toutes deux représentatives du stade d'hormono-indépendance du cancer prostatique. Ces deux lignées sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI-1640 (*InVitrogen*) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF), et 2 mM de glutamine. Le milieu est tamponné à pH 7,4 par du bicarbonate de sodium à une concentration de 26 mM. Le milieu RPMI-1640 est également supplémenté en antibiotiques, streptomycine (100 µg/mL) et pénicilline (100 UI/mL). Les cellules RWPE-1 nécessitent un milieu plus complexe. On utilise un milieu PrEGM (*Prostate Epithelial Cell Growth Medium*) (*Clonetics®*) supplémenté en enzyme pituitaire bovine (BPE), insuline, hydrocortisone, EGF (*Epidermal Growth Factor*) humain, gentamicine/amphotéricine-B, acide rétinoïque, transferrine, triiodothyronine et épinéphrine.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)*. Int J Cancer, 1978. **21**(3): p. 274-81.

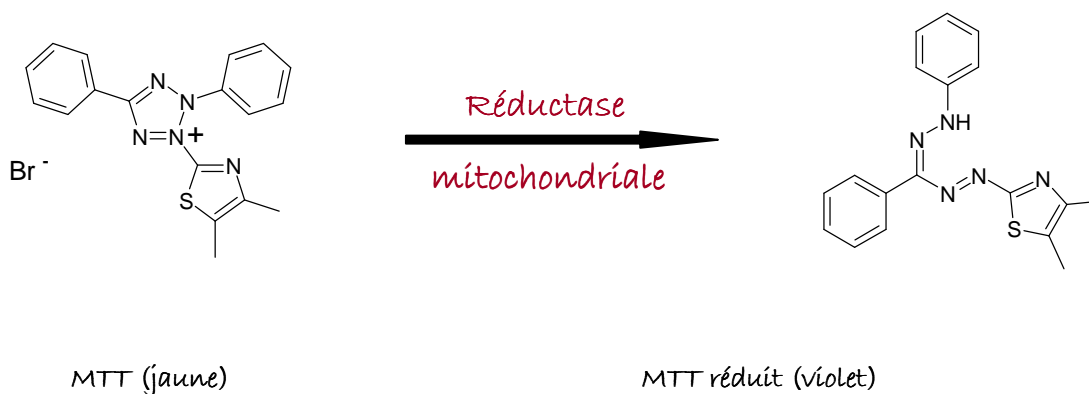
Les cultures primaires prostatiques ont été obtenues à partir de deux biopsies de tumeurs prélevées par le Pr. A. Villers (Service d'Urologie, CHRU Lille) et caractérisées par le Pr. X. Leroy (Tumorothèque CHRU-COL). Ces tissus ont été transférés, au bloc opératoire, dans un milieu de culture adéquat à la culture primaire contenant du milieu RPMI-1640 supplémenté en HEPES (20 mM), 5 % de SVF, streptomycine (100 µg/mL), pénicilline (100 UI/mL) et L-glutamine (2 mM). Les tissus sont rapidement dilacérés en pièces d'environ 1 mm³ à l'aide d'un scalpel dans ce même milieu. Ces tissus sont ensuite lavés deux fois au PBS 1X froid, puis incubés dans le milieu de culture précédent additionné de 0,5 mg/mL de collagénase de type Ia (*Sigma Aldrich*). La digestion à la collagénase est effectuée toute la nuit à 37°C sous agitation puis suivie par deux lavages au PBS 1X. Les tissus une fois digérés sont centrifugés à 2 000 rpm pendant 10 min. Le culot est lavé une fois au PBS 1X puis centrifugé à 700 rpm pendant 1 min afin d'éliminer les fibroblastes présents dans le surnageant. Le culot de cellules épithéliales est ensuite repris dans du milieu PrEGM (*Lonza*). Les cellules ainsi obtenues sont ensuite incubées dans des boîtes de culture de 25 cm² sous atmosphère humidifiée à 37°C avec 5 % de CO₂.

Pour des raisons d'ordre technique (vitesse de prolifération, accessibilité des prélèvements tissulaires...) ou de représentativité par rapport aux tissus *in vivo*, l'essentiel des résultats reportés dans ce manuscrit concerne les lignées PC3.

2.2. Test d'évaluation de la prolifération cellulaire

La mesure de la prolifération cellulaire s'effectue *via* la mesure de l'activité enzymatique de la succinyl deshydrogénase mitochondriale, enzyme active dans les cellules vivantes et pouvant cliver le MTT ou bromure de 3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium. Le MTT est un tétrazole de couleur jaune soluble dans l'eau, réduit en un dérivé formazan de couleur violette insoluble dans l'eau, dans les mitochondries des cellules vivantes. Les cristaux sont ensuite dissous avec une solution de dodécylsulfate de sodium (SDS) dans de l'acide chlorhydrique (SDS/HCl). L'absorbance de la solution colorée peut être quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm avec une correction à 630 nm.

A noter que cette réduction s'effectue uniquement lorsque les réductases mitochondriales sont actives, et par conséquent, cette conversion est liée au nombre de cellules vivantes (aucune concentration testée n'induit de mortalité cellulaire).



Les cellules sont ensemencées dans des microplaques de 96 puits (exemple : 2600 cellules par puits pour les PC3). Elles sont cultivées dans un milieu supplémenté de 10 % de SVF durant trois jours. Les cellules sont ensuite lavées au PBS avant l'ajout de milieu sans sérum qui leur permet d'entrer dans une phase de quiescence. Cette étape dure 24h. Les cellules sont alors traitées durant 72h avec les différents composés. Ceux-ci sont ici encore dissous dans du DMSO afin d'obtenir une solution mère à 10^{-2} M. Ces solutions sont ensuite diluées dans le milieu correspondant à chaque lignée, additionné de 10% de SVF, dans le but d'obtenir des concentrations finales à 10^{-5} M, 10^{-6} M et 10^{-7} M. Ces différentes dilutions sont effectuées afin d'obtenir une concentration de DMSO qui n'excède pas 1‰ et donc qui n'altère pas la croissance cellulaire. Une attention particulière est apportée à la solubilité des différents composés.

Après 72 h d'incubation, les cellules sont mises en présence de 80 μ L de milieu sans sérum et 20 μ L de MTT, dissous dans 4 mg/ml de PBS filtré sur un filtre de porosité 0,2 μ m. Au bout de 4h d'incubation à 37°C, les cristaux formés correspondant à la réduction du MTT sont dissous dans une solution de SDS/HCl (7g de SDS dans 1 mL d'acide chlorhydrique 0,01N). Après 18h à 37°C, on procède à une lecture des plaques au spectrophotomètre (*Biotek instruments inc, Elx 800*).

L'élévation de l'absorbance est le marqueur de la prolifération cellulaire. Les résultats sont exprimés en pourcentage de croissance et les valeurs obtenues sont ensuite rapportées au pourcentage de croissance du témoin (fixé à 100 %) ce qui permet d'en déduire les pourcentages d'inhibition de la prolifération cellulaire et ainsi de déterminer la CI_{50} du composé.

$$\frac{(A_J - A_{J_0}) \times 100}{A_{J_0}}$$

avec A : la valeur de l'absorbance

J₀ : le premier jour du traitement

J : le dernier jour du traitement

II. Etude *in vitro* de la métabolisation de la Phenstatine par des microsomes hépatiques de rat et humains

Différents modèles plus ou moins complexes peuvent être utilisés *in vitro* pour prévoir le métabolisme hépatique d'une molécule. Le choix d'un modèle est conditionné par la nature des enzymes d'intérêt, par la faisabilité technique liée entre autres au nombre de tests envisagés (nombre de composés, nombre de conditions expérimentales, durée des tests...). Nous avons résumé dans le *tableau 6* les avantages et limites des principaux modèles utilisables.

En complément de certains de ces modèles, il est possible d'utiliser des outils pharmacologiques capables d'« éteindre » plus ou moins spécifiquement certaines voies de métabolisation. Ces sondes pharmacologiques (inhibiteurs chimiques) ou immunochimiques (anticorps d'espèces variables) sont complémentaires de l'utilisation de supersomes avec laquelle on peut souvent obtenir des résultats faussés par l'absence de compétitivité entre les différentes isoformes (Lu *et al*, 2003). Toutefois, la seule utilisation d'inhibiteurs chimiques est impossible étant donné le peu de spécificité de la plupart de ces composés (Khojasteh *et al*, 2011).

En fonction de nos objectifs, nous avons retenu l'utilisation de microsomes pour suivre l'activité des cytochromes P450 dans la métabolisation de la Phenstatine et de ses métabolites. Les supersomes (microsomes préparés à partir de cellules d'insectes infectées par un baculovirus et contenant l'ADNc d'une isoforme CYP) et les inhibiteurs chimiques nous ont permis d'approcher l'identification des isoformes responsables de ces différentes voies de transformation.

Khojasteh SC, Prabhu S, Kenny JR, Halladay JS, Lu AY, *Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2011. **36**(1): p.1-16.

Lu AY, Wang RW, Lin JH, *Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(4): p. 345-50.

Méthodes d'étude	Avantages	Difficultés / Inconvénients
Micro-tranches hépatiques	-Préservation de l'architecture et des communications inter-cellulaires -Large panel d'enzymes (phases I et II)	-Obtention d'épaisseurs minimales et reproductibles -Diffusion dans l'ensemble des cellules -Pas de cryoconservation possible
<i>Cultures cellulaires</i>		
Hépatocytes en culture primaire	-Proches de l' <i>in vivo</i> -Ensemble des enzymes du métabolisme -Possibilité de réaliser des études d'interactions et d'inductions	- Durée limitée d'utilisation malgré différentes optimisations (DMSO, co-cultures...) sinon dé-différenciation (perte des activités métaboliques et d'inductibilité)
Lignées cellulaires hépatiques	-Culture facile -Concentration en EMX stable -Lignée HepaRG assez proche des hépatocytes (Fig. 29 ; Guillouzo et al, 2007)	-Profil enzymatique incomplet
Lignées cellulaires transgéniques	-Production de métabolites, études structurales et pharmacologiques à partir d'une seule enzyme	-Culture lente, délicate et onéreuse -Niveau d'expression faible
<i>Fractions sub-cellulaires (Fig. 30)</i>		
Microsomes hépatiques	-Enzymes membranaires (CYPs, UGTs) -Préparation facile -Souplesse d'utilisation	-Ajout de co-facteurs -Nécessité d'obtenir un pool de microsomes pour avoir une activité moyenne -Métabolisme quantitativement surestimé -Cryoconservation aisée
Fraction S9	-Enzymes microsomaux + enzymes cytosoliques -Réactions séquentielles possibles (Phase I / Phase II)	-Ajout de co-facteurs
Fraction cytosolique	-Etudes spécifiques des NATs, GSTs et sulfotransférases	-Ajout de co-substrats -Uniquement des transférases
<i>Enzymes recombinantes</i>		
Transfection des bactéries, levures, cellules d'insectes ou de mammifères (Kollock et al, 2009 ; Ikushiro et al, 2004 ; Crespi et al, 1997)	-Evaluation de l'activité des isoformes enzymatiques -Etude d'enzymes faiblement exprimées <i>in vivo</i> -Facilité d'utilisation	-Activités = fonction des cellules support (partenaire oxydo-réducteur, membrane lipidique...) -Difficulté d'extrapolation aux systèmes contenant plusieurs isoformes

Tableau 6 : Principaux modèles permettant les études de métabolisation

Crespi CL, Penman BW, Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions. Adv Pharmacol, 1997. 43: p. 171-88.

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C, The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. Chem Biol Interact, 2007. 168(1): p.66-73.

Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T, Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes. Biochim Biophys Acta, 2004. 1672(2): p. 86-92.

Kollock R, Rost K, Batke M, Glatt H, Effect of pentachlorophenol and 2,6-dichloro-4-nitrophenol on the activity of cDNA-expressed human alcohol and aldehyde dehydrogenases. Toxicol Lett, 2009. 191(2-3): p. 360-4.

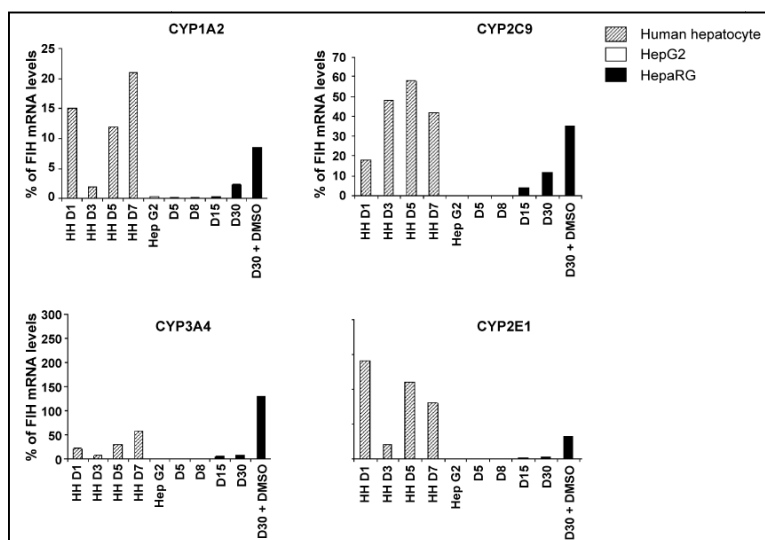


Fig. 29 : Expression des ARNm des CYPs 1A2, 2C9, 2E1 et 3A4 dans différents modèles de cellules hépatiques.

(D'après Guillouzo et al, 2007)

Les transcrits sont mesurés à partir d'un pool d'hépatocytes humains à différents temps de culture (1 à 7 jours), de cellules HepG2 confluentes et HepaRG à différents temps de culture et maintenues 15 jours en absence ou présence de 2% de DMSO.

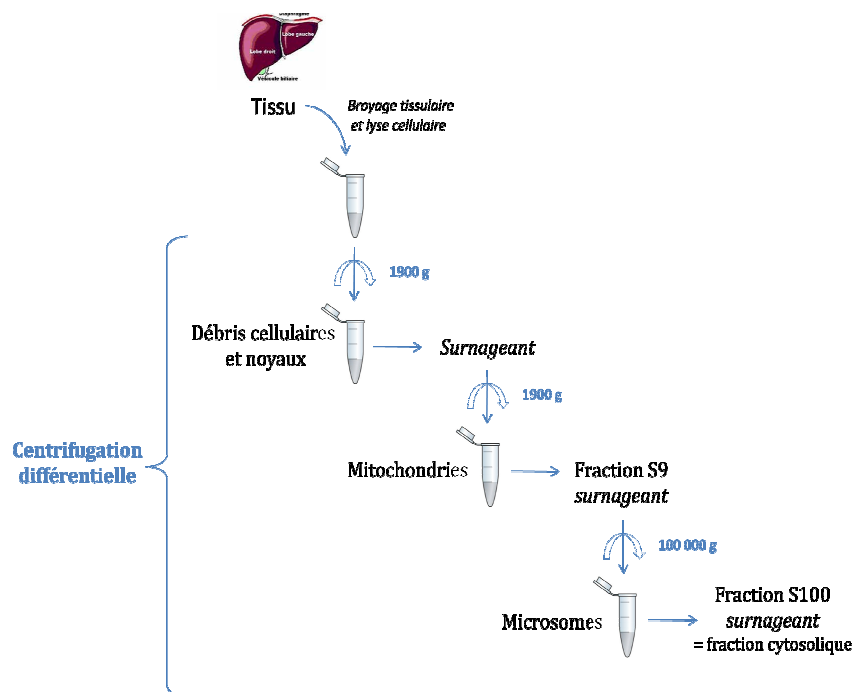


Fig. 30 : Préparation des fractions sub-cellulaires par ultracentrifugation différentielle

1. Incubation des microsomes hépatiques

Le milieu réactionnel initial est constitué d'un mélange contenant 0,4 mM NADPNa₂, 3,3 mM glucose 6-phosphate, 0,4 U/mL glucose 6-phosphate deshydrogenase et 1,3 mM MgCl₂ dans 0,1 M de tampon phosphate pH 7.4 contenant 1,5 mM Titriplex, 0,84 mg/mL de Tween 80 et 1 mM du composé étudié (Aprile *et al*, 2007). Le volume de ce milieu réactionnel est de 3 mL. L'incubation est démarrée par ajout d'1 mg/mL de suspension microsomale, et s'effectue à 37°C pendant 1 heure sous agitation. Les microsomes de rat et humains proviennent de *BD Biosciences* (Pont de Claix, France). Les microsomes humains ont un contenu protéique de 20 mg/mL et un taux de CYP 450 de 250 pmol/mg. Les microsomes de rat proviennent de l'espèce Sprague Dawley. Leur contenu en protéines est de 20 mg/mL et le taux de CYP 450 de 710 pmol/mg. L'incubat contrôle est réalisé dans les mêmes conditions, mais après avoir bouilli préalablement les microsomes à 100°C pendant 2 minutes.

2. Identification et quantification des métabolites

Les incubats sont extraits directement en utilisant le mélange chloroforme / acétate d'éthyle / isopropanol (45 : 45 : 10) puis centrifugés à 3 000 g pendant 3 min. La phase organique est évaporée sous un courant d'azote, le résidu sec est repris par 40 µl de phase mobile et 20 µl sont analysés à température ambiante par CLHP-UV (Waters 600 équipé d'un spectrophotomètre UV-Visible Waters 2487) dans les conditions suivantes :

- * Colonne Hypersil (C₁₈ ; 150 x 4,6 mm ; 5 µm)
- * Phase mobile : Eau / Méthanol (A / B)
- * Gradient d'élution :

Temps (min)	A (%)	B (%)
0	60	40
20	40	60
30	40	60

- * Débit : 1 ml.min⁻¹
- * Détection UV : $\lambda = 340$ ou 270 nm

Les résultats chromatographiques sont traités à l'aide du logiciel Empower.

Les éluats sont récupérés, concentrés à 3 ml sous *Rotavapor* avant l'analyse en CLHP/SM.

Après une première analyse en CLHP, à l'aide des métabolites potentiels synthétisés, la détermination des métabolites a été effectuée par Mr J.F. Wiart au laboratoire de toxicologie au Centre de Biologie et Pathologie de Lille par spectrométrie de masse grâce à l'appareillage *Acquity UPLC* (Waters). La séparation des différents métabolites a été effectuée sur une colonne HSS (*High Strength Silica*) C18 (150 x 2,1 mm ; 1,8 µm). La phase mobile (avec un débit de 4 mL/min) constituée d'un mélange de tampon formiate d'ammonium 50 mM (pH = 3) / acétonitrile (dans de l'acide formique 0,1 %), est distribuée en mode gradient linéaire pendant 10 minutes, de 13 à 95 % d'acétonitrile. La détection est effectuée par le détecteur de masse *Acquity TQ* (utilisé en mode simple masse). Quatre valeurs permettent d'obtenir quatre spectres de masse correspondants aux composés recherchés. L'ionisation a été réalisée en mode positif avec les conditions suivantes :

- * Electrospray capillaire à 1 kV
- * Quatre valeurs de voltage de cône (35, 50, 65 et 80 V)
- * Température source : 150°C
- * Température de désolvation : 350°C
- * Débit gazeux : 50 L/h
- * Débit gazeux de désolvation : 1000 L/h

Les spectres de masse ont été obtenus sur une gamme de m/z de 80 à 650

3. Identification des CYPs intervenant dans la métabolisation de la Phenstatine

3.1. Utilisation de supersomes (BD gentest, le Pont de Claix)

Les supersomes, issus de cellules d'insectes infectées au baculovirus de type BTI-TN-5B1-4 pour ceux exprimant les CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5 ou issus de cellules de type HI5 pour le CYP2C8, ont été co-exprimés avec un système enzymatique NADPH-CYP oxydoréductase.

Le protocole d'incubation retenu est celui proposé par BD Gentest. La Phenstatine est incubée à une concentration de 10 µM dans un tampon phosphate de potassium à un pH de 7,4 (concentration finale de 100 mM) et avec le système de régénération comprenant le cofacteur NADPH afin d'assurer l'activité des cytochromes P450. La réaction est initiée par l'ajout de

20 pmol de supersomes après 15 min de pré-incubation à 37°C sous-agitation. L'incubat reste sous agitation pendant 60 min et on effectue des prélèvements à 0, 5, 10, 20, 30, 40 et 60 minutes. De plus, dans le but de déterminer l'existence ou non de bruit de fond dans l'analyse chromatographique, nous avons effectué deux contrôles supplémentaires :

- * un premier essai avec la Phenstatine seule et le système régénérant NADPH
- * un deuxième essai avec les supersomes seuls et le système régénérant NADPH

Afin de pouvoir quantifier la réaction, nous avons introduit au moment de l'extraction, un standard interne à 0,5 µM, de structure proche de la Phenstatine mais n'interférant pas avec les pics correspondants aux métabolites. Le protocole de l'analyse chromatographique est ensuite identique à celui utilisé pour la métabolisation par les microsomes.

3.2. Utilisation d'inhibiteurs sélectifs des CYPs

La Phenstatine est incubée avec des microsomes hépatiques humains en présence de différents inhibiteurs (Tableau 7) des différents CYPs (Fig.31). Les inhibiteurs choisis et les concentrations utilisées ont été sélectionnés en fonction de la littérature.

CYP450	Inhibiteurs	Concentrations (mol.L ⁻¹)	Références
1A1	Ellipticine	10 ⁻⁴	
1A2	Furafylline	2.10 ⁻⁴	
2A6	Méthoxsalène	10 ⁻⁵	Xia <i>et al</i> , 2010
2B6	ThioTepa	2.10 ⁻⁵	Xia <i>et al</i> , 2010
2C8	Triméthoprim	10 ⁻⁴	
2C9	Sulfaphénazole	2.10 ⁻⁵	Xia <i>et al</i> , 2010
2C19	Fluconazole	10 ⁻⁴	
2D6	Quinidine	2.10 ⁻⁵	Xia <i>et al</i> , 2010
2E1	DDTC	5.10 ⁻⁵	Xia <i>et al</i> , 2010
3A4 et 3A5	Itraconazole	10 ⁻⁶	Tran <i>et al</i> , 2002

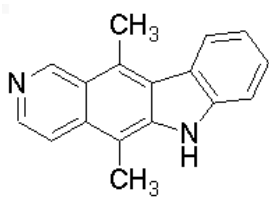
Tableau 7 : Liste des inhibiteurs choisis afin de déterminer les CYPs potentiels impliqués dans le métabolisme de la Phenstatine

En effet, les inhibiteurs ont été choisis selon leur sélectivité dépendant de la constante d'inhibition (K_i), correspondant à la concentration nécessaire pour inhiber l'enzyme. Les K_i correspondant à chaque enzyme sont répertoriés dans le tableau suivant (d'après Pelkonen *et al*, 2008) et ont été obtenus à partir des microsomes hépatiques humains (Tableau 8):

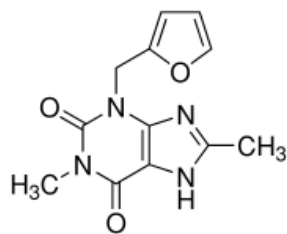
Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H, *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status*. Arch Toxicol, 2008. **82**(10): p. 667-715.

Tran TH, Von Moltke LL, Venkatakrishnan K, Granda BW, Gibbs MA, Obach RS, Harmatz JS, Greenblatt DJ, *Microsomal protein concentration modifies the apparent inhibitory potency of CYP3A inhibitors*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(12): p. 1441-5.

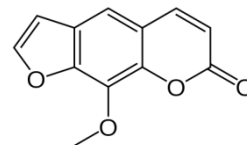
Xia B, Wang D, Fox LM, *Preclinical pharmacokinetics and metabolism of MNP001, a piperidine analog of 3-carbamyl compounds*. Biopharm Drug Dispos, 2011. **32**(1): p. 25-37.



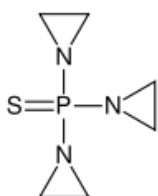
Ellipticine



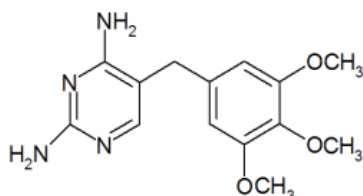
Furafylline



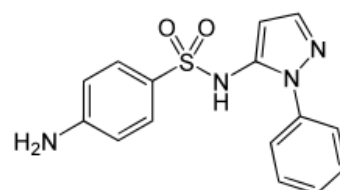
Méthoxsalène



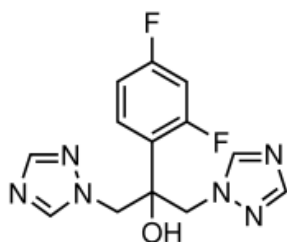
Thiotepa



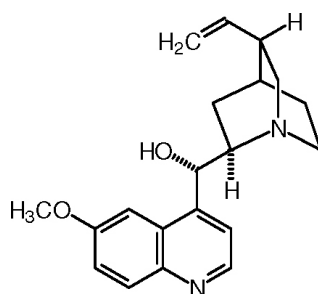
Triméthoprim



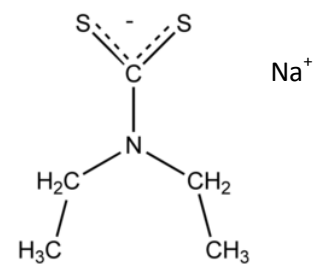
Sulfaphénazole



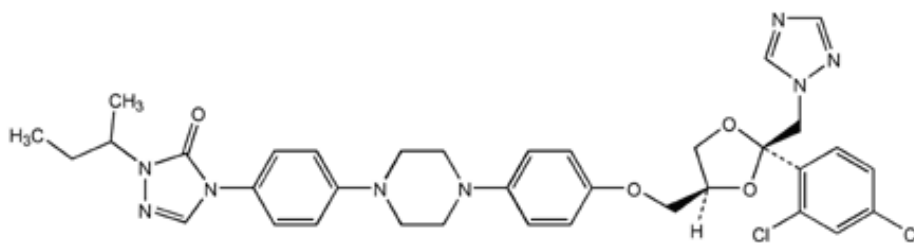
Fluconazole



Quinidine



Diéthylthiocarbamate (DDTC)



Itraconazole

Fig. 31 : Structures chimiques des inhibiteurs de CYPs sélectionnés dans notre étude

Enzymes	Inhibiteurs	K _i (µM)	Sélectivité
CYP1A1	Ellipticine	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
CYP1A2	Furafylline	0,6 – 0,7	Haute
CYP2A6	Méthoxsalène	0,2 – 0,8	Modérée
CYP2B6	ThioTEPA	2,8 – 3,8	Haute
CYP2C8	Triméthoprim	29 - 32	Haute
CYP2C9	Sulfaphénazole	0,3	Haute
CYP2C19	Fluconazole	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
CYP2D6	Quinidine	0,018 – 0,06	Bonne
CYP2E1	DDTC	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
CYP3A4/5	Itraconazole	0,013 – 0,27	Haute

n.d. : non déterminé

Tableau 8 : Présentation des K_i et sélectivité des inhibiteurs sélectionnés

Ces molécules sont des inhibiteurs sélectifs et non spécifiques comme le montre, pour certains, le tableau 9 (Khojasteh et al, 2011).

Les microsomes (1 mg/mL) sont incubés dans un tampon phosphate de potassium (pH 7,4) à une concentration finale de 100 mM contenant 1,5 mM de Titriplex/EDTA, 60 mM de bicarbonate de sodium, 0,6 mM de NADP disodique, 6,4 mM de Glucose-6-Phosphate, 1,5 U/mL de Glucose-6-Phosphate deshydrogénase et l'inhibiteur sélectif du CYP étudié (préalablement dissous dans l'eau sous ultra-sons). La réaction est initiée par l'ajout de 1 µM de Phenstatine après 15 min de pré-incubation à 37°C sous agitation. L'incubation reste sous agitation pendant 60 minutes et des prélèvements sont effectués à 0, 10, 20, 40 et 60 minutes.

Comme précédemment, nous avons introduit un standard interne, à la concentration de 5 µM. Dans le but de déterminer l'existence ou non de bruit de fond dans notre étude, nous avons également effectué deux contrôles supplémentaires :

- * un premier essai avec la phenstatine seule et le système régénérant NADPH
- * un deuxième essai avec l'inhibiteur de CYPs, les microsomes hépatiques et le système régénérant NADPH afin de s'assurer que les métabolites formés étaient bien issus de la biotransformation de la Phenstatine et non de l'inhibiteur d'intérêt.

Khojasteh SC, Prabhu S, Kenny JR, Halladay JS, Lu AY, *Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2011. 36(1): p.1-16.

Inhibitors	CYP1A2 (μM)	CYP2A6 (μM)	CYP2B6 (μM)	CYP2C8 (μM)	CYP2C9 (μM)	CYP2C19 (μM)	CYP2D6 (μM)	CYP3A (μM)
Furafylline	K_i : 0.6-0.73 ^a , 0.6 ^{b,c} , 15.6 ^d , 4.7 ^e K_i : 0.6 ^b , 3 ^f , 4 ^g , 0.8 ^h IC_{50} : 2, 2.9 ⁱ , 0.48 ^j , 1.76 ^k	IC_{50} : >1,000 ^l	IC_{50} : 519, >1,000 ^l	IC_{50} : >1,000 ^l	IC_{50} : >1,000 ^l	IC_{50} : 262, 983 ^l	IC_{50} : >1,000 ^l	IC_{50} : 138 ^l
Tranlycypromine	K_i : 4.7 ^m , 30, 25 ⁿ IC_{50} : 16.4 ^m , >100 ^o , >50 ^p	K_i : 0.02-0.2 ^q , 0.04, 0.05 ^q , 0.17 ^m , 0.2, 0.08 ⁿ IC_{50} : 0.895 ^k	K_i : 5, 210 ⁿ IC_{50} : 5.23 ^r	IC_{50} : 12 ^s , 35 ^p	K_i : 10, 30 ⁿ , 56 ^l , 15.8 ^m IC_{50} : 23.6 ^m , 38 ^p	K_i : 32 ^t , 8.7 ^u , 2.3 ^m , 15, 55 ⁿ , 8 ^q IC_{50} : 51 ^v , 9 ^p , 13.5 ^m	K_i : 4.3 ^m , 30, 35 ⁿ , 367 ^t IC_{50} : 41 ^p	K_i : 450, 280 ⁿ
2-Phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (PPP)	IC_{50} : >300 ^w	IC_{50} : >300 ^w	K_i : 1.2 ^x IC_{50} : 5.1 ^w , 2.02, 7.74 ^k K_i : 5.6 ^w , 1.2 ^x	IC_{50} : >300 ^w	IC_{50} : >300 ^w	IC_{50} : >300 ^w	IC_{50} : 74 ^w	IC_{50} : 200, >300 ^w
Montelukast	IC_{50} : 16 ^{aa}	IC_{50} : 11 ^{aa}	IC_{50} : 5.95 ^t , 11 ^{aa}	K_i : 0.0092, 0.019, 0.014, 0.15, 0.019, 0.11 ^s , 0.013 ^g IC_{50} : 0.00922, 0.0196 ^t , 0.022 ^s	K_i : 15 ^y IC_{50} : 1.2 ^{aa}	IC_{50} : 32 ^{aa}	IC_{50} : 11 ^{aa}	K_i : 200 ^y IC_{50} : 7.9 ^{aa} , 1.2 ^{aa}
Sulfaphenazole	IC_{50} : >1,000 ^l , >100 ^z , >50 ^p	IC_{50} : >1,000 ^l , >100 ^z , >50 ^p	IC_{50} : 144.6, 443.2, >1,000 ^l	K_i : 63 ^{ab} IC_{50} : 172, >1,000 ^l , >50 ^p	K_i : 0.3 ^z , 0.17, 0.18 ^{ac} , 0.5 ^{ad} , 0.5 ^{ae} , 0.12 ^{af} , 0.15 ^{ag} , 0.15 ^{ah} , 0.91 ^{ai} , 0.2 ^g IC_{50} : 0.169 ^k , 0.7 ^l , 0.8 ^z , 0.52 ^g , 1.5 ^{aj}	K_i : >100, 43.7 ^{ak} IC_{50} : >100 ^z , >50 ^p , 189 ^{ai} , 379, >1,000 ^l , 319, 370 ^{aj}	IC_{50} : >1,000 ^l , >100 ^z , >50 ^p	IC_{50} : >1,000 ^l , >100 ^z , >50 ^p
(-)-N-3-Benzylphenobarbital (NBP)	IC_{50} : >100 ^{al}	IC_{50} : >100 ^{al}	IC_{50} : 62 ^{al}	IC_{50} : 34 ^{al}	IC_{50} : 19 ^{al}	K_i : 0.079, 0.085 ^{am} , 0.12 ^{al} IC_{50} : 0.25 ^{al}	IC_{50} : >100 ^{al}	IC_{50} : 89 ^{al}
Quinidine	K_i : >80 ^f						K_i : 0.027-0.4 ^a , 0.00078-0.0038 ^{am} , 0.008, 0.14 ^{ao} , 0.03 ^{ah,ap,aq} , 0.026 ^{ar} , 0.05 ^g	K_i : 5.3, 14.9, 99 ^{aa}
Ketoconazole	K_i : 32 ^e IC_{50} : 433, 510 ^l , 11 ^{aj} , 13 ^z , 22 ^p , 60 ^j	K_i : 7, 24 ^q IC_{50} : >100 ^z , >50 ^p	K_i : 1.4 ^g IC_{50} : 3.2 ^t , 2.3 ^g	K_i : 11.8 ^{at} IC_{50} : 25 ^{aa} , 9 ^p	K_i : 7.9 ^{av} , 1.5-1.8 ^{ag} , 20 ^{aw} IC_{50} : 29 ^p , 13 ^z , 46 ^j	K_i : 6.9 ^{av} , 0.239 ^{ak} IC_{50} : 28 ^z , 27 ^p , 14.8 ^{ax}	K_i : 12 ^{av} , 49 ^{av} , 10.3 ^{az} IC_{50} : >1,000 ^l , 17 ^z , 33 ^p	K_i : 0.0037-0.18 ^t , 0.0478, 0.0368 ^{ba} , 0.046 ^{az,bb} , 0.1 ^{bc} , 0.11 ^{bd} , 0.0037 ^{bi} , 0.0054 ^{bc} , 0.05 ^{bf} , 0.045 ^{bg} , 0.0133, 0.0267 ^{bh} , 0.028 ^{bv}

Tableau 9 : Résumé des propriétés inhibitrices de quelques inhibiteurs chimiques sélectifs d'isoformes de cytochromes P450

(D'après Khojasteh et al, 2011)

III. Suivi de l'expression des gènes et des protéines correspondant aux CYPs impliqués dans la métabolisation de la Phenstatine

1. Détermination de l'expression protéique

1.1. Dosage de protéines

Le BCA Assay (*Pierce, Optima*) est un test colorimétrique basé sur la réduction, en milieu alcalin, des ions Cu^{2+} en ions Cu^+ par les liaisons peptidiques des protéines et la chélation avec une très forte spécificité de ces ions Cu^+ par le BCA (Acide bicinchoninique), d'où formation d'un complexe soluble coloré en violet. La réaction est mesurée par l'absorbance du complexe cuivrique à une longueur d'onde $\lambda = 570 \text{ nm}$, l'absorbance étant proportionnelle à la concentration protéique (la gamme de sensibilité étant de 20 à 2000 $\mu\text{g/mL}$).

Les échantillons sont traités selon les instructions du fournisseur et incubés 30 min à 37°C dans des plaques 96 puits.

1.2. Western blot

Les fractions protéiques obtenues à partir d'extraits cellulaires (30 μg de protéines) sont diluées dans 7.5 μl de tampon LDS (*Invitrogen*) et 3 μl d'agent réducteur (*Invitrogen*). Les échantillons sont chauffés 10 min à 70°C, refroidis, centrifugés puis déposés sur un gel de polyacrylamide 3-8 % Tris-Acétate (*Invitrogen*). La migration s'effectue pendant 1h à 150V.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 1h à 30V dans un tampon constitué de 5% de tampon de transfert 20X, 20% de méthanol et 1% d'antioxydant.

La membrane est saturée dans du tampon de base avec Tween additionné de lait à 5% pendant une heure. Elle est ensuite incubée 1h avec l'anticorps primaire dilué dans le tampon de base avec Tween. Après trois lavages de 15 min, la membrane est incubée une heure avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horseradish Peroxydase). La membrane est de nouveau lavée trois fois puis la révélation est effectuée par une technique de chemoluminescence, l'ECL+ (*Amersham*).

2. Détermination du profil d'expression des gènes

L'expression des gènes correspondant aux CYPs d'intérêt a été suivie dans des lignées cellulaires PC3 et DU145 et dans des échantillons de tissus prostatiques.

Cette étude a, en fait, été menée par une technique nous permettant d'étudier simultanément 380 gènes : TaqmanTM Low Density Arrays ou TLDA (*Applied Biosystems*). La sélection de ces 380 gènes candidats (*Annexe 1*) a été effectuée à partir d'une analyse minutieuse de la littérature et des banques de données disponibles. Ces gènes sont connus ou fortement suspectés de coder pour 220 enzymes du métabolisme des xénobiotiques (dont 146 enzymes de phase I et 74 enzymes de phase II), pour 114 protéines du transport des xénobiotiques [principalement des membres des familles ABC (*ATP-Binding Cassette*) et SLC (*Solute Carriers*)], ainsi que pour 46 facteurs ou co-facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'expression des gènes précédents. Dans un premier temps, seuls les gènes correspondant aux CYPs ont été analysés. Le profil d'expression de l'ensemble des gènes nous a par contre permis de choisir de travailler sur PC3, modèle cellulaire semblant être le plus proche des tissus tumoraux tout au moins pour ce qui concerne les EMX (*Annexe 2*).

Les échantillons de tissus prostatiques non pathologiques et tumoraux utilisés dans cette étude proviennent de pièces opératoires prélevées chez des patients atteints de cancer de la prostate et opérés dans le service d'Urologie du CHRU de Lille (Pr J. Biserte, Pr A. Villers). Les prélèvements sont effectués avec l'accord du comité d'évaluation scientifique de la tumorothèque CHRU/COL, plateau technique du Cancéropôle Nord-ouest, l'accord du Comité de Protection des Personnes et avec le consentement éclairé de chaque patient. Les prélèvements sont accompagnés de renseignements cliniques concernant l'âge, le sexe, les traitements médicamenteux, la consommation de tabac, les habitudes alimentaires, la profession, l'origine ethnique, le type histologique et le stade d'évolution de la maladie. Les modalités de prélèvement, transport et conservation des échantillons ont été mises en place de la manière suivante : les pièces opératoires collectées au décours de l'intervention chirurgicale sont transmises et caractérisées au service d'Anatomo- pathologie (Pr MC Copin responsable du Pôle de Pathologie et de la tumorothèque CHRU/COL ; Pr X Leroy, Dr D Buob, responsables de la collection urologique de la tumorothèque). Les fragments tissulaires nécessaires à l'étude sont alors préparés et immédiatement immergés dans une solution de stabilisation et de conservation des ARN (*RNAlaterTM*, Qiagen), puis, après 12h d'imprégnation à 4°C, sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

2.1. Extraction des ARNs totaux et détermination de leur qualité

L'homogénéisation tissulaire (30 mg de tissus) et la lyse cellulaire sont réalisées à l'aide d'un broyeur gentleMACS™ Dissociator en présence d'un mélange de thiocyanate de guanidium et de β -mercaptoéthanol (Qiagen). Les ARN totaux sont ensuite extraits à partir des différents prélèvements tissulaires (environ 100 mg de tissu) en utilisant le kit *RNeasy® fibrous Tissue Midi Kit* (Qiagen) ou à partir de cellules prostatiques normales ou cancéreuses en utilisant le kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen). Les ARN extraits sont recueillis après élution dans 30 μ l d'eau *RNase free* et stockés à -80°C.

La pureté des ARN est évaluée en utilisant le bioanalyseur Experion™ *RNA standard sens* (Biorad) par micro-électrophorèse capillaire. L'analyse de l'électrophérogramme, résultat obtenu en électrophorèse capillaire, permet de déterminer la quantité d'ARN par rapport à un ARN de référence, ainsi que la qualité de ce même ARN en déterminant l'aire des pics des ARN ribosomiaux 28S et 18S et la valeur du rapport des intensités des pics 28S/18S (Fig. 32). La qualité de l'ARN est déterminée par l'algorithme RQI (*RNA Quality Indicator*), pour notre étude, nous considérons qu'un ARN est exploitable lorsque le RQI est supérieur à 8 ($RQI_{max}=10$).

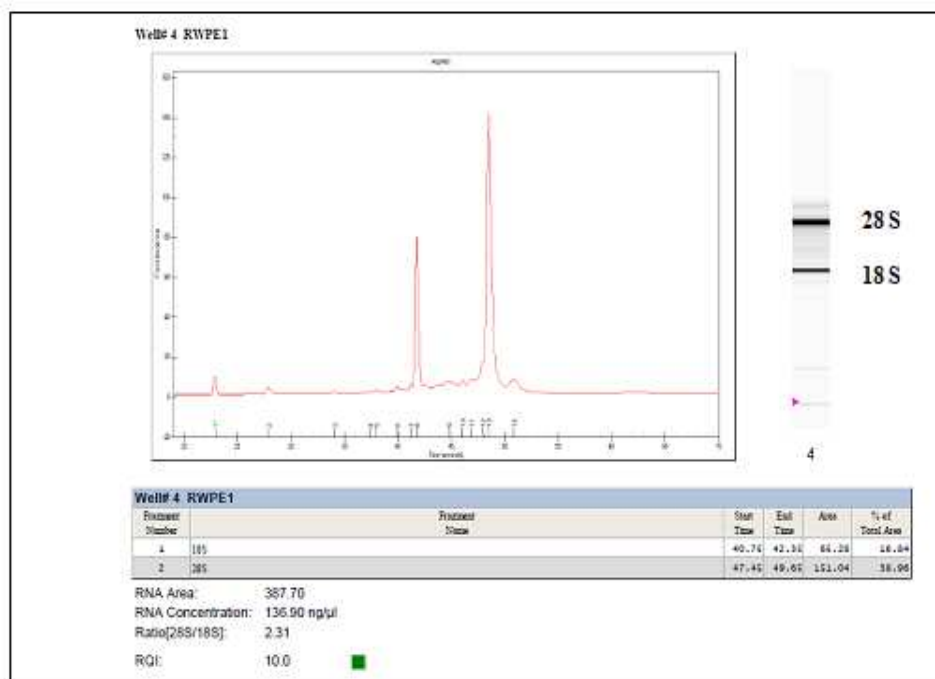


Fig. 32 : Exemple d'un électrophérogramme effectué avec le bioanalyseur Experion™ *RNA standard sens* (Biorad)

2.2. RT-PCR quantitative en temps réel

a. Rétro-transcription ou Transcription inverse

La rétro-transcription est réalisée sur les ARN totaux à l'aide du kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) dans un volume final de 20 µl obtenu par mélange de 10 µl d'une solution aqueuse contenant 2 µg d'ARN extrait et de 10 µl de *RT Master MixTM 2X* (Applied Biosystems) composé de 2 µl de *RT Buffer 10X*, 0,8 µl de dNTP (désoxynucléoside triphosphate) *Mix 25X*, 2 µl de *Random Primers 10X*, 1 µl de *Reverse Transcriptase*, 1 µl de *RNase Inhibitor* et 3,2 µl d'eau « *Rnase free* ».

La réaction de rétro-transcription s'effectue en trois étapes : une étape d'hybridation (10 min à 25°C) suivie d'une étape d'élongation (2h à 37°C) et d'une étape à 85°C pendant 5 secondes. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont alors stockés à -20°C.

b. PCR quantitative en temps réel sur TaqManTM Low Density Arrays

Les sondes et les amorces synthétisées et choisies par le fabricant (*Applied Biosystems*) pour éviter toute amplification d'ADN génomique contaminant (donc placées dans les régions codantes à la jonction exon-exon) génèrent des amplicons d'une taille comprise entre 60 et 110 paires de bases.

L'analyse de l'expression génique des gènes cibles est réalisée par la technique TaqmanTM Low Density Arrays ou TLDA (*Applied Biosystems*), une technique de PCR quantitative en temps réel sensible, qui est couplée à l'automate ABI PrismTM 7900HT *Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*).

Les TLDA, appelées également *Micro Fluidic CardTM*, conçues pour l'appareil ABI PrismTM 7900 HT, sont des microplaques de 384 puits comportant chacune 8 réservoirs afin de permettre le dépôt des échantillons d'ADNc (Fig. 33). Chaque puits contient une sonde MGB (*Minor Groove Binder*) TaqManTM et un couple d'amorces de PCR spécifiques d'un gène cible. De plus, afin de normaliser les résultats, chaque plaque contient des amorces spécifiques d'un gène de référence (« *housekeeping genes* ») qui est dans notre cas, le gène de l'ARN ribosomal 18S. Ces gènes ont pour avantage de donner une image de la quantité de matrice (ADNc) apportée afin d'être présent en quantité constante dans tous les échantillons et de normaliser les biais d'extraction et de contamination par des inhibiteurs (ADN) et les variations d'efficacité de transcription inverse.

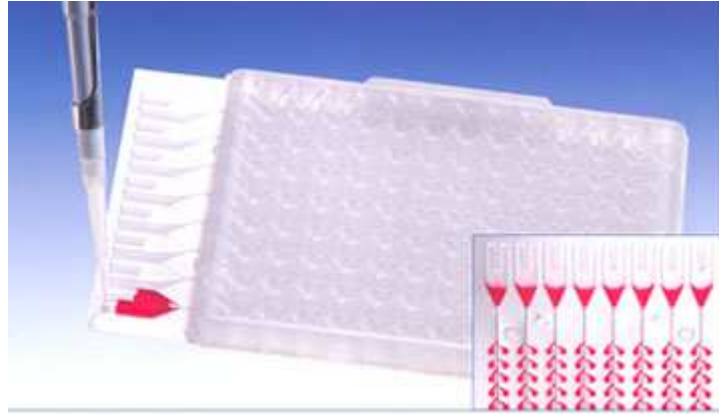


Fig. 33 : Microplaques de 384 puits comportant les 8 réservoirs de dépôt

* Principe de la qPCR en utilisant les sondes TaqManTM (Fig. 34)

Les sondes MGB TaqManTM comprennent un fluorochrome *reporter* à leur extrémité 5' et un *quencher* non fluorescent à leur extrémité 3' associé à une molécule MGB ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN. Le principe de détection en temps réel est le même que pour les sondes TaqManTM classiques. L'introduction d'une molécule MGB augmente la température de fusion (T_m) de la sonde et stabilise son interaction avec la matrice d'ADN ce qui permet de dessiner des sondes de plus petites tailles (12 à 20 nucléotides au lieu de 25 à 30 pour les sondes classiques). Les sondes de type MGB permettent d'éviter au maximum les désappariements et favorisent également le *quenching* puisque ces sondes sont plus courtes. Ces caractéristiques permettent ainsi d'augmenter à la fois la spécificité et la sensibilité de la technique.

Comme pour la PCR, on utilise deux amorces (une amorce sens et une amorce anti-sens) nécessaires à l'amplification de l'ADN. Pour la PCR en temps réel, on ajoute, en même temps que les amorces, une sonde *TaqManTM*, complémentaire d'une séquence interne du fragment d'ADN à amplifier située entre les deux amorces (appariement de la sonde et des deux amorces au cours de l'étape d'*hybridation*). A son extrémité 5' se trouve un fluorochrome *Reporter* (R) et à son extrémité 3' se trouve un groupement *Quencher* (Q). Lorsque le fluorochrome et le *Quencher* sont proches, la fluorescence est absorbée par le *Quencher*. Durant l'étape d'*élongation* de la PCR, il y aura séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléasique de la polymérase thermostable. Il y aura alors émission d'un signal de fluorescence car le fluorochrome s'éloigne du groupement *Quencher*.

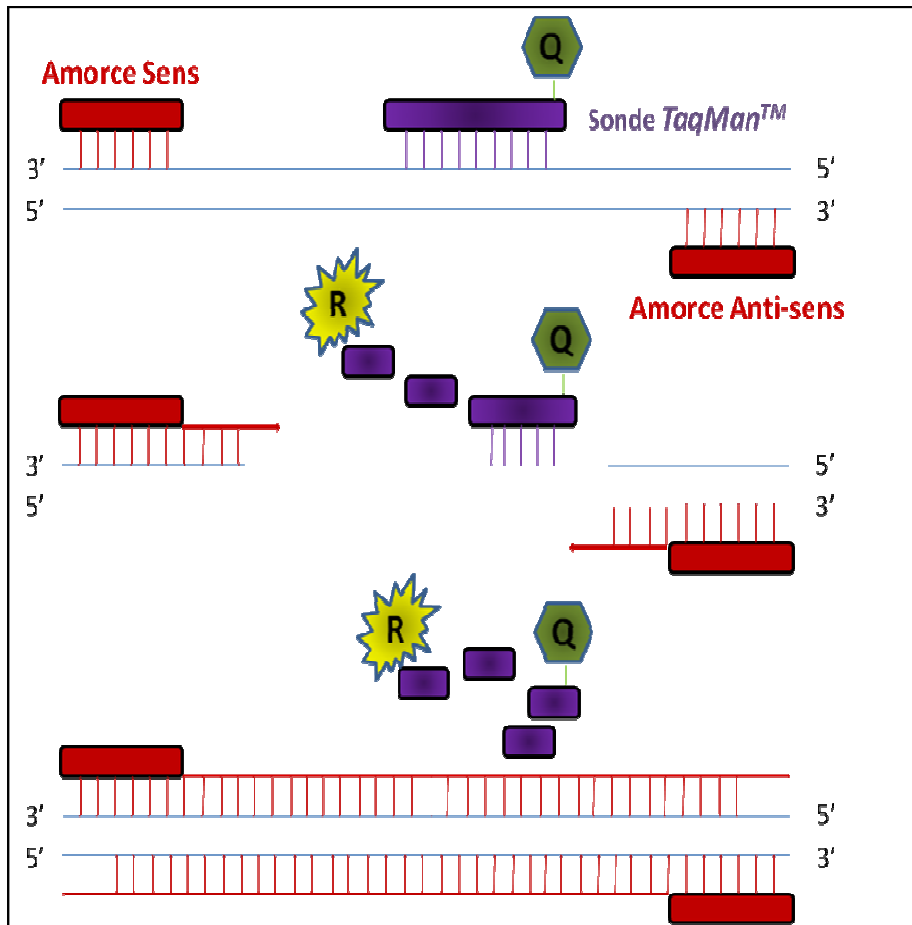


Fig. 34 : Principe de la PCR quantitative en temps réel en utilisant des sondes *TaqMan*TM
 (R = Reporter et Q = Quencher)

L'intensité de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié au cours de la réaction de PCR. On peut suivre ainsi l'amplification de la séquence cible après chaque cycle, d'où le terme de "PCR en temps réel".

Le système ABI PrismTM 7900 HT est un appareil de PCR quantitative en temps réel qui est composé d'un thermocycleur et d'un module de détection fluorimétrique, pilotés par une station de travail informatique permettant l'acquisition, le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement. L'amplification, au sein des puits de la microplaque, est mesurée à l'aide d'un module de détection fluorimétrique composé d'une source lumineuse d'excitation (laser argon 480-560 nm) et d'un système de détection de la fluorescence émise (caméra CCD-*Charged Coupled Device*).

* Protocole

Les plaques comportent 8 réservoirs permettant ainsi de déposer dans chacune 100 µl d'un mélange contenant 5 µl d'ADNc obtenu par RT-PCR (correspondant à environ 100 ng d'ADNc), 45 µl d'eau dépourvue de nucléases et 50 µl de *TaqManTM Universal PCR Master mix (2X)* du fournisseur *Applied Biosystems*. Ce mélange contient deux enzymes, l'*AmpliTaq GoldTM ADN polymerase* et l'*AmpErase[®] Uracil N-glycosylase (UNG)*, référence permettant la normalisation du signal de fluorescence, et un mélange de dNTP contenant du dUTP au lieu du dTTP (pour l'expression génique). Une fois les dépôts effectués, les microplaques sont centrifugées deux fois 1 minute à 1200 rpm afin que les solutions déposées dans les réservoirs soient distribuées dans les 384 puits. Les cupules sont ensuite individualisées par un passage dans le scelleur de plaque, évitant ainsi d'éventuelles fuites entre les différentes cupules.

La réaction d'amplification s'effectue après une décontamination de 2 minutes à 50°C par l'enzyme Uracile N-glycosylase (*AmpEraseTM UNG*). La PCR se réalise en trois étapes : une étape de 10 minutes à 94,5°C, étape préliminaire des cycles de PCR, suivie d'une étape de dénaturation (30 secondes à 97°C) et d'une étape d'hybridation/élongation à 59,7°C pendant 1 minute, et ceci pendant 40 cycles.

2.3. Quantification de l'expression des gènes sélectionnés

Le niveau d'expression des différents gènes a été déterminé de manière relative par rapport à un gène de référence endogène.

La quantification des ARNm présents dans les différentes cellules prostatiques traitées ou non au cadmium a été réalisée par la méthode comparative des cycles seuil ou encore

appelées Ct (*Cycle threshold*). Le cycle seuil correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence d'émission du fluorochrome statistiquement et significativement différent du bruit de fond. Le Ct correspond à la quantité de gènes cibles présents initialement dans l'échantillon. L'expression des 380 gènes est mesurée par comparaison des Ct. Pour cela, on effectue une normalisation du gène par rapport au gène contrôle (18S) en calculant le $\Delta\Delta Ct$ (avec $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{standard}}$ et $\Delta Ct = Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$). De plus, la variation du nombre de copies (CNV) de gènes cibles est calculée par la relation mathématique : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

IV. Identification de microARNs exprimés lors d'un traitement au cadmium

1. Extraction des microARNs et détermination de leur qualité

Les microARNs ont été extraits à partir de cellules cancéreuses prostatiques PC3 traitées ou non au cadmium en utilisant le kit *miRNeasy® Mini Kit* (Qiagen). Les miARNs extraits sont recueillis et élués dans 30 μl d'eau *RNase free* et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

La concentration des microARNs est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre de type Nanodrop (Labtech) afin de connaître s'il est nécessaire d'effectuer une préamplification des ADNc obtenus après rétro-transcription, c'est-à-dire si la quantité de microARNs est inférieure à 350 ng.

2. RT-PCR quantitative en temps réel

2.1. Rétro-transcription ou Transcription inverse

Afin d'effectuer la rétro-transcription sur les microARNs, nous avons utilisé le kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* et des amorces *Primers* (*Applied Biosystems, Courtaboeuf, France*) dans un volume final de 7,5 μl obtenu par mélange de 3 μl de miARNs extrait et de 4,5 μl de *RT Reaction Mix™* (*Applied Biosystems*) composé de 0,8 μl de *Megaplex™ RT Primers 10X*, de 0,2 μl de dNTPs avec du dTTP (100 mM), de 1,5 μl de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (50 U/ μL), de 0,8 μl de *RT Buffer 10X*, de 0,9 μl de MgCl_2 (25 mM), de 0,1 μl de *RNase Inhibitor* (20 U/ μL), et 0,2 μl d'eau « *Rnase free* ».

La réaction de rétro-transcription s'effectue sur 40 cycles comprenant trois étapes : une étape d'hybridation (2 min à 16°C) suivie d'une étape d'élongation (1 min à 42°C) et d'une

étape d'1 s à 50°C. Ces 40 cycles sont ensuite suivis d'une étape à 85°C pendant 5 minutes. Les ADN complémentaires (ADNc) obtenus sont alors stockés à -20°C.

2.2. PCR quantitative en temps réel sur TaqMan™ Low Density Arrays

Dans le cas de la détermination de l'expression des miARNs, nous avons déposé dans les 8 réservoirs 0,6 µl d'ADNc, 45 µl *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* sans AmpErase® UNG et 44 µl d'eau « *RNase free* ». Les gènes de référence utilisés sont les miARNs hsa-let-7d et RNU44.

3. **Quantification de l'expression des microARNs sélectionnés**

La détermination de l'expression des 700 microARNs (*Annexe 3*) obtenus après traitement des cellules PC3 au cadmium a été réalisée de la même manière que celle effectuée pour établir le profil d'expression génique de ces mêmes lignées.

Afin d'effectuer l'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la métabolisation ainsi que l'expression des microARNs dans la lignée cancéreuse prostatique humaine PC3 traitées ou non au cadmium, nous avons utilisé deux logiciels SDS 2.4 Software et RQ Manager (*Applied Biosystems*).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Résultats

RÉSULTATS

I. Evaluation pharmacologique de la Phenstatine et de ses métabolites

1. Inhibitions de la polymérisation de la tubuline et de la prolifération cellulaire

Dans nos conditions expérimentales, la Phenstatine inhibe la polymérisation de la tubuline avec une CI_{50} de $15,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Cette valeur est voisine de celle obtenue dans les mêmes conditions avec la CA-4 qui est de $9,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$. Nos résultats sur la Phenstatine sont proches de ceux retrouvés dans la littérature (Romagnoli *et al*, 2005 et 2006 ; Alvarez *et al*, 2007).

L'activité de cet inhibiteur a ensuite été testée sur différents modèles de cellules prostatiques :

Inhibition de la prolifération cellulaire (CI_{50} en μM)			
PC3	DU145	RWPE-1	Culture primaire de cellules cancéreuses ^(a)
$2,8 \pm 1,3$	$9,0 \pm 1,7$	$2,9 \pm 0,3$	$4,0 \pm 1,0$

^(a) moyenne de deux tests faits sur deux biopsies de tumeurs prostatiques

2. Etude du métabolisme de la Phenstatine

2.1. Identification des métabolites formés par incubation de la Phenstatine avec les microsomes hépatiques (Le Broc *et al*, 2011)

a. Analyse en LC/UV des incubats de microsomes hépatiques de rats et humains

L'analyse en LC/UV des incubats de microsomes hépatiques (Fig. 35) de rats et humains en présence de Phenstatine a révélé la présence d'au moins neuf métabolites (M1-M9) qui n'ont pas été observés dans les incubats contrôles avec les microsomes bouillis ou sans le système régénérant NADPH.

Alvarez C, Alvarez R, Corchete P, Pérez-Melero C, Peláez R, Medarde M, *Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: naphthylphenstatins*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. 17(12): p.3417-20.

Le Broc-Ryckewaert D, Pommery N, Pommery J, Ghinet A, Farce A, Wiart JF, Gautret P, Rigo B, Hénichart JP, *In vitro Metabolism of Phenstatin: Potential Pharmacological Consequences*. Drug Metab Lett, 2011. 5(3): p. 209-15.

Romagnoli R, Baraldi PG, Jung MK, Iaconinoto MA, Carrion MD, Remusat V, Preti D, Tabrizi MA, Francesca F, De Clercq E, Balzarini J, Hamel E, *Synthesis and preliminary biological evaluation of new anti-tubulin agents containing different benzoheterocycles*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. 15(18): p. 4048-52.

Romagnoli R, Baraldi PG, Pavani MG, Tabrizi MA, Preti D, Fruttarolo F, Piccagalli L, Jung MK, Hamel E, Borgatti M, Gambari R, *Synthesis and biological evaluation of 2-amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-5-aryl thiophenes as a new class of potent antitubulin agents*. J Med Chem, 2006. 49(13): p.3906-15.

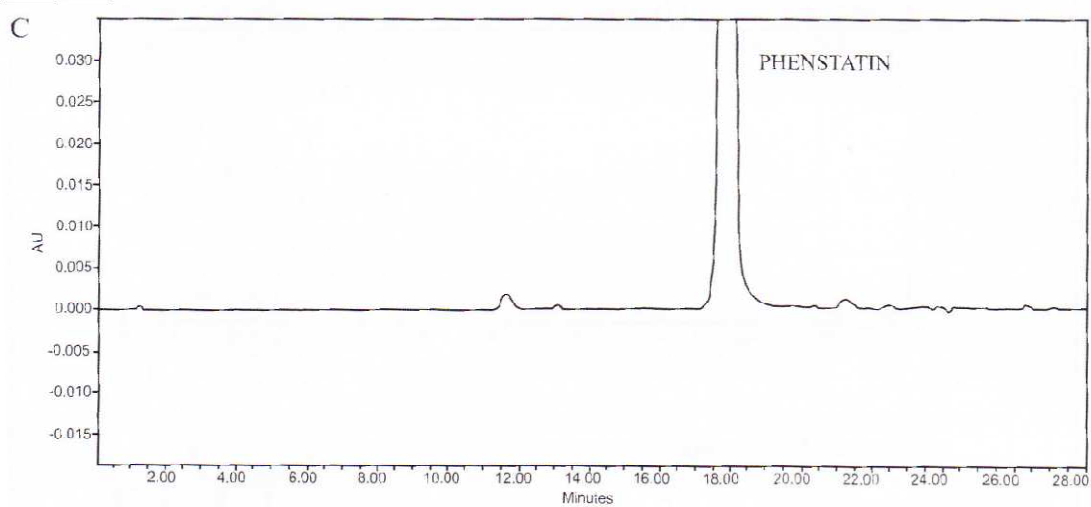
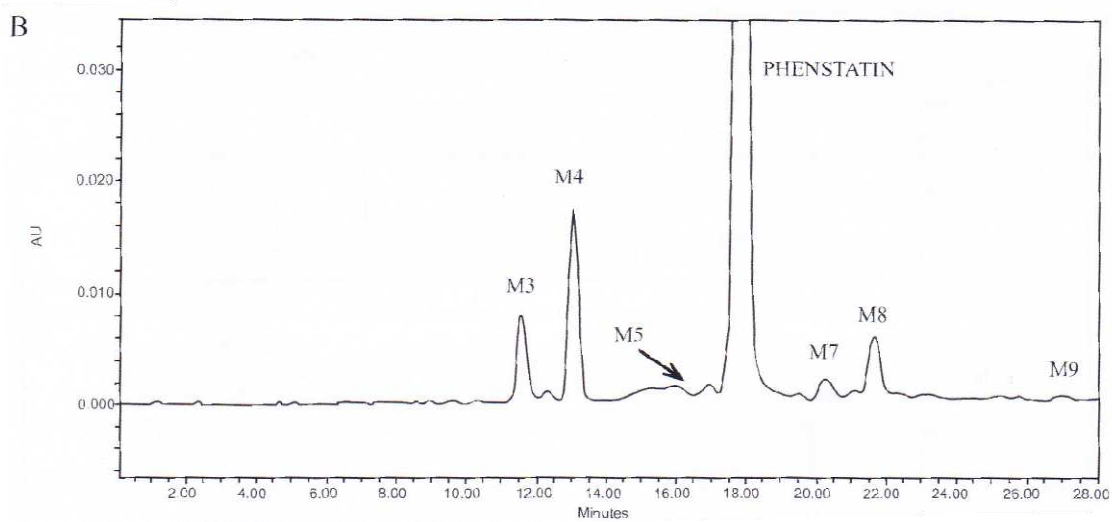
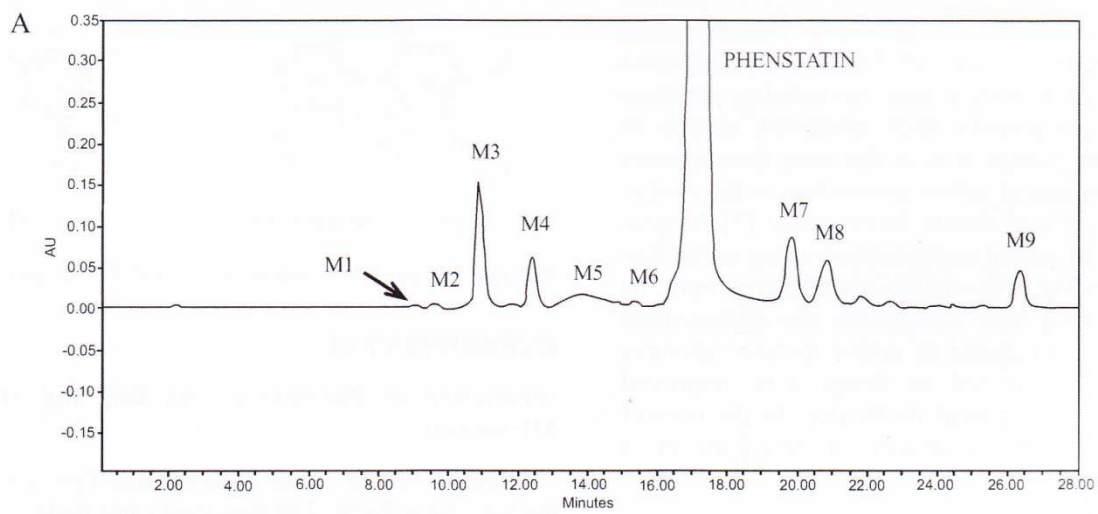


Fig. 35 : Analyse par LC-UV du métabolisme de la Phenstatine par des microsomes hépatiques de rats (A), humains (B) et par des microsomes hépatiques bouillis (C)

Après incubation et extraction par le mélange chloroforme / acétate d'éthyle / isopropanol, les échantillons ont tout d'abord été analysés en CLHP pour observer et quantifier la formation des métabolites.

De légères différences existent entre les deux espèces au niveau du taux de Phenstatine métabolisée et des proportions des métabolites issus de la biotransformation de ce composé. Après une incubation de 60 minutes, nous avons obtenu 6,2 % et 11,3 % de métabolisme respectivement avec les microsomes de rats et humains. Il est à noter que dans les mêmes conditions d'incubation, la Combrétastatine-A4 est beaucoup moins stable. En une heure, 60 % de la CA-4 de configuration *cis* et 80 % de la CA-4 de configuration *trans* sont métabolisés.

Une analyse quantitative a ainsi été effectuée par LC/UV (Tableau 10). Cette analyse montre également que la quantité de **M1** est trois fois plus importante avec la Phenstatine incubée avec les microsomes humains que de rats avec respectivement 24,12 nmol/mg et 8,23 nmol/mg. Cependant, la quantité de métabolite **M2** est six fois plus importante dans l'incubat avec les microsomes de rats (0,02 nmol/mg chez l'humain contre 0,12 nmol/mg chez le rat). Les métabolites **M6**, **M8** et **M9** n'ont pas pu être quantifiés par LC/UV puisque **M6** est dans l' "épaulement" du pic de la Phenstatine, **M8** est sous l'influence de diverses interférences et **M9** n'a pas été identifié par LC/UV.

Pour faciliter la quantification, les mesures ont dû être réalisées à une longueur d'onde de 340 nm (valeur d'absorbance maximale de la phenstatine) et de 270 nm (valeur d'absorbance maximale des benzhydroles) (Fig. 36). La Phenstatine et les métabolites **M2**, **M3**, **M4**, **M5**, **M6**, **M7** et **M9** (benzophénones) sont convenablement détectés à 340 nm, alors que **M1** et **M8** (benzhydroles) sont observés de façon optimale à 270 nm.

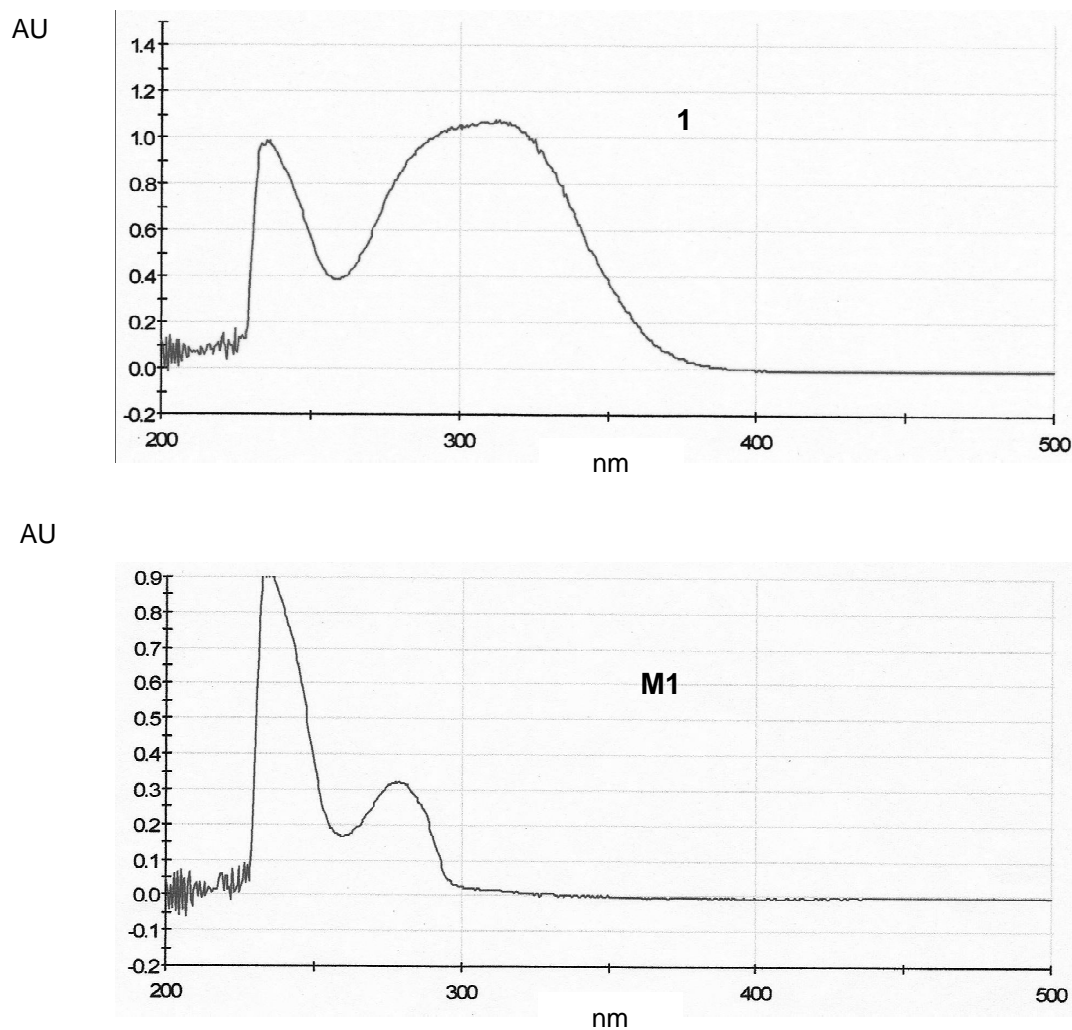


Fig. 36 : Spectre UV de la Phenstatine **1** et du benzhydrol **M1**

b. Analyse en LC-ESI-MS des incubats de microsomes hépatiques de rats et humains

A partir de ce qui est connu dans la littérature concernant les métabolites obtenus après incubation de la Combrétastatine-A4 dans des microsomes hépatiques, nous avons pu émettre l'hypothèse que ces métabolites résultaient de quatre voies de métabolisation : ○ la O-déméthylation, ◇ la O-méthylation, ◻ l'hydroxylation aromatique suivie d'une O-méthylation et ⊙ la réduction du carbonyle, les symboles indiquant la place et le type de réactions métaboliques (Tableau 10).

La détermination des structures des métabolites présents dans les incubats a été confirmée en spectrométrie de masse (Tableau 11). Les analyses en LC-ESI-MS des incubats microsomaux ont montré que parmi les molécules synthétisées, trois composés dans les microsomes hépatiques humains et quatre composés dans ceux de rats montrent les mêmes propriétés chromatographiques et les mêmes spectres de masse que les métabolites **M2**, **M3**,

		Quantification des metabolites de la phenstatine (10 ⁻⁹ mol/mg de protéine microsomale)	
		rat	humain
Phenstatine			
M1		8,23	24,12
M2		0,12	0,02
M3		2,71	0,68
M4		4,42	5,21
M5		<i>non quantifié</i>	0,18
M6		<i>non quantifié</i>	<i>non déterminé</i>
M7		0,55	0,45
M8		<i>non quantifié</i>	<i>non déterminé</i>

Tableau 10 : Structure et évaluation quantitative des métabolites de la Phenstatine

M4 et particulièrement **M8** qui n'a pas été quantifié par LC/UV. Ces analyses (Fig. 37) ont été effectuées avec un m/z de 305 permettant ainsi la détection de **M3** [(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl) (3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthanone] et **M4** [(3-hydroxy-4,5-diméthoxyphényl) (3-hydroxy-4-méthoxyphényl) méthanone].

La même analyse réalisée avec un m/z de 335 (Fig. 37) permet la détection de **M2** [(3-hydroxy-2,4-diméthoxyphényl) (4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl) méthanone] et de **M8** [(3,4-diméthoxyphényl) (3,4,5-triméthoxyphényl) méthanol]. **M1** (5-[hydroxyl (3,4,5-triméthoxyphényl) méthyl]-2-méthoxyphénol) et **M7** (3,4-diméthoxyphényl) (3,4,5-triméthoxyphényl) méthanone) n'ont pas été détectés en LC-ESI-MS, ceci étant peut-être dû à une possible transformation en **M8**. Les analyses avec un m/z de 319 et 349 n'ont pas permis de détecter **M5** (3,4-diméthoxyphényl)(4-hydroxy-3,5-diméthoxyphényl) méthanone) et **M6** (3-hydroxy-2,4-diméthoxyphényl)-(3,4,5-triméthoxyphényl) méthanone), sans doute à cause d'un problème de sensibilité. Néanmoins, les propriétés chromatographiques observées à 340 et 270 nm, ainsi que les résultats publiés par Aprile *et al* concernant l'identification des structures des métabolites de la CA-4 nous ont permis de déterminer de la même manière les structures des métabolites **M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 et M8** (Annexe 4).

Poids moléculaire	Pic de corrélation	MS [M + H] ⁺	Fragment d'ion
318	Phenstatine	319	151-195
320	M1	321	153-197
334	M2	335	181
304	M3	305	181-151
304	M4	305	151-181
318	M5	319	165-181
348	M6	349	181
332	M7	333	165-195
334	M8	335	167-197

Tableau 11 : Résultats LC-ESI-MS en mode ion positif obtenus pour les métabolites M1 à M8 de la Phenstatine

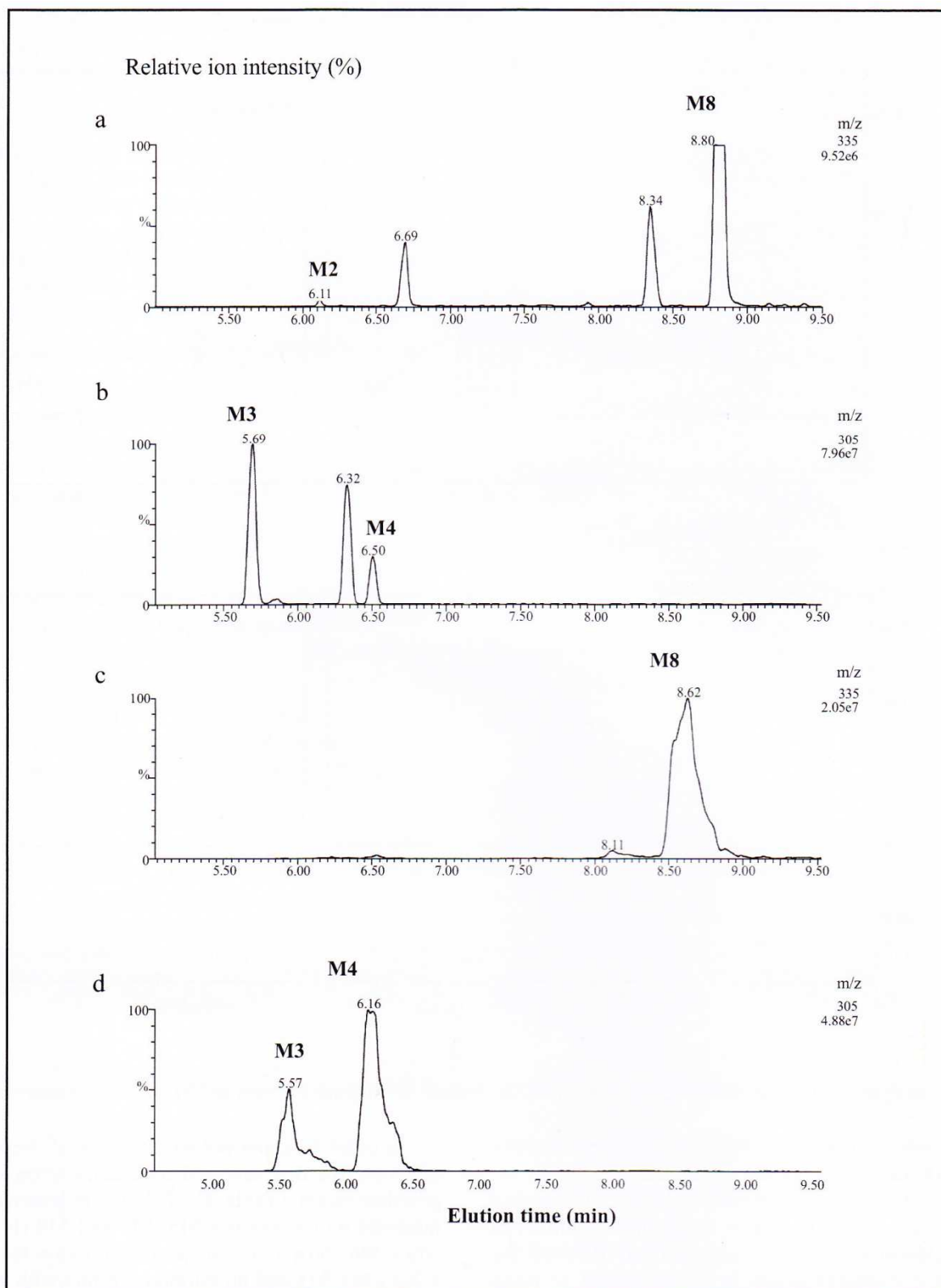


Fig. 37 : Analyse par LC-ESI-MS des principaux métabolites de la Phenstatine produits par les microsomes hépatiques de rats (a, b) et d'humains (c, d). LC-ESI-MS en mode ion positif : m/z 335 (a,c) et m/z 305 (b,d).

2.2. Evaluation pharmacologique des métabolites

a. Etude sur la polymérisation de la tubuline

Afin de déterminer l'activité de ces composés sur leur cible biologique, nous avons étudié l'effet *in vitro* des différents métabolites de la Phenstatine identifiés sur l'inhibition de la polymérisation de la tubuline (Tableau 12). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes avec la déviation standard calculée à partir de deux (a) ou quatre (b) tests séparés.

Aucun effet n'a été observé sur l'inhibition de la polymérisation de la tubuline avec les composés **M5**, **M7** et **M8** ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$) contrairement à la molécule **M6**, où nous obtenons une activité d'inhibition de la polymérisation de la tubuline significativement meilleure que celle mesurée avec la Phenstatine ($CI_{50} = 3,2 \mu\text{M}$). **M1** n'a que peu d'effet inhibiteur avec une CI_{50} de $73,4 \mu\text{M}$ alors que **M2**, **M3** et **M4** présentent des activités similaires à la Phenstatine avec des CI_{50} respectives de $14,9$; $15,9$ et $14,2 \mu\text{M}$.

b. Etude sur la prolifération cellulaire

Les résultats, obtenus sur l'inhibition de la polymérisation de la tubuline pour ces métabolites sont à corrélés à ceux obtenus sur l'inhibition de la prolifération cellulaire sur la lignée PC3 *via* le test MTT. Les métabolites portant différents substituants sur les cycles A et B montrent des activités variables sur les cellules cancéreuses prostatiques PC3 avec des valeurs de CI_{50} de l'ordre du micromolaire (Tableau 12). **M2**, **M3** et **M4**, avec respectivement des valeurs de CI_{50} de $9,4$; $8,7$ et $6,5 \mu\text{M}$, gardent une activité correcte malgré l'absence du groupement méthoxy au niveau des carbones 3 ou 5 du cycle A. Ceci va à l'encontre de certaines affirmations rencontrées dans la littérature. L'O-méthylation du carbone 3' du cycle B (**M5**, **M7** et **M8**) induit une perte d'activité importante ($CI_{50} > 10 \mu\text{M}$, concentration pour laquelle aucune activité n'a été détectée). De même, la réduction du groupement carbonyle (**M1** et **M8**) diminue l'activité sur la polymérisation de la tubuline et la prolifération cellulaire. L'O-méthylation sur le carbone 2' du cycle B (**M6**), jamais décrit dans la littérature, induit une activité plus importante *in vitro* que la Phenstatine.

Nous avons, par la suite, comparé les résultats obtenus sur les PC3 à ceux obtenus sur des cultures primaires issues de deux biopsies tumorales humaines, prélevées et caractérisées au CHRU de Lille. Cette expérimentation nous a permis de nous rapprocher au mieux de l'*in vivo*. Les résultats sur l'efficacité de la Phenstatine et ses métabolites sur les deux cultures primaires sont répertoriés dans le Tableau 13. Après analyse de ces résultats, nous avons constaté qu'il existait des différences de réponse aux différents traitements. En effet, les

		Inhibition de la polymérisation de la tubuline (a), CI50 (µM)	Inhibition de la prolifération cellulaire (b), CI50 (µM)
Phenstatine		15,0 ± 0,2	2,8 ± 1,3
M1		73,4 ± 1,3	10,4 ± 3,8
M2		14,9 ± 0,9	9,4 ± 2,5
M3		15,9 ± 0,3	8,7 ± 1,8
M4		14,2 ± 0,3	6,5 ± 1,9
M5		>100	>10
M6		3,2 ± 0,2	2,3 ± 1,6
M7		>100	>10
M8		>100	>10

Tableau 12 : Activité des métabolites sur la polymérisation de la tubuline et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques PC3 (déviations standard calculées à partir de 2 (a) ou 4 (b) tests séparés)

composés **M2**, **M3** et **M7** ont des activités similaires sur les deux patients alors que les métabolites **M1** et **M8** présentent une meilleure efficacité pour les cellules provenant du patient 1017127. **M6** montre une fois de plus sa très bonne efficacité bien supérieure à la Phenstatine. D'une manière globale, les métabolites ont des effets plus probants sur des cellules issues de biopsies que sur les PC3 :

CI ₅₀ (μM)									
Patients	Phenstatine	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
1017127	5,1	1,9	2,7	1,9	> 10	> 10	< 0,1	2,6	1,5
1016409	3,0	> 10	4,9	3,1	> 10	> 10	2,5	3,6	6,7
PC3	2,8	10,4	9,4	8,7	6,5	> 10	2,3	> 10	> 10

Tableau 13 : Etude de la cytotoxicité de la Phenstatine et de ses métabolites sur des cellules tumorales prostatiques issues de biopsies

Les patients 1017127 et 1016409 ne répondent pas de la même manière aux métabolites **M1** et **M6**. En effet, ces composés montrent une plus grande activité sur l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales issues du patient 1017127. Après étude des profils d'expression génique de ces patients par la technique du TLDA, nous avons pu remarquer que le patient 1016409 présentait une surexpression des CYPs 2A6, 2A7, 2B6, 2C8, 2D6 et 2E1 respectivement 84, 4, 14, 16, 2 et 3 fois supérieure, mais également une sous-expression pour les CYPs 2C18 et 3A5 respectivement 12 et 2 fois plus réprimés. Les différents niveaux d'expression des CYPs cités précédemment pourraient être une première explication au vu des résultats obtenus chez les deux patients. Il ne faut néanmoins pas négliger le fait que d'autres systèmes de régulation soient également engagés dans ces différentes réponses pharmacologiques.

c. Apport de la modélisation moléculaire

Les activités cellulaires obtenues sont en accord avec les prédictions faites en modélisation moléculaire (Docteur Amaury Farce, Laboratoire de Chimie Thérapeutique) qui semblent fournir des explications sur l'activité inhibitrice de ces composés. Afin d'expliquer la meilleure activité de **M4** vis-à-vis de **M1** et **M7**, des simulations de "docking" avec ces composés ont été recherchées dans le site de liaison de la colchicine de la tubuline en utilisant le logiciel *GOLD Software* (Fig. 38). Ces résultats suggèrent que **M4** présente une conformation stable et interagit par un pont hydrogène avec un groupement phénol du cycle B et la Val181 dans le site actif (c). Le métabolite **M1** présente un centre assymétrique et les

deux énantiomères ont été caractérisés. La configuration R de **M1** (a) va se loger dans le site actif et la modélisation révèle la même interaction entre le groupement phénolique libre et la Val181 de la colchicine. Cependant, nous n'avons pas obtenu les mêmes résultats avec la configuration S de **M1** (b) puisque ce composé se lie au site actif par les ponts hydrogène entre le groupement méthoxy en position 3 sur le cycle A et Asn101. Le métabolite **M7** (d) ne se loge pas correctement dans le site de la colchicine et ceci peut rendre compte de la faible activité de ce composé en tant qu'inhibiteur de la polymérisation de la tubuline.

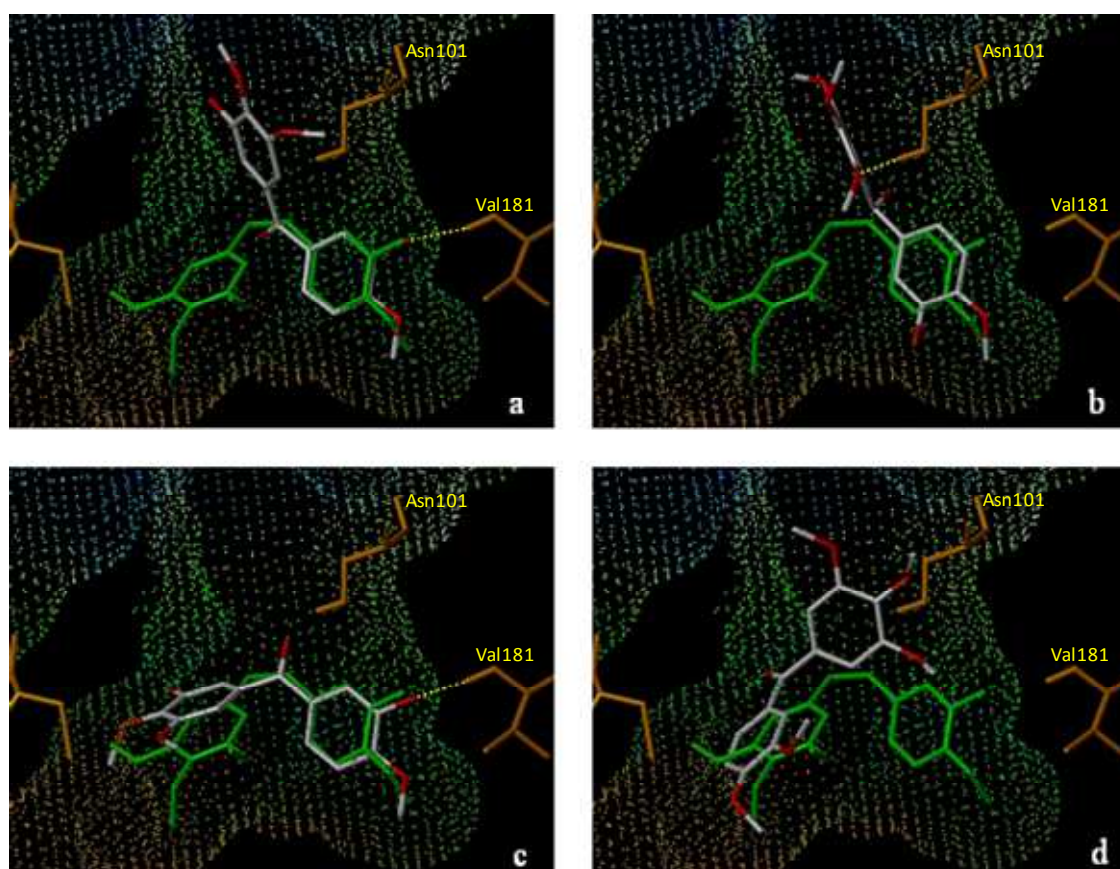


Fig. 38 : Mode de liaison de **M1** [(a): configuration R; (b): configuration S], **M4** (c) et **M7** (d) dans le site colchicine de la tubuline et superposition de la Combretastatine A-4 (vert)

II. Identification des CYPs intervenant dans le métabolisme de la Phenstatine

Afin de déterminer les cytochromes P450 engagés dans le métabolisme de notre molécule d'intérêt, nous avons dans un premier temps voulu discriminer les CYPs permettant cette biotransformation par l'utilisation de protéines recombinantes en système hétérologue, les supersomes. Puis, dans un second temps, nous avons voulu connaître si certains CYPs

pouvaient agir conjointement et ainsi induire la formation des métabolites précédemment identifiés, en inhibant sélectivement un par un les CYPs les plus probablement impliqués.

1. Par l'utilisation de supersomes

Après incubation de la Phenstatine avec des supersomes exprimant les cytochromes P450 CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C19, 2C8, 2C9, 2D6, 2E1, 3A4 et 3A5, seuls ceux exprimant les CYPs 1A1, 1A2 et 2C19 ont montré une activité intéressante. En effet, ces trois CYPs sont capables de métaboliser la Phenstatine en cinq métabolites : **M3**, **M4**, **M5**, **M7** et **M8**.

Après analyse des résultats, nous avons pu constater que le CYP1A1 induisait la formation de cinq métabolites (**M3** et **M5**) et dans une moindre mesure, **M4**, **M7** et **M8** (Fig. 39).

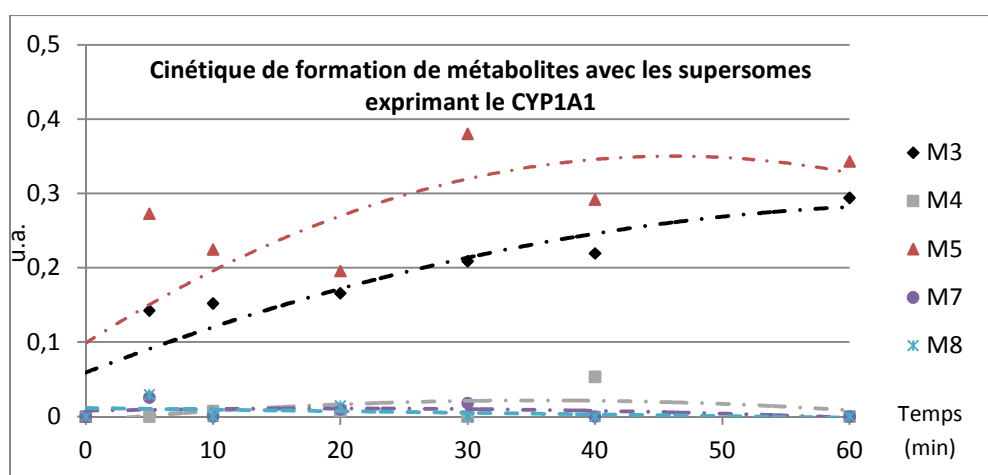


Fig. 39 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

Le CYP1A2 semble impliqué dans la production des métabolites **M3**, **M4** et **M8** (Fig. 40) et le CYP2C19, les métabolites **M3** et **M5** (Fig. 41).

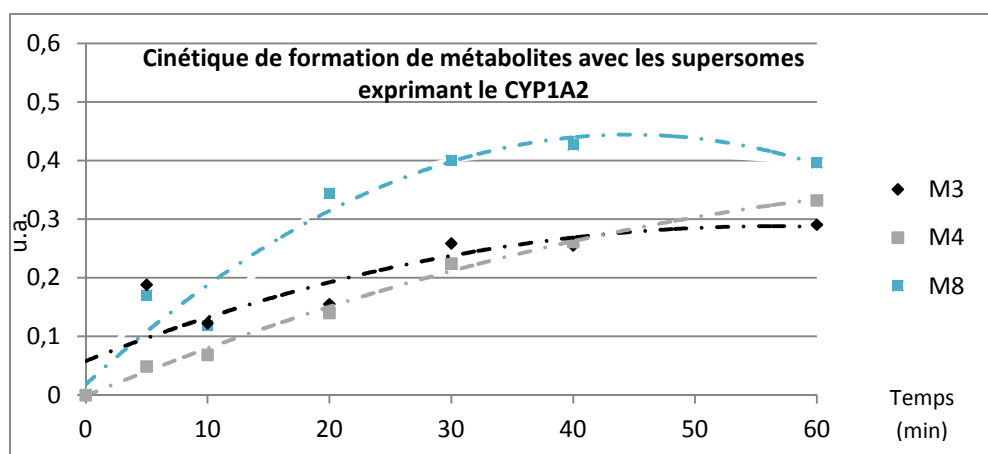


Fig. 40 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

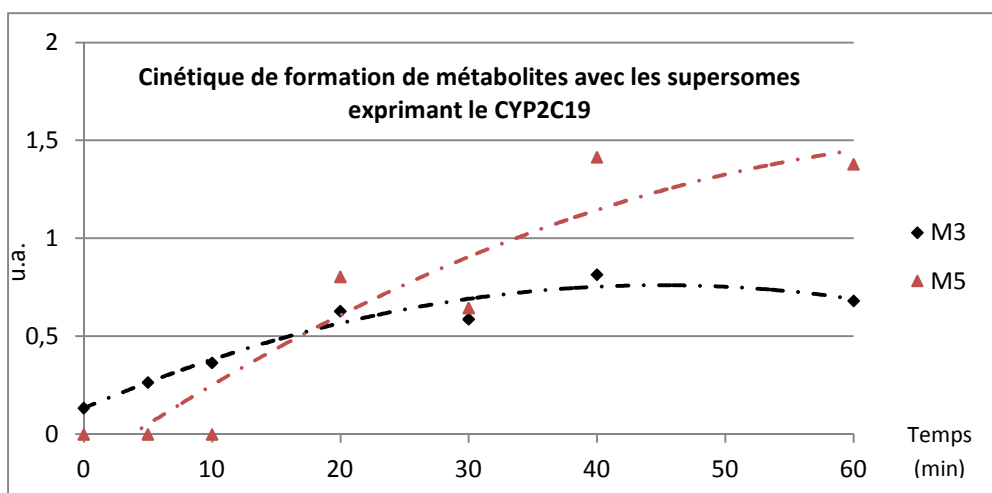


Fig. 41 : Etude cinétique de la formation des métabolites issus de la Phenstatine

D'une manière générale, les métabolites **M3** et **M5** se forment en plus grande quantité que les métabolites **M4**, **M7** et **M8**. Ainsi, CYP1A1 a tendance à induire une O-déméthylation sur le cycle A de la Phenstatine (**M3**, **M4** et **M5**), une O-méthylation sur le cycle B (**M5** et **M7**) ainsi qu'une réduction du carbonyl (**M8**). Le CYP1A2, quant à lui, engendre une O-déméthylation sur le cycle A pour former **M3** et **M4** et également une réduction du carbonyl (**M8**). Enfin, le CYP2C19 va induire la formation de **M3** et **M5** par le biais d'une O-déméthylation sur le cycle A et d'une O-méthylation sur le cycle B.

Cependant, ces différents CYPs ne sont sans doute pas les seuls enzymes métaboliques à être capables de biotransformer la molécule d'intérêt puisque les autres CYPs analysés dans notre étude pourraient également contribuer, en interagissant les uns avec les autres, à la métabolisation de la Phenstatine. En effet, les métabolites formés par un CYP donné peuvent être également le substrat d'un autre CYP présent *in vivo*. Nous voyons, par conséquent, toute l'importance de déterminer si dans des incubats de microsomes hépatiques il n'existe pas en effet de telles réactions. Pour ce faire, nous avons donc utilisé une autre méthode d'étude qui est l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des différents CYPs. Ceci nous a donc permis de déterminer si ces inhibiteurs permettaient la diminution ou l'abolition de la formation des métabolites et ainsi mettre en avant les CYPs primordiaux à la métabolisation de la Phenstatine.

2. Par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques

Par cette méthode, nous avons voulu déterminer l'effet de différents inhibiteurs de cytochromes P450 sur le métabolisme de la Phenstatine par les microsomes hépatiques humains. Pour cela, la Phenstatine a été incubée avec ces microsomes et des inhibiteurs sélectifs des CYPs d'intérêt sur une période de 60 minutes (Figures ci-après). Bien que les inhibiteurs choisis dans cette expérimentation interagissent simultanément avec plusieurs isoformes de CYPs (Newton *et al*, 1995), les inhibiteurs utilisés sont ceux dont la sélectivité avec leur cible est la plus importante et de plus, les concentrations utilisées sont définies de manière à éviter toutes interactions potentielles avec d'autres CYPs. Ces concentrations ont été sélectionnées dans le but d'induire un pourcentage d'inhibition suffisant pour obtenir un effet sur l'activité enzymatique totale (données existantes dans la littérature). La concentration de Phenstatine utilisée dans cette étude est de 100 μ M.

La Phenstatine montre un taux d'élimination plus faible avec les inhibiteurs tels que le Méthoxsalène (CYP2A6), le Thiotepa (CYP2B6), le Triméthoprim (CYP2C8), le Sulfaphénazole (CYP2C9), la Quinidine (CYP2D6), le DDTC (CYP2E1) et l'Itraconazole (CYP3A4/5). Le profil de stabilité métabolique observé en présence d'autres inhibiteurs de CYPs présentent des différences de métabolisation par rapport aux incubats contrôles (Phenstatine sans inhibiteurs). Des inhibitions significatives ont été tout de même observées à différents temps alors que ces CYPs n'avaient pas d'effets avec l'utilisation de supersomes.

L'inhibition du CYP1A1 révèle une diminution prononcée de la formation des métabolites **M4** et **M8** et celle de **M3** dans une moindre mesure (Fig. 42).

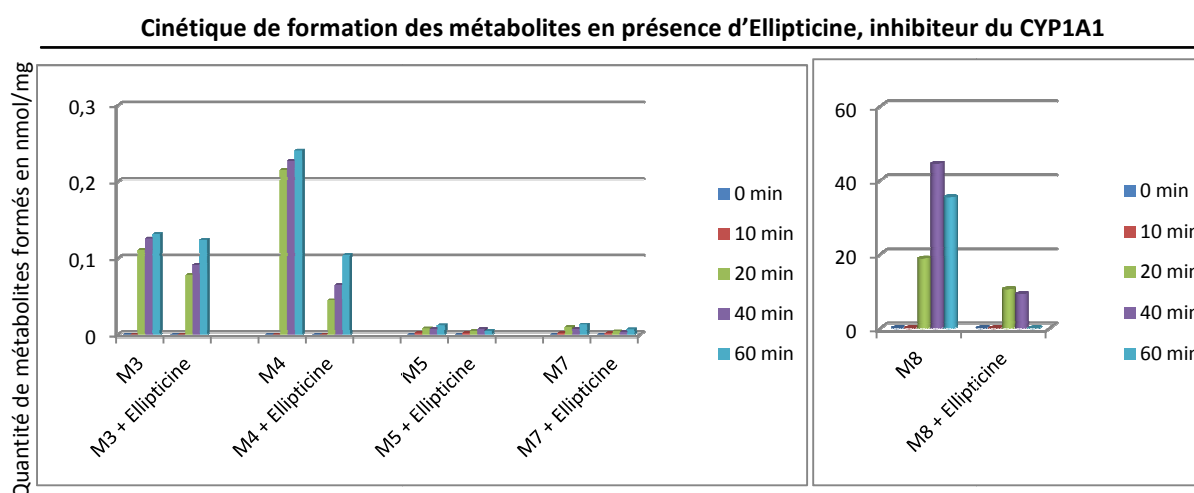


Fig. 42 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'Ellipticine.

De même, une inhibition du CYP1A2 présente une diminution de la production de **M3** (à 60 min), de **M4** et **M8** (Fig. 43).

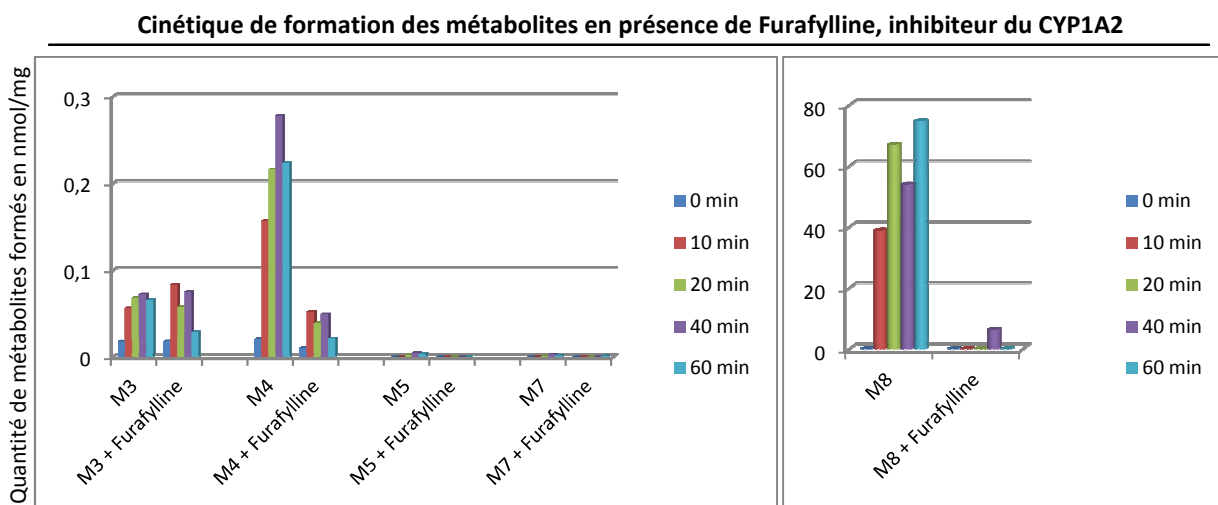


Fig. 43 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Furafylline.

Le Méthoxsalène, inhibiteur de CYP2A6, diminue de façon importante la formation de **M4** et **M8** et légèrement celle de **M5** à 60 min (Fig. 44).

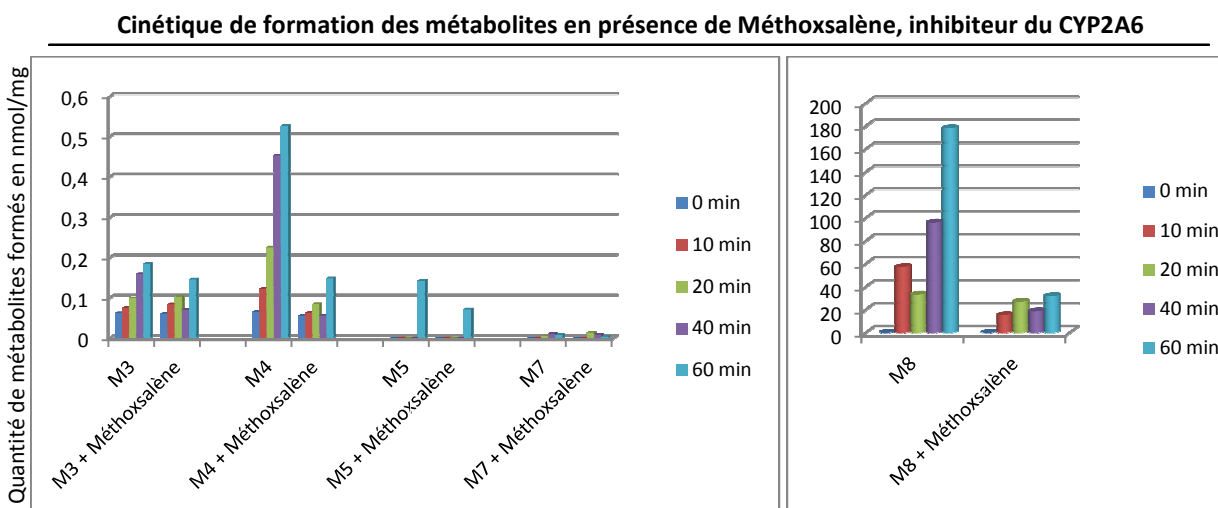


Fig. 44 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Méthoxsalène.

Le Thiotepa, inhibiteur du CYP2B6, n'a pas de réels effets sur le métabolisme de la Phenstatine même si nous pouvons observer une diminution des métabolites **M4** et **M8** à 40 minutes (Fig. 45).

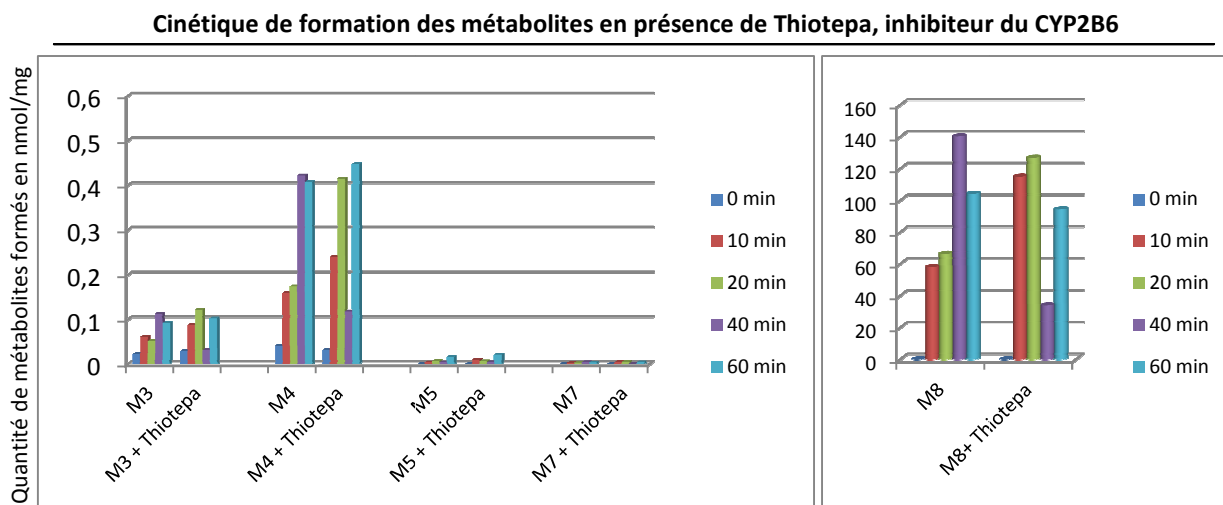


Fig. 45 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'inhibiteurs de Thiotepa.

En présence de Fluconazole, inhibiteur du CYP2C19, nous avons également une nette diminution des métabolites **M3**, **M4** et **M8**, à 20 min (et 10 min pour **M8**) d'incubation (Fig. 46).

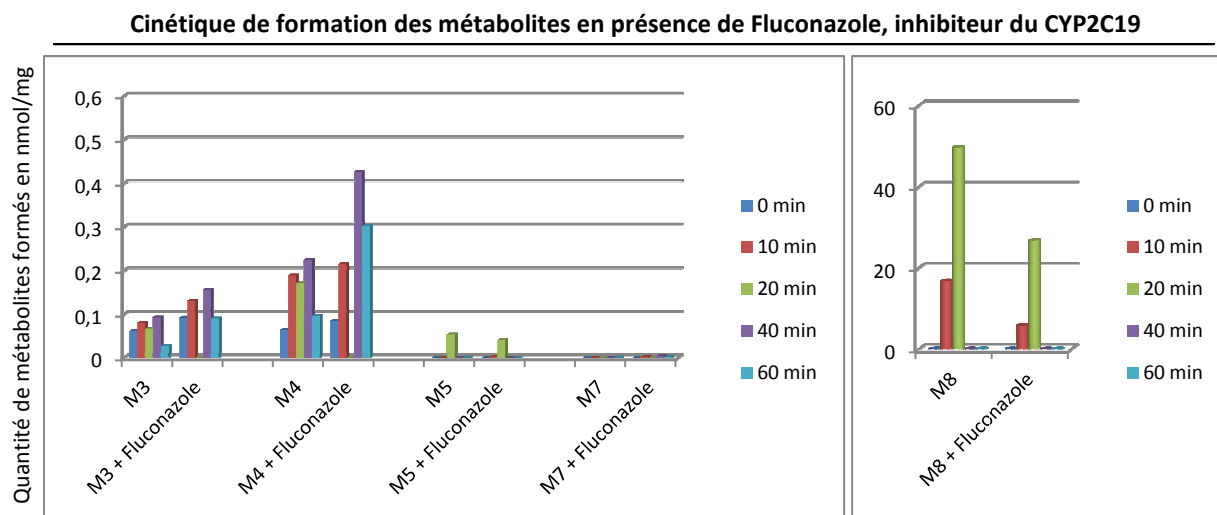


Fig. 46 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Fluconazole.

En présence de Triméthoprime, nous avons observé une diminution de **M4** à 40 min et de **M8** à 20 et 60 min (Fig. 47).

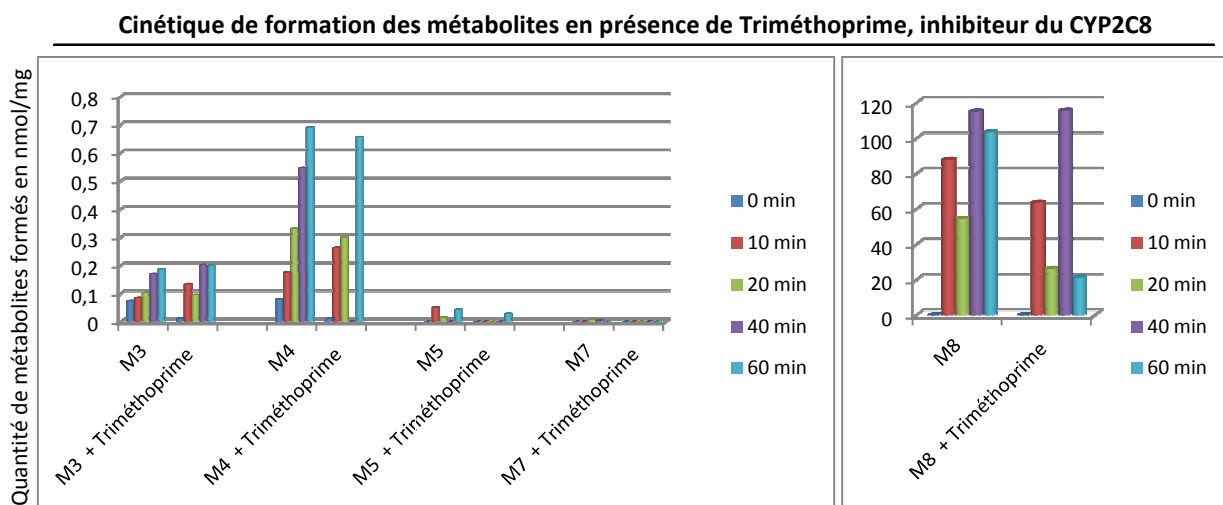


Fig. 47 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Triméthoprime.

Nous avons pu remarquer que le sulfaphénazole diminue la formation du métabolite **M8** et n'a par contre pas de réels effets sur les autres métabolites (Fig. 48).

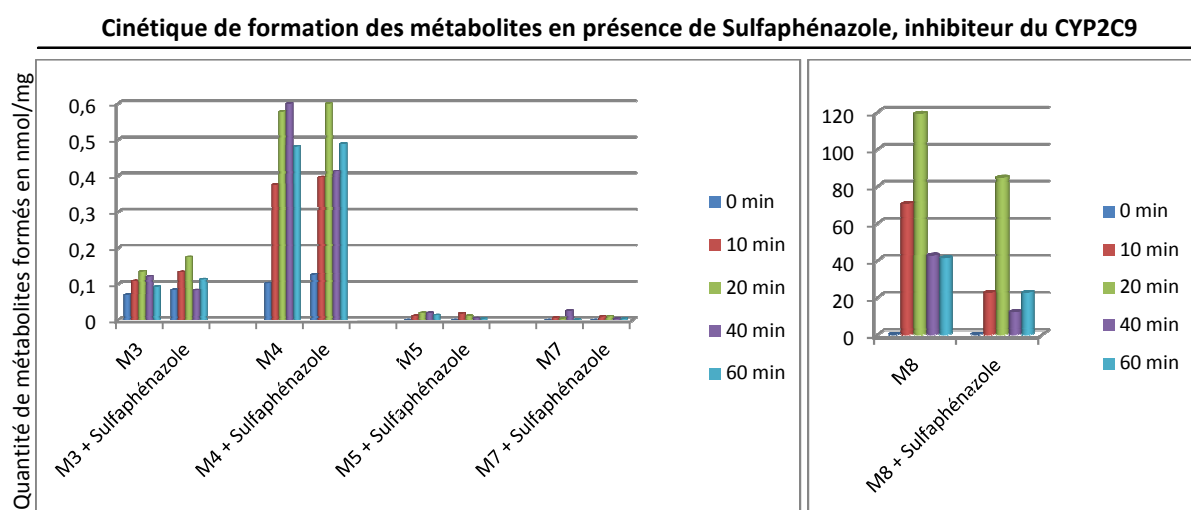


Fig. 48 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de Sulfaphénazole.

La quinidine, inhibiteur du CYP2D6, montre un effet intéressant pour le **M8** dont la formation est diminuée à partir de 10 minutes d'incubation (Fig. 49).

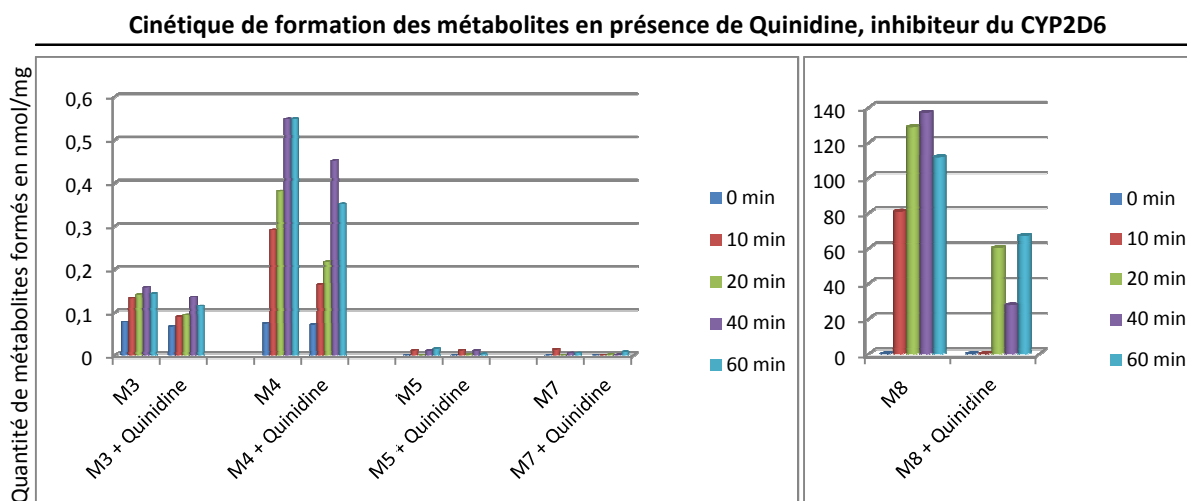


Fig. 49 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non d'inhibiteurs de Quinidine.

Cependant, le diéthylldithiocarbamate, inhibiteur du CYP2E1 diminue la formation des métabolites **M4** (à 40 min) et **M8** (Fig. 50).

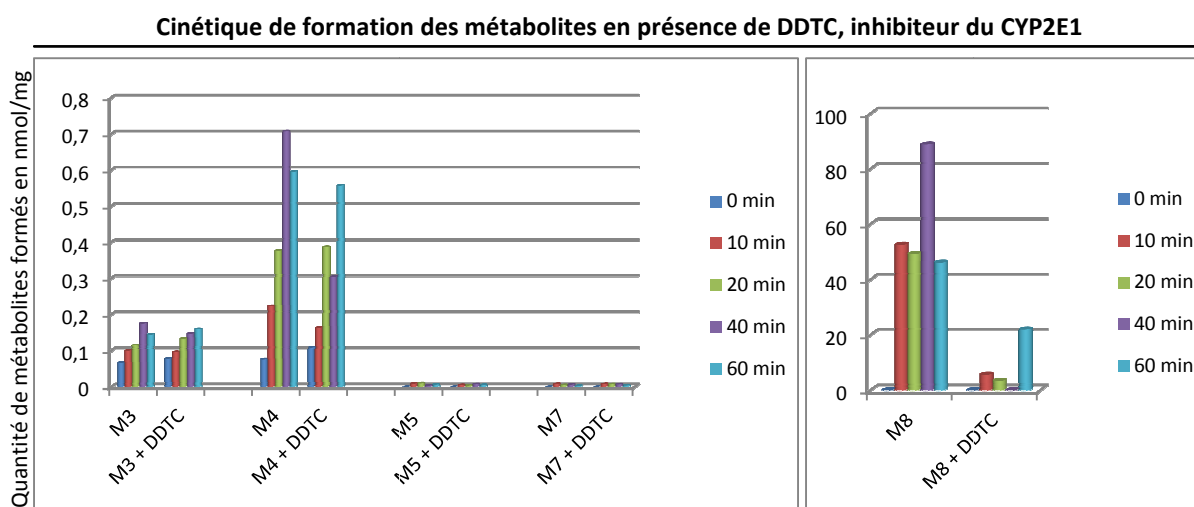


Fig. 50 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non de DDTC.

De plus, l'itraconazole, inhibiteur des isoformes CYP3A4/5 empêche la formation du métabolite **M8** au terme des 20 minutes (Fig. 51). Il est à noter que nous n'avons pas pu déterminer la quantité de métabolites formés en présence d'itraconazole au-delà de 20 minutes suite à un décalage des temps de rétention.

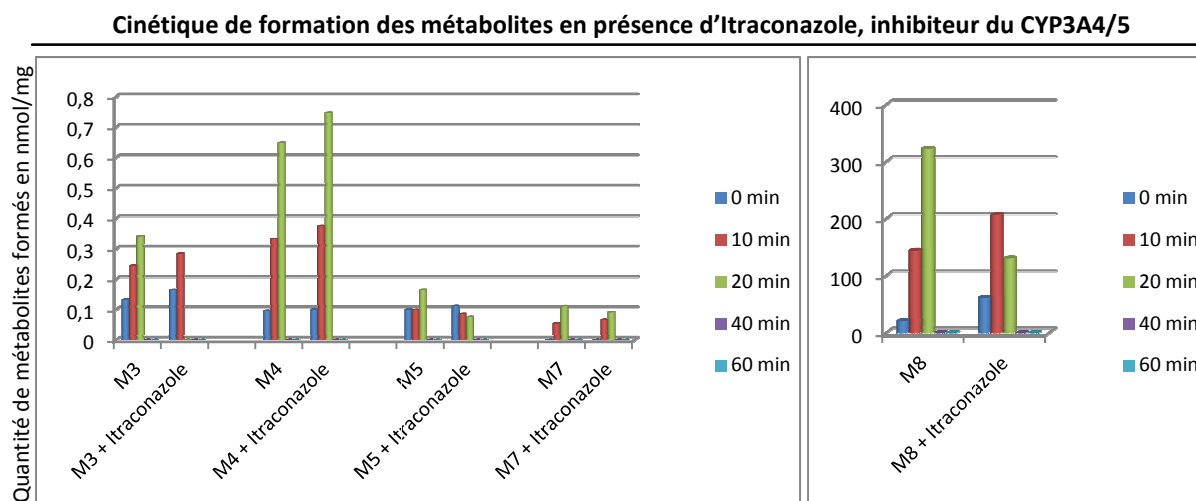


Fig. 51 : Analyse quantitative des métabolites issus de la biotransformation de la Phenstatine en présence ou non Itraconazole.

Au vu de ces différents résultats, nous avons donc pu remarquer que d'une manière générale les CYPs 2B6, 2C8 et 3A4/5, ne participent pas de façon marquée au métabolisme de la Phenstatine. Par contre, les CYPs 1A1 et 1A2 participeraient activement à ce métabolisme.

Nous avons pu constater que les différents inhibiteurs utilisés avaient surtout un impact sur la formation des métabolites **M4** et **M8**.

Nous avons également montré l'intérêt d'étudier la métabolisation de la Phenstatine à la fois avec l'incubation de cette molécule en présence de supersomes et en l'incubant avec les microsomes hépatiques humains combinés avec des inhibiteurs sélectifs des CYPs. En effet, la technique des supersomes a permis de montrer que le CYP1A1 induisait la formation des métabolites **M3**, **M4**, **M5**, **M7** et **M8**, CYP1A2, celle de **M3**, **M4** et **M8**, et, CYP2C19, celle de **M3** et **M5**. Cependant, en inhibant sélectivement les trois CYPs cités précédemment, nous avons pu mettre en avant le fait que ces trois CYPs ont surtout un effet sur la formation des métabolites **M4** et **M8**.

Les supersomes permettent d'identifier les CYPs impliqués dans le métabolisme de médicament candidat de façon plus aisée et plus directe. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs est une bonne technique mais elle a comme limite le fait que certains inhibiteurs vont également inhiber d'autres CYPs de manière moins sélective. De plus, il est important d'utiliser en parallèle ces deux techniques dans le sens où les résultats ne sont pas toujours corrélés (Kot et Daniel, 2009).

Kot M, Daniel WA, *Effect of diethylthiocarbamate (DDC) and ticlopidine on CYP1A2 activity and caffeine metabolism: an in vitro comparative study with human cDNA-expressed CYP1A2 and liver microsomes*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(6): p. 1216-20.

La connaissance des CYPs impliqués dans le métabolisme de nouveaux médicaments tels que la Phenstatine permet de prédire d'éventuelles interactions médicamenteuses qui risquent de survenir lors de multi-thérapies mais surtout de prévoir les éventuelles inhibitions et inductions enzymatiques.

III. Impact du cadmium sur la prise en charge de la Phenstatine et de ses métabolites

1. Evaluation pharmacologique des composés sous l'influence du cadmium

Nous avons utilisé le test MTT afin d'étudier l'effet cytotoxique du cadmium sur la lignée cancéreuse prostatique PC3 mais également pour déterminer l'effet du cadmium sur le traitement de cette même lignée avec la Phenstatine (Fig. 52) à une concentration égale à son IC_{50} (2,8 μ M). Pour ce faire, nous avons utilisé différentes concentrations de cadmium à 0, 2,5, 5 et 10 μ M. Afin de faire notre choix de concentrations en cadmium, nous nous sommes inspirés des résultats obtenus par l'équipe de Bakshi (Bakshi S et al, 2008).

Les cellules prétraitées à 5 μ M de cadmium montrent que l'effet cytotoxique de la Phenstatine est potentialisé de manière significative ($p < 0,05$) alors que celles prétraitées à 2,5 μ M de cadmium révèlent une diminution de l'activité de la Phenstatine ($p < 0,1$). Des concentrations supérieures ou égales à 10 μ M de cadmium sont cytotoxiques sur les PC3, ainsi l'influence du cadmium à 10 μ M est difficilement interprétable sur les PC3.

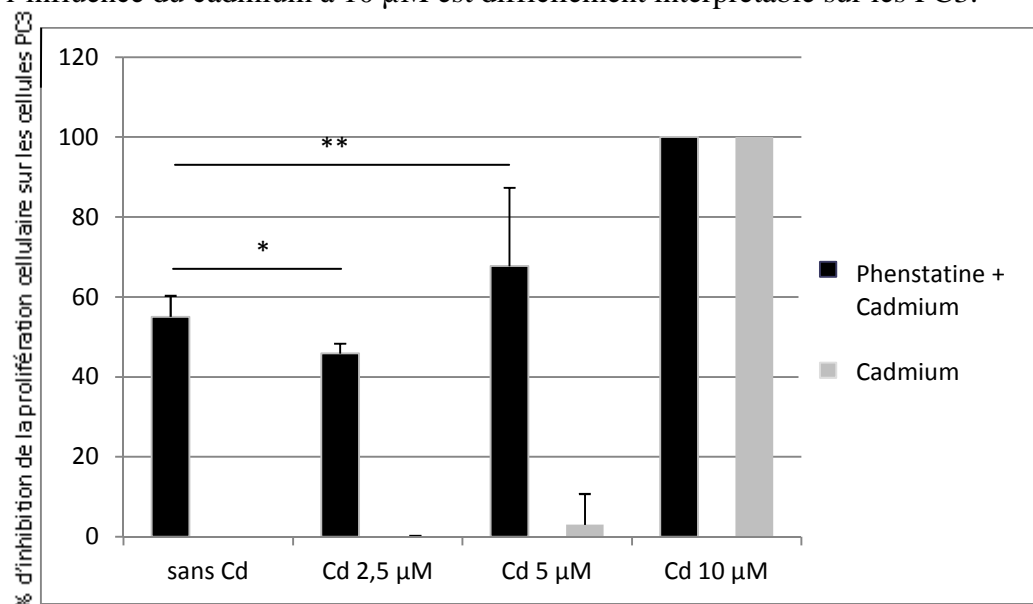


Fig. 52 : Effet d'un prétraitement de 3 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine (2,8 μ M) (* $p < 0,1$; ** $p < 0,05$: différence significative par rapport au contrôle).

Ces résultats révèlent qu'il existe bien une influence de l'environnement chimique notamment du cadmium sur la croissance cellulaire. C'est la raison pour laquelle nous avons voulu mettre en exergue l'effet d'une exposition au cadmium sur une période de 10 jours sur l'activité biologique de la Phenstatine et de ses métabolites sur la lignée PC3 (Figures ci-après). Pour cela, nous avons utilisé le test MTT afin de déterminer s'il existait des modulations de la croissance des cellules PC3 en présence ou non de cadmium lorsque ces mêmes cellules sont traitées avec les différents composés. Ainsi, d'un point de vue pratique, nous avons souhaité étudier ces modifications éventuelles au terme de 3, 7 et 10 jours d'exposition. Nous n'avons malheureusement pas pu effectuer ces observations au-delà de ces temps d'exposition car le cadmium était cytotoxique pour les cellules.

Au bout de trois jours d'exposition, l'effet de la Phenstatine et de ses métabolites diminue à une concentration de 2,5 μM en cadmium alors qu'une concentration de 5 μM de ce métal, semble potentialiser l'effet des composés excepté pour le métabolite **M2** pour lequel l'effet est diminué de presque 50 %. Cependant, il faut savoir que d'après Bakshi, la viabilité cellulaire sur les cellules prostatiques saines PrEC augmentent de 150 à 270 % après 24, 48 et 72 heures de traitement avec des concentrations en chlorure de cadmium de 1 ; 2,5 et 5 μM . Cette augmentation pourrait être la conséquence de la promotion de la croissance cellulaire. Le métabolite **M5** présente un effet à 2,5 μM de cadmium et une inhibition de la prolifération cellulaire d'environ 50 % à 5 μM de cadmium alors que ce composé n'avait pas d'activité initialement (Fig. 53).

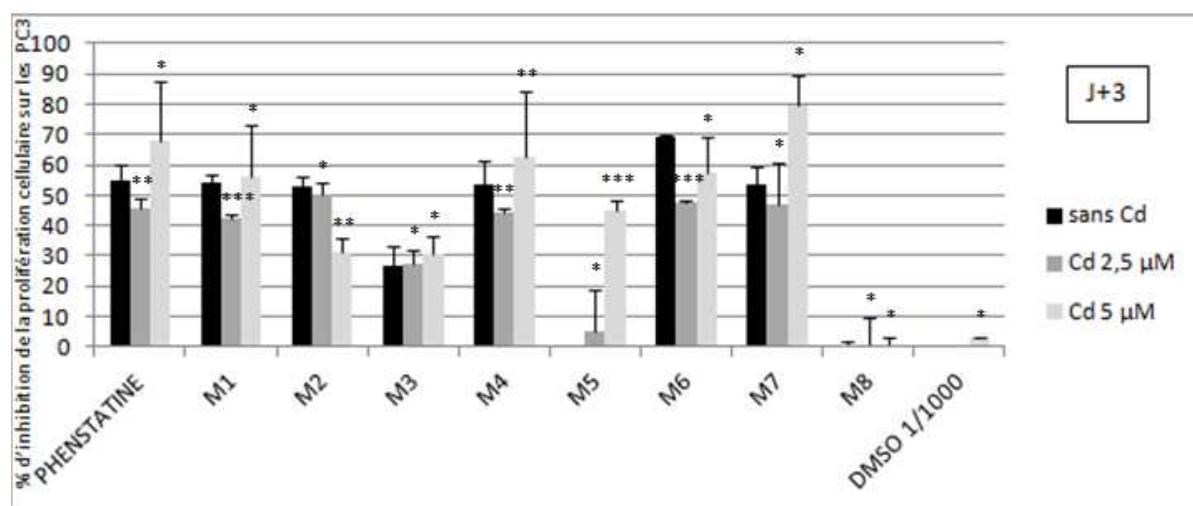


Fig. 53 : Effet d'un prétraitement de 3 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$: différence significative par rapport aux résultats obtenus avec la Phenstatine).

Après sept jours d'exposition au cadmium, l'effet de la Phenstatine et des métabolites correspondants est d'une manière générale potentialisé à des concentrations en cadmium de 2,5 et 5 μM . En effet, les cellules exposées à 2,5 μM de cadmium ont une inhibition de prolifération cellulaire améliorée lors d'un traitement avec la Phenstatine, et ses métabolites à l'exception de **M7** en réduisant la croissance cellulaire de 10 % pour la Phenstatine, **M4** et **M6**, et jusqu'à plus de 30 % pour **M1**, **M2**, **M3** et **M5**, en comparaison avec les résultats obtenus sur les cellules PC3 non traitées au cadmium. Par contre, lors d'un prétraitement avec 5 μM de cadmium, nous avons pu constater qu'une augmentation de la concentration en cadmium accentuait l'effet des composés **M1**, **M3**, **M4**, **M7** et **M8** et une perte d'activité de la Phenstatine, **M2**, **M5** et **M6** (Fig. 54).

En comparant, les deux graphes (3 et 7 jours), nous avons pu remarquer qu'en augmentant le temps d'exposition du cadmium sur les cellules PC3, le métabolite **M2** a une activité améliorée pour les deux concentrations et surtout avec 5 μM de cadmium.

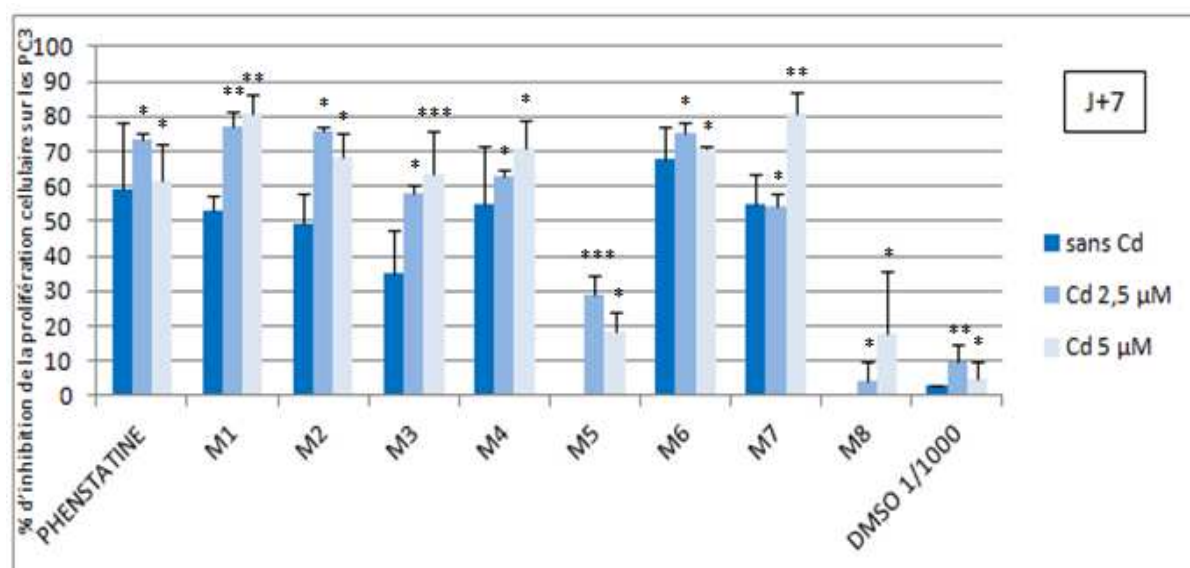


Fig. 54 : Effet d'un prétraitement de 7 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$: différence significative par rapport aux résultats obtenus avec la Phenstatine).

Au terme de 10 jours de traitement, en comparant les deux graphes (7 et 10 jours), nous avons pu constater qu'il existait de nouvelles modifications dans la réponse aux différents traitements tant à 2,5 μM qu'à 5 μM de cadmium. En effet, une exposition pendant 10 jours des cellules PC3 montrent qu'une concentration de 2,5 μM de cadmium améliore l'activité de **M7** mais diminue celle de **M1**, mais l'activité reste inchangée pour la Phenstatine, **M2**, **M3**, **M4**, **M5**, **M6** et **M8**. Cependant, une concentration en cadmium de 5 μM diminue l'activité de

la Phenstatine et des métabolites sauf pour **M6** et **M8** qui présentent un meilleur effet sur l'inhibition de la prolifération des cellules PC3 (Fig. 55).

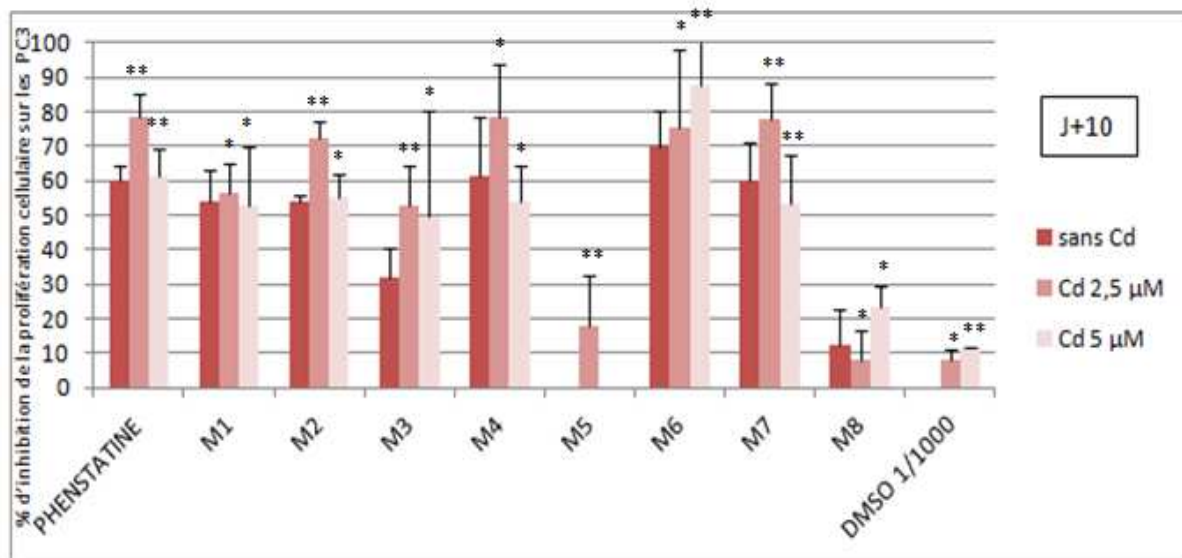


Fig. 55 : Effet d'un prétraitement de 10 jours par le cadmium sur la cytotoxicité de la Phenstatine et ses métabolites (* $p < 0,5$; ** $p < 0,1$; *** $p < 0,01$: différence significative par rapport aux résultats obtenus avec la Phenstatine).

Nous avons ainsi mis en évidence une différence de sensibilité pour ces différents composés en présence de cadmium, ceci pourrait s'expliquer par un effet de ce métal sur la métabolisation de ces différents composés dans les lignées prostatiques. Cette hypothèse sera étayée, un peu plus tard dans le mémoire, grâce à l'analyse des différentes expressions des gènes dans des lignées cellulaires cancéreuses prostatiques prétraitées au cadmium aux mêmes concentrations que précédemment.

Bien qu'il soit difficile de transposer les résultats métaboliques obtenus sur le foie sur ce qui pourrait réellement s'effectuer au sein de la prostate, on sait aujourd'hui que la prostate possède un système de métabolisation des xénobiotiques qualitativement proche de celui présent au niveau hépatique. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer s'il existait des différences d'expression protéique en présence de différentes concentrations de cadmium, notamment sur les trois cytochromes P450 (CYPs 1A1, 1A2 et 2C19) impliqués de façon prépondérante dans la métabolisation de la phenstatine.

2. Analyse de l'expression protéique des CYPs impliqués dans la métabolisation de la Phenstatine

Nous avons déterminé l'expression protéique des CYPs 1A1, 1A2 et 2C19 sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC3 exposées de façon chronique à différentes concentrations de cadmium (0 ; 2,5 ; 5 et 10 μM) par la technique d'immunodétection, le Western Blot.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si le cadmium avait un impact sur la lignée PC3. Pour cela, nous avons utilisé deux marqueurs, la MMP2 (*Matrix MetalloProteinase-2*) et la DNMT-1 (*DNA MethylTransferase-1*) qui sont des protéines dont l'expression augmente en présence de cadmium.

En effet, les cellules exposées au cadmium ont tendance à perdre leur inhibition de contact avec les autres cellules (*Achanzar WE et al, 2001*). Les cellules ainsi transformées sécrètent d'autant plus de MMP2, phénomène observé dans les tumeurs humaines prostatiques. Les MMPs sont des enzymes qui dégradent de façon sélective la matrice extracellulaire et permet ainsi l'invasion tumorale (*Cottam D et al, 1993*). Une hypersécrétion de MMPs est en corrélation avec une agressivité tumorale accrue.

De même, l'expression de la DNMT-1 est significativement élevée après exposition au cadmium (*Zhang J et al, 2009*). Le fait que le cadmium augmente la méthylation de l'ADN et l'expression de DNMT-1 laisse présager que cette méthylation est impliquée dans l'action cancérigène du cadmium.

L'expression de ces deux protéines augmentent donc de manière dose-dépendante dans les cellules pC3 prétraitées au cadmium.

Après 24 heures de prétraitement au cadmium, les cellules présentent une diminution de l'expression de CYP1A1, une augmentation de l'expression de CYP1A2 et un niveau d'expression peu modifié pour le CYP2C19 pour des concentrations croissantes en cadmium (*Fig. 56*). De plus, lorsque les temps d'exposition sont plus longs (48 heures), l'expression protéique de ces CYPs d'intérêt reste inchangée quelles que soient les concentrations en cadmium.

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(2): p. 455-8.

Cottam D, Rees R, *Regulation of matrix metalloproteinases - their role in tumor invasion and metastasis*. *Int J Oncol*, 1993. **2**(6): p. 861-72.

Zhang J, Fu Y, Li J, Wang J, He B, Xu S, *Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009. **27**(3): p. 345-9.

Ces résultats mettent en avant le fait que l'environnement chimique à court et moyen terme a une influence sur l'expression d'enzymes impliquées dans la métabolisation de la Phenstatine. En effet, le niveau d'expression de ces enzymes dépend non seulement du temps d'exposition mais également de la concentration de cadmium avec laquelle les cellules sont exposées. Dans le cas de la protéine CYP1A1, une exposition aiguë à des doses croissantes de cadmium va diminuer son expression et ainsi modifier la métabolisation de la molécule d'intérêt. Nous pouvons dès lors envisager le fait que cette sous-expression serait susceptible d'empêcher la formation des métabolites **M3**, **M4**, **M5**, **M7** et **M8**. De même, une surexpression de CYP1A2 pourrait induire la formation de plus grande quantité de **M3**, **M4** et **M8**.

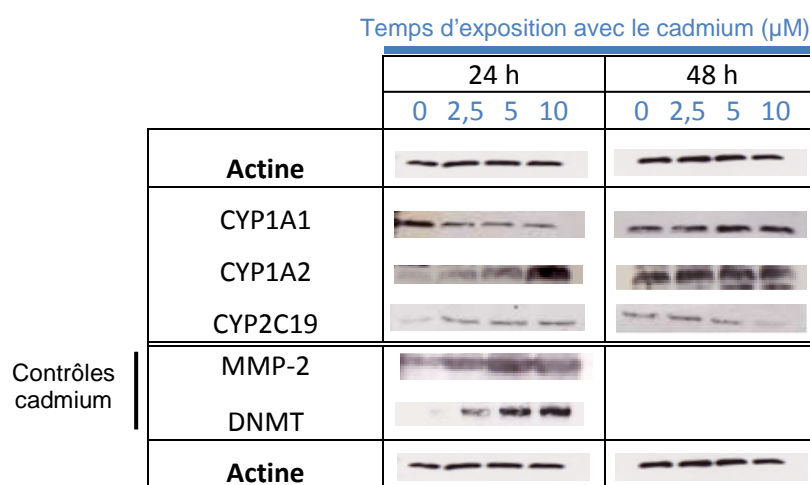


Fig. 56 : Analyse de l'expression protéique par Western Blot des CYPs 1A1, 1A2 et 2C19

Nous avons pu montrer qu'il existait des différences d'expression protéique d'enzymes du métabolisme lors d'une exposition au cadmium. Pour confirmer ce résultat, nous avons souhaité pousser notre étude en déterminant l'expression génique d'un panel de 380 enzymes impliquées dans l'inflammation et la métabolisation. Le choix d'une lignée compatible avec notre étude était primordial afin de se rapprocher au mieux des mécanismes biologiques *in vivo*.

Pour cela nous avons effectué l'analyse du profil d'expression génique de deux lignées cancéreuses prostatiques humaines disponibles au sein de notre laboratoire en comparaison à celui obtenu avec des tissus issus de biopsies de patients atteints d'un cancer de la prostate.

3. Analyse du profil d'expression des gènes impliqués dans la métabolisation des xénobiotiques par RT-PCR quantitative en temps réel

Afin de mesurer l'expression des 380 gènes (*Annexe 1*), nous avons utilisé le Ct (*Cycle Threshold*) de chaque gène. Nous avons donc établi des limites dans le niveau d'expression comme le montre le tableau ci-dessous basé sur des études antérieures (*Kevorkian L, 2004*).

Valeur Ct	Niveau d'expression
$20 \leq Ct \leq 25$	Très élevée
$25 \leq Ct \leq 30$	Elevée
$30 \leq Ct \leq 35$	Modérée
$35 \leq Ct \leq 40$	Faible
Ct = 40	Non détectée

L'analyse complémentaire de ces mesures a été effectuée avec les logiciels *SDS 2.4 Software* et *RQ manager 1.2.1* (Applied Biosystems).

3.1. validation du modèle cellulaire

Nous avons étudié les profils génétiques de deux lignées cancéreuses prostatiques humaines, les PC3 et les DU145. En effet, l'obtention de tissus prostatiques étant soumis au Comité de Protection des Personnes (CPP), il a été donc plus aisé pour nous de travailler dans un premier temps sur ces lignées. Cependant, par soucis de se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, nous avons voulu déterminer s'il y avait de grandes disparités d'expression génique entre des tumeurs prostatiques humaines et ces deux lignées (*Annexe 2*). Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes. Les barres des histogrammes correspondent aux RQ (exprimées en $2^{-\Delta\Delta Ct}$) des différents gènes cibles des cellules PC3 et DU145 par rapport à la moyenne des six biopsies tumorales humaines obtenues au préalable.

En analysant les profils d'expression des 380 gènes présélectionnés des PC3, des DU145 et des tumeurs prostatiques, on remarque que les PC3 correspondent à la lignée cancéreuse prostatique la plus proche des tumeurs que ce soient pour les enzymes de Phase I, de Phase II, les transporteurs ainsi que les xénosenseurs. Ainsi, nous avons pu valider l'utilisation du modèle cellulaire PC3 pour déterminer l'influence du cadmium sur l'expression génique des EMX qui ont fait l'objet de notre étude (*Annexe 2*).

3.2. Influence du cadmium sur l'expression génique des EMX

Après un traitement cadmique de 24 et 48 heures, les ARNs totaux issus de culture cellulaire ont été extraits puis quantifiés et rétrotranscrits dans le but d'obtenir les ADNc nécessaires à la technique du TLDA. Le gène endogène utilisé chez les PC3 comme contrôle est le gène 18S. Les résultats obtenus ont été reportés sous forme d'histogrammes dont les barres correspondent à l'expression des gènes exprimée en quantité relative (RQ) pour les cellules exposées au cadmium par rapport aux cellules non traitées (ligne de base).

Parmi les 380 gènes analysés, nous nous sommes tout particulièrement intéressés aux gènes correspondant aux cytochromes P450 impliqués dans la métabolisation de composés exogènes (CYP appartenant à la famille 1, 2 et 3).

Les cellules PC3 ont été traitées à deux concentrations de cadmium (2,5 et 5 μM). Une concentration égale ou supérieure à 10 μM n'a pas été prise en compte puisque, comme nous l'avons vu précédemment, cette concentration s'est avérée cytotoxique pour les cultures cellulaires étudiées au bout de 72 heures.

L'étude du profil d'expression des gènes CYPs (*Fig. 57*) met en avant une dérégulation de ces gènes puisque, d'une manière générale, les cellules PC3 présentent une certaine sensibilité lors d'une exposition à différentes concentrations de cadmium (2,5 et 5 μM). En réponse à une exposition cadmique de 2,5 et 5 μM pendant 24 heures, nous obtenons de façon générale une sous-expression des gènes CYPs d'intérêt alors qu'après un traitement de 48 heures, on observe plutôt une sur-expression de ces mêmes gènes.

Les CYPs sous-exprimés lors d'une exposition de 24 heures sont les CYPs 2A6, 2A7, 2B6, 2C18, 2D6, 2J2 et 2S1 et ceux sur-exprimés sont les CYPs 1A1, 1B1, 2E1, 2R1 et 2U1, parmi lesquels certains ont un rôle primordial dans la métabolisation de la Phenstatine.

De même, lors de prétraitement au cadmium pendant 48 heures, les CYPs précédemment cités sont tous sur-exprimés à l'exception du CYP2C18 qui n'est alors plus

PC3

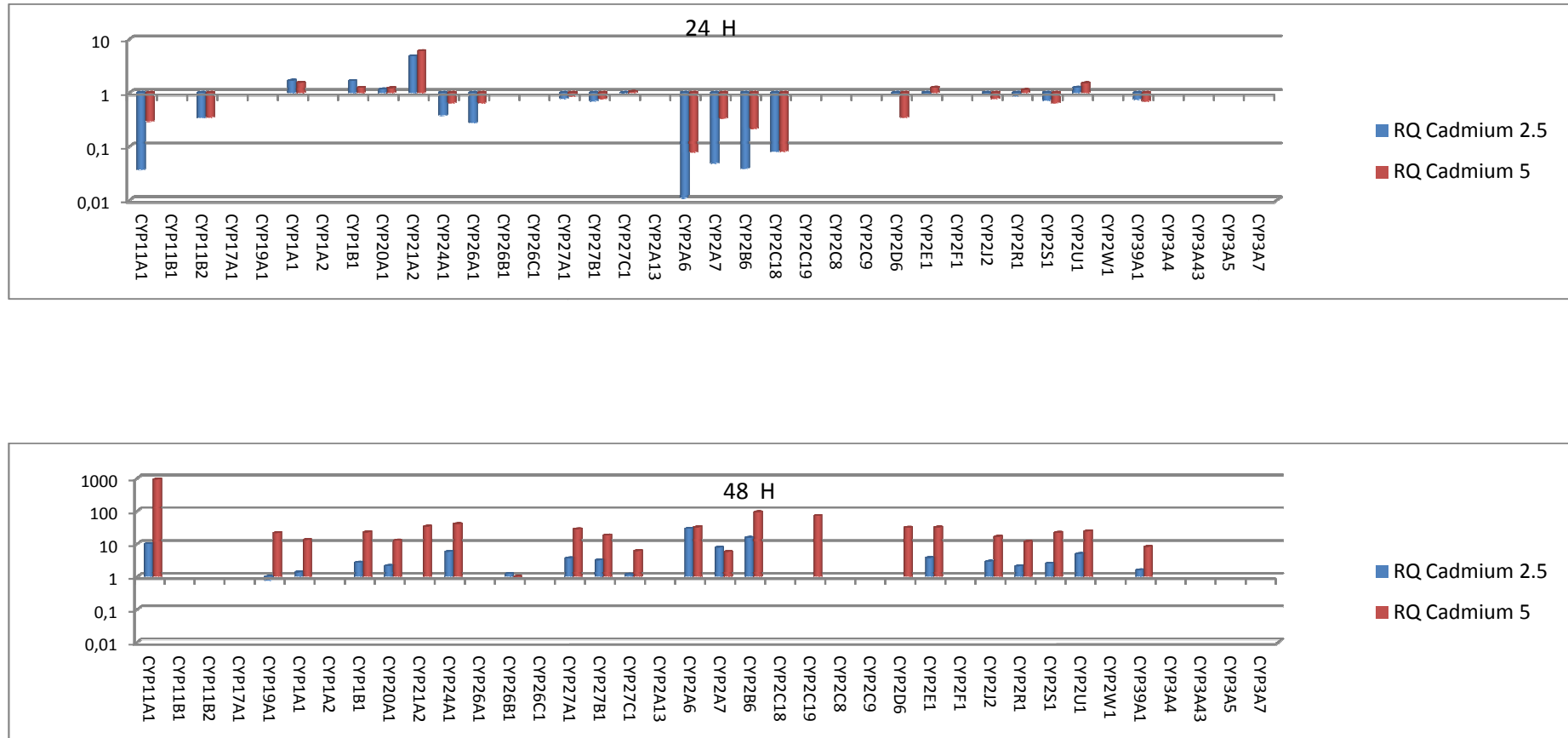


Fig. 57 : Expression relative logarithmique (log 10) exprimée en RQ des gènes CYPs de la lignée cellulaire prostatique cancéreuse PC3 traitée à différentes concentrations de cadmium en comparaison des mêmes cellules non traitées

exprimé et le CYP2C19 qui est sur-exprimé à une concentration de cadmium de 5 μM par rapport aux cellules témoins non traitées. Ces nouvelles données montrent ainsi toute l'importance de ne pas négliger l'impact environnemental sur l'expression de gènes impliqués dans la métabolisation de molécules à visée thérapeutique. En effet, une exposition chronique ou aiguë au cadmium peut modifier l'effet pharmacologique de composés tels que la Phenstatine puisqu'une surexpression de CYPs peut mener le plus souvent à une augmentation de la métabolisation et ainsi induire son élimination plus rapidement en diminuant ainsi son activité biologique. A l'inverse, une sous-expression de CYPs peut induire une diminution de la métabolisation et augmenter l'accumulation du médicament et de certains métabolites issus de sa biotransformation et plus ou moins actifs / toxiques pour l'organisme. Ainsi, l'environnement chimique influe non seulement sur l'expression génique et protéique mais également sur la métabolisation de composés exogènes tels que la Phenstatine.

In fine, nous avons porté un grand intérêt sur l'expression génique des trois CYPs intervenant directement dans la formation de métabolites issus de la biotransformation hépatique de la Phenstatine : CYPs 1A1, 1A2 et 2C19. Après analyse des quantités relatives, nous avons remarqué que les CYPs 1A2 et 2C19 n'étaient pas exprimés dans la lignée cellulaire PC3. Cette constatation nous a, dans un premier temps, intrigué puisque la détermination de l'expression protéique de ces CYPs par la technique du Western Blot, a montré que ces protéines étaient exprimées dans les cellules PC3 et leur expression protéique était modifiée par une exposition au cadmium de manière dose-dépendante. C'est pourquoi, afin de s'affranchir de ces résultats surprenants, il serait intéressant, à court terme, de déterminer à nouveau par RT-PCR quantitative le niveau d'expression des gènes correspondant aux CYPs 1A2 et 2C19 en utilisant d'autres couples d'amorces que ceux utilisés dans les plaques TLDA et en maintenant les concentrations en cadmium précédemment utilisées. Ainsi, nous pourrions déterminer si les transcrits correspondants à ces gènes ont été amplifiés ou non.

Toutefois, au vu des résultats obtenus par les microarrays et le Western Blot, notamment concernant le CYP1A1 présentant des expressions différentes au niveau génique et protéique, nous avons voulu comprendre s'il existait des modulations d'expression génique possibles au niveau de ce gène et des autres isoformes de CYP450. Pour ce faire, nous avons voulu mettre en avant l'existence de modifications épigénétiques en étudiant, plus particulièrement, l'expression de microARNs. Nous avons ainsi essayé de déterminer dans le

chapitre suivant quels étaient les niveaux d'expression des miARNs ayant pour cible les CYPs impliqués directement et indirectement dans le métabolisme de la Phenstatine.

4. Implication des microARNs sur l'expression des CYPs d'intérêt

L'étude de l'expression des miARNs dans les cellules PC3 a pour finalité de mieux comprendre l'impact de facteurs épigénétiques médiés par une exposition au cadmium sur l'expression des transcrits et par conséquent sur la synthèse protéique des CYPs.

Après étude des profils d'expression des 700 miARNs présélectionnés (*Annexe 3*), dont les amorces ont été pré-définies dans deux microplaques de 384 puits, 52 miARNs nous ont tout particulièrement intéressés puisque ceux-ci ont l'avantage d'avoir pour cible les CYPs d'intérêt. C'est la raison pour laquelle, nous avons voulu déterminer s'il existait des dérégulations lors d'une exposition au cadmium sur une période de 24 heures à différentes concentrations (0 ; 2,5 et 5 μM).

Les niveaux d'expression de chaque miRNA ont été normalisés par rapport à deux contrôles internes : les miARNs let7a et RNU44 et les quantités relatives ont été obtenues en comparant les cellules PC3 exposées au cadmium par rapport à celles non traitées.

Comme nous l'avons indiqué dans le *tableau 14*, parmi les 52 miARNs étudiés, 30 sont sur-exprimés (**rouge**), 14 sont sous-exprimés (**vert**) et 8 dont le niveau d'expression est un peu particulier dans le sens où ces miARNs sont réprimés à une concentration de cadmium de 2,5 μM puis re-induits à 5 μM ou, à l'inverse, surexprimés à 2,5 μM et sous-exprimés à 5 μM de cadmium.

Dans ce tableau, nous avons également répertorié les CYPs cibles pour chaque miARN étudié (matérialisé par une croix \times).

Les miARNs présentant une sur-expression en présence de 2,5 et 5 μM cadmium sont les miR-15b, 106b, 1254, 1274 a et b, 1275, 1285, 1291, 148b, 181c, 183, 200a, 20a, 24, 26b, 29a, 320b, 454, 564, 590-3p, 601, 625, 661, 664, 7, 766, 92a, 93, 939 et 941.

Ceux étant sous-exprimés lors d'une exposition cadmique à ces deux concentrations, sont les miR-1201, 1255b, 1300, 181a, 18a, 22, 27b, 545, 573, 650, 663b, 922, 92b et 942.

Les miARNs possédant des niveaux d'expression variables (induction ou répression) en fonction de la concentration de cadmium sont les miR-1227, 24, 26a, 27a, 409-3p, 424, 550, 577 et 629. En effet, les miR-1227, 424, 577 et 629 sont sous-exprimés à une

concentration de cadmium de 2,5 μ M et sur-exprimés à 5 μ M. A l'inverse, les miR-26a, 27a, 409-3p et 550 présentent une sur-expression à 2,5 μ M et une répression à 5 μ M.

miRNA	CYP1A1	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	CYP3A5
15b						X				
106b									X	
1254	X									
1274a	X		X							
1274b	X									
1275				X						
1285				X						
1291	X	X	X							
148b				X						
181c					X					
183		X		X						
200a				X	X				X	
20a									X	
26b									X	
29a				X						
320b		X								
454				X						
564				X						
590-3p				X						
601				X						
625		X		X						
661	X			X						
664					X					
7		X		X						
766	X	X		X						
92a				X						
93									X	
939				X						
941									X	
1201									X	
1255b									X	
1300								X	X	
181a					X					
18a				X						
22			X							
27b									X	
545						X				
573		X								
650		X								
663b	X			X						
922				X						
92b				X						
942			X							
1227	X									
24		X							X	
26a									X	
27a									X	
409-3p									X	
424						X				
550	X	X							X	
577						X				
629				X						

Tableau 14 : miARNs exprimés dans la lignée PC3 ciblant les CYPs d'intérêt

Les dérégulations au niveau des miARNs ont des conséquences non négligeables sur l'expression protéique des enzymes du métabolisme dont elles sont les cibles.

Par exemple, les résultats obtenus par la technique du TLDA et par Western Blot mettent en exergue le fait que l'expression de l'ARNm du gène CYP1A1 est augmentée et son expression protéique diminuée lors d'une exposition de 24 heures au cadmium. Nous avons dans un premier temps été surpris de ce résultat mais lorsque nous avons étudié les miARNs ciblant le CYP1A1, nous avons remarqué que ceux-ci étaient préférentiellement sur-exprimés (miR-1254, 1274 a et b, 1291, 661 et 766) avec un seul miARN réprimé (miR-663b). L'induction de miARNs lors d'une exposition au cadmium a pour finalité d'empêcher la synthèse protéique. Ceci pourrait expliquer que le CYP1A1 soit moins exprimé à des concentrations croissantes de cadmium.

DISCUSSION

DISCUSSION

Contrairement à la Combrétastatine-A4 et surtout à la prodrug Combrétastatine-A4 phosphate (CA-4P, Zybrestat) actuellement en essais cliniques de phases II et III, la Phenstatine qui présente pourtant des avantages certains au niveau de ses propriétés de solubilité et de stabilité structurale (pas d'isomérisation possible en *trans*-stilbènes), n'a pas jusqu'alors présenté suffisamment d'« atouts » pour parvenir aux phases d'essais cliniques. Nous avons cependant pu montrer son efficacité sur l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques que celles-ci soient issues de lignées établies (PC3 et DU145) ou isolées à partir de tissus tumoraux. Il est intéressant de noter à ce niveau que nous avons obtenu des résultats d'activité différents sur un nombre bien sûr encore beaucoup trop limité de biopsies. Un plus grand nombre d'échantillons de tissus prostatiques nous aurait permis d'essayer déjà de corréler efficacité de la molécule et localisation géographique du patient.

De plus, nous avons observé sa plus grande stabilité en présence de microsomes hépatiques (11,3 % de Phenstatine métabolisée par rapport à 60 % de *cis*-CA-4 et 80 % de *trans*-CA-4). Les métabolites formés présentent en majeure partie, une activité sur la polymérisation de la tubuline et la prolifération cellulaire, identique voire supérieure à la molécule mère. Il est intéressant de souligner, en particulier, l'intérêt du métabolite (3-hydroxy-2,4-diméthoxy-phényl) – (3,4,5 triméthoxy-phényl) méthanone (métabolite **M6**) qui possède une CI_{50} de $3,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ vis-à-vis de la polymérisation de la tubuline et une CI_{50} de $2,3 \pm 1,6 \mu\text{M}$ vis-à-vis de la prolifération des cellules PC3. Cette molécule a par ailleurs été testée par le NCI sur un panel de cellules cancéreuses d'origines diverses et les résultats présentés dans le *tableau 15*, montrent sa très bonne activité de l'ordre de 10 à 100 nM sur pratiquement toutes ces lignées.

Il a été montré en cytométrie en flux, grâce aux collaborations de notre équipe, que ce métabolite bloquait le cycle cellulaire en phase G_2/M sur des cellules de leucémie murine DA1-3b (*Ghinet et al, 2011*) (*Fig. 58*). Cet effet semble indépendant de la dose. Ces résultats sont en accord avec les propriétés inhibitrices de la polymérisation de la tubuline de ce métabolite **M6**.

		GI ₅₀
Type cellulaire	Lignée cellulaire	M6
Leucémie	HL-60(TB)	2.35E-8
	K-562	<1.00E-8
Cancer Pulmonaire Non à petites Cellules	NCI-H322M	<1.00E-8
	NCI-H460	5.07E-8
	NCI-H522	<1.00E-8
Cancer du Côlon	HCT-15	1.06E-8
	KM12	<1.00E-8
Mélanome	M14	<1.00E-8
	MDA-MB-435	<1.00E-8
Cancer ovarien	OVCAR-3	2.22E-8
	NCI/ADR-RES	<1.00E-8
	SK-OV-3	8.96E-8
Cancer Rénal	CAKI-1	1.20E-7
	RXF 393	1.59E-8
	UO-31	4.89E-8
Cancer Prostatique	DU145	2.09E-8
Cancer du Système Nerveux Central	SF-295	1.99E-8
	SF-539	1.51E-8
Cancer du Sein	MDA-MB-	2.46E-8
	231/ATCC	2.46E-8
	HS 578T	<1.00E-8
	MDA-MB-468	2.49E-7

Tableau 15 : Effets du métabolite **M6** sur la prolifération de cellules cancéreuses humaines (tests réalisés par le NCI)

La valeur indiquée est la concentration molaire d'un composé qui cause 50% d'inhibition de croissance cellulaire selon le test NCI (Boyd, 1997 ; Skehan et al, 1990)

Boyd RB, *The NCI in vitro anticancer drug discovery screen*. In Anticancer Drug Development Guide : Preclinical screening, Vlinical trials, and Approval ; teicher, B, Ed. ; Humana Press Inc : Totowa, NJ, 1997. p. 23-42.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.

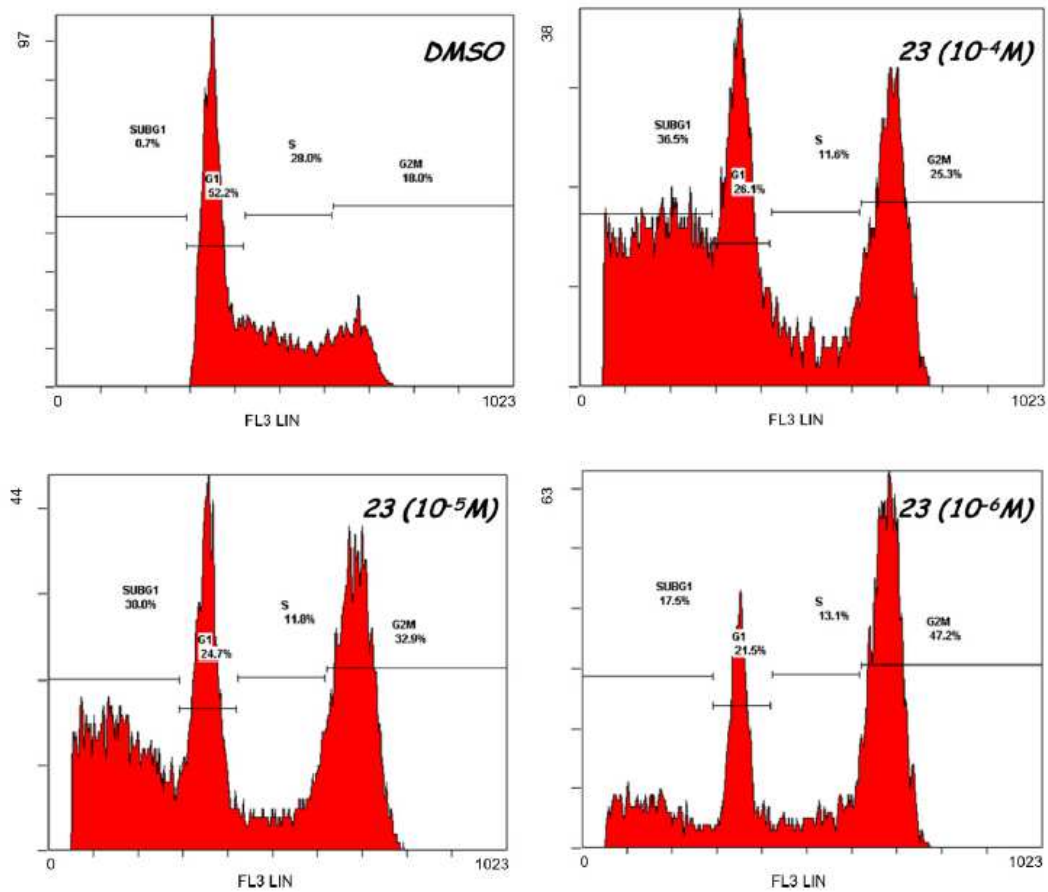


Fig. 58 : Effet du métabolite **M6** sur la progression du cycle des cellules DA1-3b.

(D'après Ghinet et al, 2011)

Ces cellules sont traitées avec différentes concentrations de métabolite **M6**. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle est indiqué.

Comme cela a souvent été montré lors d'études de métabolisation (*Fura et al, 2004 ; Huttunen et al, 2008*), ce métabolite pourrait être à l'origine de nouvelles études de relation structure-activité portant plus particulièrement sur l'occupation de la position C2' de la Phenstatine.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons cherché à identifier les cytochromes P450 impliqués dans la formation des métabolites, cette étape pouvant par ailleurs être importante dans la recherche d'éventuels composés susceptibles, par induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, de modifier l'efficacité et / ou la toxicité de la molécule mère. Les résultats obtenus en utilisant des supersomes, c'est-à-dire en procédant à la métabolisation de la Phenstatine par une seule isoforme de CYP, ont mis en évidence l'importance de trois isoformes, les CYPs 1A1, 1A2 et 2C19 dans la biosynthèse des métabolites retrouvés en CLHP-UV et LC-MS après incubation avec des microsomes hépatiques. Quelques études sur biopsies prostatiques qu'il nous a été possible de réaliser nous ont montré une certaine diversité dans l'expression de ces isoformes (*Fig. 59*).

L'étude complémentaire par l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs a mis en évidence la participation d'un plus grand nombre d'isoformes dans la biotransformation de la Phenstatine. Les isoformes responsables *in vivo* de la métabolisation d'un grand nombre de médicaments, telles que les CYPs 2A6, 2D6 et 2E1 sont impliquées à un stade sans doute intermédiaire du schéma métabolique et plus particulièrement dans la synthèse des métabolites **M4** et **M8**.

Ces résultats restent bien évidemment préliminaires puisque les essais n'ont pu être réalisés, à l'heure actuelle, qu'une seule fois. Nous n'avons donc pas cherché à les interpréter de façon approfondie en réalisant les calculs nécessaires à une transposition quantitative *in vivo*. On peut également imaginer qu'une étude de métabolisation sur un modèle plus complexe tels que des hépatocytes isolés nous aurait fourni des données plus exhaustives sur la métabolisation de la Phenstatine.

Nous avons pu toutefois observer que certaines isoformes impliquées étaient également présentes dans le tissu prostatique et pouvaient également à ce niveau extra-hépatique modifier le devenir de la molécule originale.

Fura A, Shu YZ, Zhu M, Hanson RL, Roongta V, Humphreys WG, *Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery*. J Med Chem, 2004, **47**(18): p. 4339-51.
Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J, *Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery*. Curr Med Chem, 2008, **15**(23): p. 2346-65.

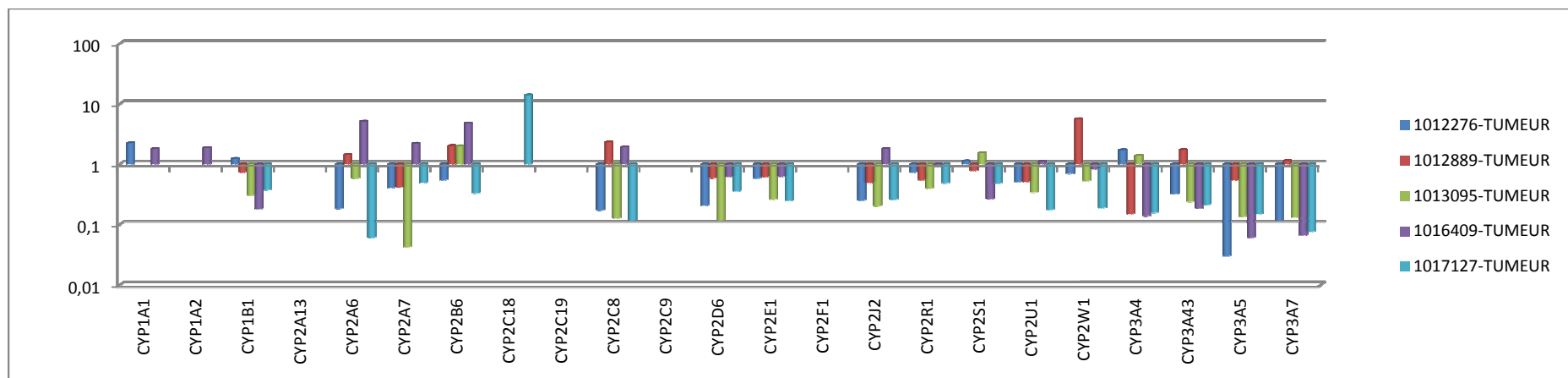


Fig. 59 : Expression relative logarithmique (log 10) exprimée en RQ des gènes CYPs de tumeurs prostatiques issues de biopsies des patients (1012276, 1012889, 1013095, 1016409 et 1017127) en comparaison avec ceux d'une tumeur issue de la biopsie du patient 0833950 (ligne de base)

Après avoir élucidé en partie le schéma métabolique de la Phenstatine, nous avons abordé le problème de l'impact de l'environnement sur cette métabolisation en recherchant directement l'effet du cadmium sur les expressions génique et protéique des CYPs impliqués. Le résultat le plus notable est la différence entre ces deux expressions, notamment dans le cas du CYP1A1 : surexpression génique et régulation négative de la protéine.

Ce résultat a pu être étayé par l'observation de la surexpression d'un nombre important de microARNs connus pour cibler le gène CYP1A1 et qui pourraient donc bloquer sa synthèse protéique.

Le travail effectué au cours de cette thèse offre donc beaucoup de perspectives pour compléter les résultats obtenus :

i) sur un modèle hépatique ne possédant pas toutes les capacités métaboliques (en particulier absence d'un grand nombre d'enzymes de phase II)

ii) sur un modèle de lignées cancéreuses prostatiques que nous aurions voulu comparer avec un plus grand panel de tissus provenant de patients

iii) sur une seule classe d'EMX : les cytochromes P450 les plus impliqués dans la métabolisation de composés exogènes

Sur ce dernier point et grâce à l'évaluation simultanée de 380 gènes du métabolisme par la technique du TLDA, nous avons déjà pu progresser et observer les modifications engendrées par le cadmium sur d'autres gènes du métabolisme sur des cellules PC3. Nos premières interprétations concernent certains facteurs de transcription et certains gènes impliqués dans le transport des xénobiotiques.

A l'exception du CYP2E1, l'induction de CYPs s'effectue par l'activation de facteurs de transcription spécifiques tels que AhR et de récepteurs nucléaires permettant la transcription tels que CAR et PXR. Les principaux récepteurs impliqués dans la régulation des EMX sont donc AhR qui régule les CYPs 1A1 et 1A2 (*Safe et Krishnan, 1995*), CAR pour les CYPs 2B6, 2C9 (*Sueyoshi et Negishi, 2001*) et 2C19 (*Guéguen et al, 2006*) et PXR pour les CYPs appartenant à la famille 3 (*Faucette et al, 2004 ; Sugatani et al, 2005*).

Faucette SR, Wang H, Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Lindley C, Yan B, Negishi M, LeCluyse EL, *Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers*. Drug Metab Dispos. 2004. **32**(3): p. 348-58.

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M, *Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance*. Ann Biol Clin (Paris), 2006. **64**(6): p. 535-48.

Safe S, Krishnan V. *Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression*. Arch Toxicol Suppl, 1995. **17**: p. 99-115.

Sueyoshi T, Negishi M. *Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 123-43.

Sugatani J, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M, *Regulation of the human UGT1A1 gene by nuclear receptors constitutive active/androstane receptor, pregnane X receptor, and glucocorticoid receptor*. Methods Enzymol, 2005. **400**: p. 92-104.

L'analyse de l'expression de ces facteurs de transcription par TLDA révèle que l'expression de AhR n'est pas modifiée en présence de cadmium et que les gènes CAR et PXR ne sont pas exprimés dans ces mêmes conditions.

Nous avons également porté un grand intérêt sur l'expression de gènes impliqués dans le transport des xénobiotiques notamment les métallothionéines, protéines connues pour détoxifier l'organisme de métaux tels que le cadmium. L'analyse en TLDA montre une expression modifiée de ces transporteurs. En effet, parmi les métallothionéines, MT 1B, 1F, 1M, 1X, 2A et 3 ont un niveau d'expression augmenté de manière dose-dépendante en cadmium (données retrouvées dans la littérature). De même, les cellules PC3 surexpriment, en présence de cadmium, certains transporteurs appartenant à la famille ABC (*ATP Binding Cassette*) tels que ABC C2, C6, C9 et G2 et SLC (*Solute Carriers*) tels que SLC 22A4, 28A1, 38A5, 3A1 et 7A7 (*Annexe 5*).

Une interprétation automatique et donc plus exhaustive de tels profils pourrait permettre d'approcher des pronostics relatifs à la réactivité des individus face à telle ou telle substance médicamenteuse, à condition bien sûr de connaître totalement les voies métaboliques de médicaments candidats et l'activité et / ou la toxicité des métabolites potentiels.

Un « fichage » des individus les plus susceptibles, en fonction de leur environnement et de leurs habitudes de vie (pollution atmosphérique, tabac, alcool, polymédication...), de développer des anomalies dans leur capacité de transformation de substances médicamenteuses, devrait permettre de progresser dans l'obtention de thérapies plus personnalisées. Ceci répondrait également aux critiques actuelles concernant bien souvent le manque d'apports supplémentaires dans nombre de nouveaux médicaments actuellement mis sur le marché.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Abshire MK, Devor DE, Diwan BA, Shaughnessy JD Jr, Waalkes MP, *In vitro* exposure to cadmium in rat L6 myoblasts can result in both enhancement and suppression of malignant progression in vivo. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(6): p. 1349-56.

Abu-Bakar A, Satarug S, Marks GC, Lang MA, Moore MR. Acute cadmium chloride administration induces hepatic and renal CYP2A5 mRNA, protein and activity in the mouse: involvement of transcription factor NRF2. *Toxicol Lett*, 2004. **148**(3): p. 199-210.

Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. **164**(3): p. 291-300.

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM, Waalkes MP, *Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(2): p. 455-8.

Ahn T, Kim M, Yun CH, Chae HJ, *Functional regulation of hepatic cytochrome p450 enzymes by physicochemical properties of phospholipids in biological membranes*. *Curr Protein Pept Sci*, 2007. **8**(5): p. 496-505.

Albrecht AL, Singh RK, Somji S, Sens MA, Sens DA, Garrett SH, *Basal and metal-induced expression of metallothionein isoform 1 and 2 genes in the RWPE-1 human prostate epithelial cell line*. *J Appl Toxicol*, 2008. **28**(3): p. 283-93.

Alvarez C, Alvarez R, Corchete P, Pérez-Melero C, Peláez R, Medarde M, *Synthesis and biological activity of naphthalene analogues of phenstatins: naphthylphenstatins*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007. **17**(12): p.3417-20.

Alvarez R, Alvarez C, Mollinedo F, Sierra BG, Medarde M, Peláez R, *Isocombretastatins A: 1,1-diarylethenes as potent inhibitors of tubulin polymerization and cytotoxic compounds*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(17): p. 6422-31.

Andujar P, Nemery B, *[Acute and subacute chemical pneumonitis]*. *Rev Mal Respir*, 2009. **26**(8): p. 867-85.

Anwar-Mohamed A, Elbekai RH, El-Kadi AO, *Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009. **5**(5): p. 501-21.

Apostolova MD, Christova T, Templeton DM, *Involvement of gelsolin in cadmium-induced disruption of the mesangial cell cytoskeleton*. *Toxicol Sci*, 2006. **89**(2): p. 465-74.

Aprile S, Del Grosso E, Tron GC, Grosa G, *In vitro* metabolism study of combretastatin A-4 in rat and human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 2007. **35**(12): p. 2252-61.

Arita A, Costa M, *Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium*. Metallomics, 2009. **1**(3): p. 222-8.

Asagba SO, *Alteration in the activity of oxidative enzymes in the tissues of male Wistar albino rats exposed to cadmium*. Int J Occup Med Environ Health, 2010. **23**(1): p. 55-62.

Asmuss M, Mullenders LH, Hartwig A, *Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins*. Toxicol Lett, 2000. 112-113: p. 227-31.

Attard G, Swennenhuis JF, Olmos D, Reid AH, Vickers E, A'Hern R, Levink R, Coumans F, Moreira J, Riisnaes R, Oommen NB, Hawche G, Jameson C, Thompson E, Sipkema R, Carden CP, Parker C, Dearnaley D, Kaye SB, Cooper CS, Molina A, Cox ME, Terstappen LW, de Bono JS, *Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2912-8.

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC, *DNA methylation and the regulation of gene transcription*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(2): p. 241-57.

- B -

Baccarelli A, Bollati V, *Epigenetics and environmental chemicals*. Curr Opin Pediatr, 2009. **21**(2): p. 243-51.

Baer-Dubowska W, Majchrzak-Celińska A, Cichocki M, *Pharmacoeepigenetics: a new approach to predicting individual drug responses and targeting new drugs*. Pharmacol Rep, 2011. **63**(2): p. 293-304.

Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ, *Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats*. Free Radic Biol Med, 1997. **22**(3): p. 471-8.

Bakshi S, Zhang X, Godoy-Tundidor S, Cheng RY, Sartor MA, Medvedovic M, Ho SM *Transcriptome analyses in normal prostate epithelial cells exposed to low-dose cadmium: oncogenic and immunomodulations involving the action of tumor necrosis factor*. Environ Health Perspect, 2008. **116**(6): p. 769-76.

Benbrahim-Tallaa L, Waterland RA, Dill AL, Webber MM, Waalkes MP, *Tumor suppressor gene inactivation during cadmium-induced malignant transformation of human prostate cells correlates with overexpression of de novo DNA methyltransferase*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(10): p. 1454-9.

Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, Glinsky GV, *Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells*. Cancer Res, 2005. **65**(6): p. 2378-86.

Bertin G, Averbeck D, Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie, 2006. **88**(11): p. 1549-59.

Beuten J, Gelfond JA, Byrne JJ, Balic I, Crandall AC, Johnson-Pais TL, Thompson IM, Price DK, Leach RJ, *CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(9): p. 1751-7.

Bièche I, Narjoz C, Asselah T, Vacher S, Marcellin P, Lidereau R, Beaune P, de Waziers I, *Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues*. *Pharmacogenet Genomics*, 2007. **17**(9):731-42.

Boon JP, Lewis WE, Goksøyr A, *Immunochemical and catalytic characterization of hepatic microsomal cytochrome P450 in the sperm whale (Physeter macrocephalus)*. *Aquat Toxicol*, 2001. **52**(3-4): p. 297-309.

Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho SM, Landolph J, Morrison H, Sonawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B, *Human prostate cancer risk factors*. *Cancer*, 2004. **101**(10 Suppl): p. 2371-490.

Boyd RB, *The NCI in vitro anticancer drug discovery screen*. In *Anticancer Drug Development Guide : Preclinical screening, Vlinical trials, and Approval ; teicher, B, Ed. ; Humana Press Inc : Totowa, NJ, 1997. p. 23-42.*

Bozcaarmutlu A, Arinç E, *Effect of mercury, cadmium, nickel, chromium and zinc on kinetic properties of NADPH-cytochrome P450 reductase purified from leaping mullet (Liza saliens)*. *Toxicol In Vitro*, 2007. **21**(3): p. 408-16.

Bracarda S, Logothetis C, Sternberg CN, Oudard S, *Current and emerging treatment modalities for metastatic castration-resistant prostate cancer*. *BJU Int*, 2011. **107** (Suppl 2): p. 13-20.

Bradley G, Juranka PF, Ling V. *Mechanism of multidrug resistance*. *Biochim Biophys Acta*, 1988. **948**(1): p. 87-128.

Bremner I, Campbell JK, *Effect of copper and zinc status on susceptibility to cadmium intoxication*. *Environ Health Perspect*, 1978. **25**: p. 125-8.

Brown CM, Reisfeld B, Mayeno AN, *Cytochromes P450: a structure-based summary of biotransformations using representative substrates*. *Drug Metab Rev*, 2008. **40**(1): p. 1-100.

Bryś M, Nawrocka AD, Miekoś E, Zydek C, Foksiński M, Barecki A, Krajewska WM, *Zinc and cadmium analysis in human prostate neoplasms*. *Biol Trace Elem Res*, 1997. **59**(1-3): p. 145-52.

Byrne C, Divekar SD, Storchan GB, Parodi DA, Martin MB, *Cadmium--a metallo hormone ?* *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **238**(3): p. 266-71.

- C -

- Caiafa P**, Zampieri M, *DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands*. J Cell Biochem, 2005. **94**(2): p. 257-65.
- Cashman JR**, Zhang J, *Human flavin-containing monooxygenases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 65-100.
- Cashman JR**, *Role of flavin-containing monooxygenase in drug development*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008. **4**(12): p. 1507-21.
- Chan HM**, Cherian MG. *Protective roles of metallothionein and glutathione in hepatotoxicity of cadmium*. Toxicology, 1992. **72**(3): p. 281-90.
- Chaudhary A**, Pandeya SN, Kumar P, Sharma PP, Gupta S, Soni N, Verma KK, Bhardwaj G, *Combretastatin a-4 analogs as anticancer agents*. Mini Rev Med Chem, 2007. **7**(12): p. 1186-205.
- Chen YC**, Pu YS, Wu HC, Wu TT, Lai MK, Yang CY, Sung FC, *Cadmium burden and the risk and phenotype of prostate cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 429.
- Cherian MG**, Kang YJ, *Metallothionein and liver cell regeneration*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(2): p. 138-44.
- Choudhuri S**, Cui Y, Klaassen CD, *Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **245**(3): p. 378-93.
- Choudhuri S**, *Small noncoding RNAs: biogenesis, function, and emerging significance in toxicology*. J Biochem Mol Toxicol, 2010. **24**(3): p. 195-216.
- Colloca G**, Venturino A, Checcaglini F, *Second-line chemotherapy in metastatic docétaxel-resistant prostate cancer: a review*. Med Oncol, 2011 Feb 20.
- Cottam D**, Rees R, *Regulation of matrix metalloproteinases - their role in tumor invasion and metastasis*. Int J Oncol, 1993. **2**(6): p. 861-72.
- Coughlin SS**, Neaton JD, Sengupta A, *Cigarette smoking as a predictor of death from prostate cancer in 348,874 men screened for the Multiple Risk Factor Intervention Trial*. Am J Epidemiol, 1996. **143**(10): p. 1002-6.
- Crespi CL**, Penman BW, *Use of cDNA-expressed human cytochrome P450 enzymes to study potential drug-drug interactions*. Adv Pharmacol, 1997. **43**: p. 171-88.

- D -

Daly AK, *Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms*. Clin Pharmacokinet, 2006. 45(1): p. 13-31.

Danielson PB, *The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans*. Curr Drug Metab, 2002. 3(6): p. 561-97.

Das PM and Singal R, *DNA methylation and cancer*. J Clin Oncol, 2004. 22(22): p. 4632-42.

de Chaisemartin L, Lorient MA, *[Pharmacogenetics of anticancer drugs]*. Pathol Biol (Paris), 2005. 53(2): p. 116-24.

Ding YF, Zhu C, *The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 386(1): p. 6-10.

Ding X, and L.S. Kaminsky, *Human extrahepatic cytochromes P450: function in xenobiotic metabolism and tissue-selective chemical toxicity in the respiratory and gastrointestinal tracts*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. 43: p. 149-73.

Dumontet C and Jordan MA. *Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics*. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(10): p. 790-803.

- E -

Eberlin LS, Dill AL, Costa AB, Ifa DR, Cheng L, Masterson T, Koch M, Ratliff TL, Cooks RG. *Cholesterol sulfate imaging in human prostate cancer tissue by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2010. 82(9): p. 3430-4.

Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. EMBO Rep, 2006. 7(10): p. 988-94.

Elbekai RH, El-Kadi AO, *Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium*. Toxicol Lett, 2007. 172(3): p. 106-19.

Elghany NA, Schumacher MC, Slattery ML, West DW, Lee JS, *Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer*. Epidemiology, 1990. 1(2): p. 107-15.

Endo T, Yoshikawa M, Ebara M, Kato K, Sunaga M, Fukuda H, Hayasaka A, Kondo F, Sugiura N, Saisho H, *Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents*. J Gastroenterol, 2004. 39(12): p. 1196-201.

Etienne-Manneville S. *From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players*. Curr Opin Cell Biol, 2010. 22(1): p. 104-11.

- F -

Faucette SR, Wang H, Hamilton GA, Jolley SL, Gilbert D, Lindley C, Yan B, Negishi M, LeCluyse EL, *Regulation of CYP2B6 in primary human hepatocytes by prototypical inducers*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(3): p. 348-58.

Feldman BJ, Feldman D, The development of androgen-independent prostate cancer. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 34-45.

Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanach BM, Surani MA, *Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 751-5.

Fernandez-Sauze S, Delfino C, Mabrouk K, Dussert C, Chinot O, Martin PM, Grisoli F, Ouafik L, Boudouresque F, *Effects of adrenomedullin on endothelial cells in the multistep process of angiogenesis: involvement of CRLR/RAMP2 and CRLR/RAMP3 receptors*. Int J Cancer, 2004. **108**(6): p. 797-804.

Feustel A, Wennrich R, Steiniger D, Klauss P, *Zinc and cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue and adenofibromyomatosis (BPH)*. Urol Res, 1982.**10**(6): p. 301-3.

Filipic M, Hei TK, *Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage*. Mutat Res, 2004. **546**(1-2): p. 81-91.

Finnström N, Bjelfman C, Söderström TG, Smith G, Egevad L, Norlén BJ, Wolf CR, Rane A. *Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR*. Eur J Clin Invest, 2001. **31**(10): p. 880-6.

Fizazi K, Sternberg CN, Fitzpatrick JM, Watson RW, Tabesh M, *Role of targeted therapy in the treatment of advanced prostate cancer*. BJU Int, 2010. **105**(6): p. 748-67.

Fontana E, Dansette PM, Poli SM, *Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity*. Curr Drug Metab, 2005. **6**(5): p. 413-54.

Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S, *Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer*. Urology, 2009. **74**(2): p. 391-7.

Fukami T, Nakajima M, Sakai H, Katoh M, Yokoi T, *CYP2A13 metabolizes the substrates of human CYP1A2, phenacetin, and theophylline*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(3): p. 335-9.

Fura A, Shu YZ, Zhu M, Hanson RL, Roongta V, Humphreys WG, *Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery*. J Med Chem, 2004. **47**(18): p. 4339-51.

- G -

Garrett SH, Sens MA, Shukla D, Nestor S, Somji S, Todd JH, Sens DA, *Metallothionein isoform 3 expression in the human prostate and cancer-derived cell lines*. Prostate, 1999. **41**(3): p. 196-202.

Garrett SH, Sens MA, Shukla D, Flores L, Somji S, Todd JH, Sens DA, *Metallothionein isoform 1 and 2 gene expression in the human prostate: downregulation of MT-1X in advanced prostate cancer*. Prostate, 2000. **43**(2): p. 125-35.

Ghinet A, Rigo B, Hénichart JP, Le Broc-Ryckewaert D, Pommery J, Pommery N, Thuru X, Quesnel B, Gautret P, *Synthesis and biological evaluation of phenstatin metabolites*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(20): p. 6042-54.

Glahn F, Schmidt-Heck W, Zellmer S, Guthke R, Wiese J, Golka K, Hergenröder R, Degen GH, Lehmann T, Hermes M, Schormann W, Brulport M, Bauer A, Bedawy E, Gebhardt R, Hengstler JG, Foth H, *Cadmium, cobalt and lead cause stress response, cell cycle deregulation and increased steroid as well as xenobiotic metabolism in primary normal human bronchial epithelial cells which is coordinated by at least nine transcription factors*. Arch Toxicol, 2008. **82**(8):513-24.

Golovine K, Makhov P, Uzzo RG, Kutikov A, Kaplan DJ, Fox E, Kolenko VM, *Cadmium down-regulates expression of XIAP at the post-transcriptional level in prostate cancer cells through an NF-kappaB-independent, proteasome-mediated mechanism*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 183.

Gomez A, Karlgren M, Edler D, Bernal ML, Mkrtchian S, Ingelman-Sundberg M, *Expression of CYP2W1 in colon tumors: regulation by gene methylation*. Pharmacogenomics, 2007. **8**(10): p. 1315-25.

Gomez A, Ingelman-Sundberg M, *Pharmacoeigenetics: its role in interindividual differences in drug response*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(4): p. 426-30.

Gomez A, Ingelman-Sundberg M, *Epigenetic and microRNA-dependent control of cytochrome P450 expression: a gap between DNA and protein*. Pharmacogenomics, 2009. **10**(7): p. 1067-76.

Goodman JI, Watson RE, *Altered DNA methylation: a secondary mechanism involved in carcinogenesis*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 501-25.

Green RM, Hodges NJ, Chipman JK, O'Donovan MR, Graham M, *Reactive oxygen species from the uncoupling of human cytochrome P450 1B1 may contribute to the carcinogenicity of dioxin-like polychlorinated biphenyls*. Mutagenesis, 2008. **23**(6): p. 457-63.

Gronberg H, *Prostate cancer epidemiology*. Lancet, 2003. **361**(9360): p. 859-64.

Guengerich FP, Wheeler JB, Chun YJ, Kim D, Shimada T, Aryal P, Oda Y, Gillam EM, *Use of heterologously-expressed cytochrome P450 and glutathione transferase enzymes in toxicity assays*. Toxicology, 2002. 181-182: p. 261-4.

Guengerich FP, Rendic S, *Update information on drug metabolism systems--2009, part I*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(1): p. 1-3.

Guéguen Y, Mouzat K, Ferrari L, Tissandie E, Lobaccaro JM, Batt AM, Paquet F, Voisin P, Aigueperse J, Gourmelon P, Souidi M, *Cytochromes P450: xenobiotic metabolism, regulation and clinical importance*. *Ann Biol Clin (Paris)*, 2006. **64**(6): p. 535-48.

Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, Glaise D, Morel F, Guguen-Guillouzo C, *The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics*. *Chem Biol Interact*, 2007. **168**(1): p.66-73.

- H -

Habib FK, Lee IR, Stich SR, Smith PH, *Androgen levels in the plasma and prostatic tissues of patients with benign hypertrophy and carcinoma of the prostate*. *J Endocrinol*, 1976. **71**(1): p. 99-107.

Haga A, Nagase H, Kito H, Sato T, *Enhanced invasiveness of tumour cells after host exposure to heavy metals*. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(13): p. 2342-7.

Haldsrud R, Krøkje A, *Induction of DNA double-strand breaks in the H4IIE cell line exposed to environmentally relevant concentrations of copper, cadmium, and zinc, singly and in combinations*. *J Toxicol Environ Health A*, 2009. **72**(3-4): p. 155-63.

Hamel E and Lin CM. *Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimetabolic agent, with tubulin*. *Biochem Pharmacol*, 1983. **32**(24): p. 3864-7.

Hammond JW, Cai D, Verhey KJ. *Tubulin modifications and their cellular functions*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(1): p. 71-6.

Hartwig A, *Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition*. *Toxicol Lett*, 1998. 102-103: p. 235-9.

Hayot C, Farinelle S, De Decker R, Decaestecker C, Darro F, Kiss R, Van Damme M, *In vitro pharmacological characterizations of the anti-angiogenic and anti-tumor cell migration properties mediated by microtubule-affecting drugs, with special emphasis on the organization of the actin cytoskeleton*. *Int J Oncol*, 2002. **21**(2): p. 417-25.

He P, Court MH, Greenblatt DJ, von Moltke LL, *Factors influencing midazolam hydroxylation activity in human liver microsomes*. *Drug Metab Dispos*, 2006. **34**(7): p.1198-207.

Hein DW, Trinidad A, Yerokun T, Ferguson RJ, Kirilin WG, Weber WW, *Genetic control of acetyl coenzyme A-dependent arylamine N-acetyltransferase, hydrazine N-acetyltransferase, and N-hydroxy-arylamine O-acetyltransferase enzymes in C57BL/6J, A/J, AC57F1, and the rapid and slow acetylators A.B6 and B6.A congenic inbred mouse*. *Drug Metab Dispos*, 1988. **16**(3):341-7.

Heinlein CA and Chang C. *Androgen receptor in prostate cancer*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 276-308.

Herman JG and Baylin SB, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(21): p. 2042-54.

Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J, de Martin R, *Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22064-8.

Hsu LC, Durrant DE, Huang CC, Chi NW, Baruchello R, Rondanin R, Rullo C, Marchetti P, Grisolia G, Simoni D, Lee RM. *Development of hemiasterlin derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization and synergize with a stilbene tubulin inhibitor*. *Invest New Drugs*, 2011.

Hudder A, Novak RF. *miRNAs: effectors of environmental influences on gene expression and disease*. *Toxicol Sci*, 2008. **103**(2): p. 228-40.

Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF, *Cadmium-induced cancers in animals and in humans*. *Int J Occup Environ Health*, 2007. **13**(2): p. 202-12.

Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J, *Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery*. *Curr Med Chem*, 2008. **15**(23): p. 2346-65.

- I -

Ikushiro S, Sahara M, Emi Y, Yabusaki Y, Iyanagi T, *Functional co-expression of xenobiotic metabolizing enzymes, rat cytochrome P450 1A1 and UDP-glucuronosyltransferase 1A6, in yeast microsomes*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1672**(2): p. 86-92.

Ingelman-Sundberg M, *Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004. **369**(1): p. 89-104.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects*. *Pharmacol Ther*, 2007. **116**(3): p. 496-526.

Ingelman-Sundberg M, Sim SC, *Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **396**(1): p. 90-4.

Ingelman-Sundberg M, Gomez A, *The past, present and future of pharmacoeconomicomics*. *Pharmacogenomics*, 2010. **11**(5): p. 625-7.

InVS, 2010 :

http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/donnees_generales.pdf

InVS, 2010 :

http://www.invs.sante.fr/applications/cancers/projections2010/donnees_localisation/prostate.pdf

- J -

Jamba L, Nehru B, Bansal MP, *Redox modulation of selenium binding proteins by cadmium exposures in mice*. Mol Cell Biochem, 1997. **177**(1-2): p. 169-75.

Järup L, Akesson A, *Current status of cadmium as an environmental health problem*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 201-8.

Jasani B, Schmid KW, *Significance of metallothionein overexpression in human tumours*. Histopathology, 1997. **31**(3): p. 211-4.

Jiang G, Xu L, Song S, Zhu C, Wu Q, Zhang L, Wu L, *Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells*. Toxicology, 2008. **244**(1): p. 49-55.

Jinawath A, Miyake S, Yanagisawa Y, Akiyama Y, Yuasa Y, *Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 557-64.

Johansson I, Ingelman-Sundberg M, *Genetic polymorphism and toxicology--with emphasis on cytochrome p450*. Toxicol Sci, 2011. **120**(1): p. 1-13.

John K, Ragavan N, Pratt MM, Singh PB, Al-Buheissi S, Matanhelia SS, Phillips DH, Poirier MC, Martin FL, *Quantification of phase I/II metabolizing enzyme gene expression and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct levels in human prostate*. Prostate, 2009. **69**(5): p. 505-19.

Johnson NP, Wang K, *Is ovarian surgery effective for androgenic symptoms of polycystic ovarian syndrome?* J Obstet Gynaecol, 2003. **23**(6): p. 599-606.

Jordan MA and Wilson L, *Microtubules as a target for anticancer drugs*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.

Jordan MA and Kamath K, *How do microtubule-targeted drugs work? An overview*. Curr Cancer Drug Targets. 2007. **7**(8): p. 730-42.

Joseph P, Muchnok TK, Klishis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong T, *Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species*. Toxicol Sci, 2001. **61**(2): p. 295-303.

Joseph P, *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 272-9.

- K -

Kacevska M, Ivanov M, Ingelman-Sundberg M, *Perspectives on epigenetics and its relevance to adverse drug reactions*. Clin Pharmacol Ther, 2011. **89**(6): p. 902-7.

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. Invest Urol, 1979. **17**(1): p. 16-23.

Karlgren M, Gomez A, Stark K, Svärd J, Rodriguez-Antona C, Oliw E, Bernal ML, Ramón y Cajal S, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, *Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 451-8.

Keshet I, Lieman-Hurwitz J, Cedar H, *DNA methylation affects the formation of active chromatin*. Cell, 1986. **44**(4): p. 535-43.

Keuorkian L, Young DA, Darrah C, Donell ST, Shepstone L, Porter S, Brockbank SM, Edwards DR, Parker AE, Clark IM, *Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(1): p. 131-41.

Khojasteh SC, Prabhu S, Kenny JR, Halladay JS, Lu AY, *Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2011. **36**(1): p.1-16.

Kim BJ, Kim MS, Kim KB, Kim KW, Hong YM, Kim IK, Lee HW, Jung YK, *Sensitizing effects of cadmium on TNF-alpha- and TRAIL-mediated apoptosis of NIH3T3 cells with distinct expression patterns of p53*. Carcinogenesis, 2002. **23**(9): p. 1411-7.

Kishikawa S, Ugai H, Murata T, Yokoyama KK, *Roles of histone acetylation in the Dnmt1 gene expression*. Nucleic Acids Res Suppl, 2002. (2): p. 209-10.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA, *Metallothionein protection of cadmium toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 215-20.

Klingenberg M, *Pigments of rat liver microsomes*. Arch Biochem Biophys, 1958. **75**(2): p. 376-86.

Kollock R, Rost K, Batke M, Glatt H, *Effect of pentachlorophenol and 2,6-dichloro-4-nitrophenol on the activity of cDNA-expressed human alcohol and aldehyde dehydrogenases*. Toxicol Lett, 2009. **191**(2-3): p. 360-4.

Kot M, Daniel WA, *Effect of diethylthiocarbamate (DDC) and ticlopidine on CYP1A2 activity and caffeine metabolism: an in vitro comparative study with human cDNA-expressed CYP1A2 and liver microsomes*. Pharmacol Rep, 2009. **61**(6): p. 1216-20.

Krendel M, Zenke FT, Bokoch GM. *Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(4): p. 294-301.

Kuehne ME, Bornmann WG, Markó I, Qin Y, LeBoulluec KL, Frasier DA, Xu F, Mulamba T, Ensinger CL, Borman LS, Huot AE, Exon C, Bizzarro FT, Cheung JB, Bane SL, *Syntheses*

and biological evaluation of vinblastine congeners. *Org Biomol Chem*, 2003. **1**(12): p. 2120-36.

Kumagai J, Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Blumberg B, Inoue S, *Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer*. *Prostate*, 2007. **67**(10): p. 1029-37.

Kumar V, Yadav CS, Singh S, Goel S, Ahmed RS, Gupta S, Grover RK, Banerjee BD, *CYP 1A1 polymorphism and organochlorine pesticides levels in the etiology of prostate cancer*. *Chemosphere*, 2010. **81**(4): p. 464-8.

Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Kobayashi K, Koyama H, Arakawa K, Nagamine T, *The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure*. *Biometals*, 2008. **21**(1): p. 71-81.

- L -

Lacorte LM, Delella FK, Porto Amorim EM, Justulin LA Jr, Godinho AF, Almeida AA, Felipe Pinheiro PF, Amorim RL, Felisbino SL, *Early changes induced by short-term low-dose cadmium exposure in rat ventral and dorsolateral prostates*. *Microsc Res Tech*, 2011.

Laursen T, Jensen K, Møller BL, *Conformational changes of the NADPH-dependent cytochrome P450 reductase in the course of electron transfer to cytochromes P450*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1814**(1): p. 132-8.

Le Broc-Ryckewaert D, Pommery N, Pommery J, Ghinet A, Farce A, Wiart JF, Gautret P, Rigo B, Hénichart JP, *In vitro Metabolism of Phenstatin: Potential Pharmacological Consequences*. *Drug Metab Lett*, 2011. **5**(3): p. 209-15.

Lee JD, Wu SM, Lu LY, Yang YT, Jeng SY, *Cadmium concentration and metallothionein expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia of humans*. *J Formos Med Assoc*, 2009. **108**(7): p. 554-9.

Lee YW, Broday L, Costa M, *Effects of nickel on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels*. *Mutat Res*, 1998. **415**(3): p. 213-8.

Leskelä S, Honrado E, Montero-Conde C, Landa I, Cascón A, Letón R, Talavera P, Cózar JM, Concha A, Robledo M, Rodríguez-Antona C, *Cytochrome P450 3A5 is highly expressed in normal prostate cells but absent in prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2007. **14**(3): p. 645-54.

Lewis DF, Ito Y, *Human CYPs involved in drug metabolism: structures, substrates and binding affinities*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2010. **6**(6): p. 661-74.

Li E, Beard C, Jaenisch R, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. *Nature*, 1993. **366**(6453): p. 362-5.

Li Y, Cui Y, Hart SN, Klaassen CD, Zhong XB, *Dynamic patterns of histone methylation are associated with ontogenic expression of the Cyp3a genes during mouse liver maturation*. *Mol Pharmacol*, 2009. **75**(5): p. 1171-9.

Lima MM Jr, Oliveira MN, Granja F, Trindade AC, De Castro Santos LE, Ward LS, *Lack of association of GSTT1, GSTM1, GSTO1, GSTP1 and CYP1A1 polymorphisms for susceptibility and outcome in Brazilian prostate cancer patients.* Folia Biol (Praha), 2008. **54**(3): p. 102-8.

Liu F and Jan KY, *DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells.* Free Radic Biol Med, 2000. **28**(1): p. 55-63.

Liu J, Qu W, Kadiiska MB, *Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis.* Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **238**(3): p. 209-14.

Lu AY, Wang RW, Lin JH, *Cytochrome P450 in vitro reaction phenotyping: a re-evaluation of approaches used for P450 isoform identification.* Drug Metab Dispos, 2003. **31**(4): p. 345-50.

- M -

Magalhães HI, Bezerra DP, Cavalcanti BC, Wilke DV, Rotta R, de Lima DP, Beatriz A, Alves AP, Bitencourt Fda S, de Figueiredo IS, Alencar NM, Costa-Lotufo LV, Moraes MO, Pessoa C. *In vitro and in vivo antitumor effects of (4-methoxyphenyl)(3,4,5-trimethoxyphenyl)methanone.* Cancer Chemother Pharmacol, 2011. **68**(1): p. 45-52.

Maier A, Dalton TP, Puga A. *Disruption of dioxin-inducible phase I and phase II gene expression patterns by cadmium, chromium, and arsenic.* Mol Carcinog, 2000. **28**(4): p. 225-35.

Manca D, Ricard AC, Tra HV, Chevalier G, *Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium.* Arch Toxicol, 1994. **68**(6): p. 364-9.

Marrelli M, Conforti F, Statti GA, Cachet X, Michel S, Tillequin F, Menichini F, *Biological potential and structure-activity relationships of most recently developed vascular disrupting agents: an overview of new derivatives of natural combretastatin a-4.* Curr Med Chem, 2011. **18**(20): p. 3035-81.

Martin MB, Voeller HJ, Gelmann EP, Lu J, Stoica EG, Hebert EJ, Reiter R, Singh B, Danielsen M, Pentecost E, Stoica A, *Role of cadmium in the regulation of AR gene expression and activity.* Endocrinology, 2002. **143**(1): p. 263-75.

Martin FL, Patel II, Sozeri O, Singh PB, Ragavan N, Nicholson CM, Frei E, Meinel W, Glatt H, Phillips DH, Arlt VM, *Constitutive expression of bioactivating enzymes in normal human prostate suggests a capability to activate pro-carcinogens to DNA-damaging metabolites.* Prostate, 2010. **70**(14): p. 1586-99.

Martinez-Zamudio R, Ha HC, *Environmental epigenetics in metal exposure.* Epigenetics. 2011. **6**(7): p. 820-7.

McLean KJ, Girvan HM, Munro AW, *Cytochrome P450/redox partner fusion enzymes: biotechnological and toxicological prospects.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2007. **3**(6): p. 847-63.

Messaoudi S, Tréguier B, Hamze A, Provot O, Peyrat JF, De Losada JR, Liu JM, Bignon J, Wdzieczak-Bakala J, Thoret S, Dubois J, Brion JD, Alami M, *Isocombretastatins a versus combretastatins a: the forgotten isoCA-4 isomer as a highly promising cytotoxic and antitubulin agent*. J Med Chem, 2009. **52**(14): p. 4538-42.

Mestres J, *Structure conservation in cytochromes P450*. Proteins, 2005. **58**(3): p. 596-609.

Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, [*Xenobiotics and transcriptional regulation*]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2003. **48**(16): p. 2261-6.

Mitsuda M, Iwasaki M, Asahi S, *Cynomolgus monkey cytochrome P450 2C43: cDNA cloning, heterologous expression, purification and characterization*. J Biochem, 2006. **139**(5): p. 865-72.

Murata M, Watanabe M, Yamanaka M, Kubota Y, Ito H, Nagao M, Katoh T, Kamataki T, Kawamura J, Yatani R, Shiraishi T, *Genetic polymorphisms in cytochrome P450 (CYP) 1A1, CYP1A2, CYP2E1, glutathione S-transferase (GST) M1 and GSTT1 and susceptibility to prostate cancer in the Japanese population*. Cancer Lett, 2001. **165**(2): p. 171-7.

- N -

Nakamura K, Yasunaga Y, Ko D, Xu LL, Moul JW, Peehl DM, Srivastava S, Rhim JS. *Cadmium-induced neoplastic transformation of human prostate epithelial cells*. Int J Oncol, 2002. **20**(3): p. 543-7.

Nan X, Campoy FJ, Bird A, *MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin*. Cell, 1997. **88**(4): p. 471-81.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A, *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.

Nelson D, <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>

Nettleton DO, Einolf HJ, *Assessment of cytochrome p450 enzyme inhibition and inactivation in drug discovery and development*. Curr Top Med Chem, 2011. **11**(4): p. 382-403.

Newcomb M, Hollenberg PF, Coon MJ, *Multiple mechanisms and multiple oxidants in P450-catalyzed hydroxylations*. Arch Biochem Biophys, 2003. **409**(1): p. 72-9.

Newton DJ, Wang RW, Lu AY, *Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes*. Drug Metab Dispos, 1995. **23**(1): p. 154-8.

Nguyen TL, McGrath C, Hermone AR, Burnett JC, Zaharevitz DW, Day BW, Wipf P, Hamel E, Gussio R, *A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach*. J Med Chem, 2005. **48**(19): p. 6107-16.

Nicolaou KC, Yang Z, Liu JJ, Ueno H, Nantermet PG, Guy RK, Claiborne CF, Renaud J, Couladouros EA, Paulvannan K. *Total synthesis of taxol*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 630-4.

Nishimura M, Naito S, *Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes*. Drug Metab Pharmacokinet, 2006. **21**(5): p. 357-74.

Nomura T, Yamasaki M, Nomura Y, Mimata H, *Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells*. Oncol Rep, 2005. **14**(4): p. 993-7.

Nordberg GF, *Historical perspectives on cadmium toxicology*. Toxicol Appl Pharmacol. 2009. **238**(3): p. 192-200.

Nussio MR, Voelcker NH, Miners JO, Lewis BC, Sykes MJ, Shapter JG, *AFM study of the interaction of cytochrome P450 2C9 with phospholipid bilayers*. Chem Phys Lipids, 2010. **163**(2): p. 182-9.

Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R, *Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(20): p. 2313-8.

- O -

Obligacion R, Murray M, Ramzan I, *Drug-metabolizing enzymes and transporters: expression in the human prostate and roles in prostate drug disposition*, 2006. **27**(2): p. 138-50. Epub 2005 Dec 5.

Ogunlewe JO, and Osegbe DN, *Zinc and cadmium concentrations in indigenous blacks with normal, hypertrophic, and malignant prostate*. Cancer, 1989. **63**(7): p. 1388-92.

Okino ST, Pookot D, Li LC, Zhao H, Urakami S, Shiina H, Igawa M, Dahiya R, *Epigenetic inactivation of the dioxin-responsive cytochrome P4501A1 gene in human prostate cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(15): p. 7420-8.

Oliveira SC, Corduneanu O, Oliveira-Brett AM, *In situ evaluation of heavy metal-DNA interactions using an electrochemical DNA biosensor*. Bioelectrochemistry, 2008. **72**(1): p. 53-8.

Omura T, Sato R, *A new cytochrome in liver microsomes*. J Biol Chem, 1962. **237**: p. 1375-6.

- P -

Padjen K, Ratnam S, Storb U, *DNA methylation precedes chromatin modifications under the influence of the strain-specific modifier Ssm1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(11): p. 4782-91.

Pan J, Plant JA, Voulvoulis N, Oates CJ, Ihlenfeld C, *Cadmium levels in Europe: implications for human health*. Environ Geochem Health, 2010. **32**(1): p. 1-12.

Papaggeli PC, Kortsaris AC, Matsouka PT, Aberrant methylation of c-myc and c-fos protooncogenes and p53 tumor suppressor gene in myelodysplastic syndromes and acute non-lymphocytic leukemia. *J BUON*, 2003. **8**(4): p. 341-50.

Partin AW, Mangold LA, Lamm DM, Walsh PC, Epstein JI, Pearson JD, *Contemporary update of prostate cancer staging nomograms (Partin Tables) for the new millennium*. *Urology*, 2001. **58**(6): p. 843-8.

Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P, *The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2008. **48**: p. 1-32.

Pavek P, Dvorak Z, *Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues*. *Curr Drug Metab*, 2008. **9**(2): p. 129-43.

Pearce R, Greenway D, Parkinson A, *Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation*. *Arch Biochem Biophys*, 1992. **298**(1): p. 211-25.

Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A, *Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **331**(2): p. 145-69.

Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H, *Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status*. *Arch Toxicol*, 2008. **82**(10): p. 667-715.

Pettit GR, Cragg GM, Herald DL, Schmidt JM, Lohavanijaya P, *Isolation and structure of combretastatin*. *Can J Chem*, 1982. **60**: p. 1374-6.

Pettit GR, Singh SB, Hamel E, Lin CM, Alberts DS, Garcia-Kendall D. *Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4*. *Experientia*. 1989. **45**(2): p. 209-11.

Pettit GR, Toki B, Herald DL, Verdier-Pinard P, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK, *Antineoplastic agents. 379. Synthesis of phenstatin phosphate*. *J Med Chem*, 1998. **41**(10): p. 1688-95.

Pettit GR, Grealish MP, Herald DL, Boyd MR, Hamel E, Pettit RK, *Antineoplastic agents. 443. Synthesis of the cancer cell growth inhibitor hydroxyphenstatin and its sodium diphosphate prodrug*. *J Med Chem*, 2000. **43**(14): p. 2731-7.

Pettit GR, Grealish MP, Jung MK, Hamel E, Pettit RK, Chapuis JC, Schmidt JM, *Antineoplastic agents. 465. Structural modification of resveratrol: sodium resverastatin phosphate*. *J Med Chem*, 2002. **45**(12):2534-42.

Pettit GR, Anderson CR, Gapud EJ, Jung MK, Knight JC, Hamel E, Pettit RK. *Antineoplastic agents. 515. Synthesis of human cancer cell growth inhibitors derived from 3,4-methylenedioxy-5,4'-dimethoxy-3'-amino-Z-stilbene*. *J Nat Prod*, 2005. **68**(8): p. 1191-7.

Plaskon LA, Penson DF, Vaughan TL, Stanford JL, *Cigarette smoking and risk of prostate cancer in middle-aged men*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(7): p. 604-9.

Plewka A, Plewka D, Nowaczyk G, Brzóska MM, Kamiński M, Moniuszko-Jakoniuk J, *Effects of chronic exposure to cadmium on renal cytochrome P450-dependent monooxygenase system in rats*. *Arch Toxicol*, 2004. **78**(4): p. 194-200.

Poirier LA, Vlasova TI, *The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(5): p. 793-5.

Prins GS, *Endocrine disruptors and prostate cancer risk*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(3): p. 649-56.

- R -

Ragavan N, Hewitt R, Cooper LJ, Ashton KM, Hindley AC, Nicholson CM, Fullwood NJ, Matanhelia SS, Martin FL, *CYP1B1 expression in prostate is higher in the peripheral than in the transition zone*. *Cancer Lett*, 2004. **215**(1): p. 69-78.

Ragunathan N, Dairou J, Sanfins E, Busi F, Noll C, Janel N, Dupret JM, Rodrigues-Lima F, *Cadmium alters the biotransformation of carcinogenic aromatic amines by arylamine N-acetyltransferase xenobiotic-metabolizing enzymes: molecular, cellular, and in vivo studies*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(12): p. 1685-91.

Ravelli RB, Gigant B, Curmi PA, Jourdain I, Lachkar S, Sobel A, Knossow M. *Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain*. *Nature*, 2004. **428**(6979): p. 198-202.

Rendic S, *Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data*. *Drug Metab Rev*, 2002. **34**(1-2): p. 83-448.

Rendic S, Guengerich FP, *Update information on drug metabolism systems--2009, part II: summary of information on the effects of diseases and environmental factors on human cytochrome P450 (CYP) enzymes and transporters*. *Curr Drug Metab*, 2010. **11**(1): p. 4-84.

Ridderström M, Zamora I, Fjellström O, Andersson TB, *Analysis of selective regions in the active sites of human cytochromes P450, 2C8, 2C9, 2C18, and 2C19 homology models using GRID/CPCA*. *J Med Chem*, 2001. **44**(24): p. 4072-81.

Romagnoli R, Baraldi PG, Jung MK, Iaconinoto MA, Carrion MD, Remusat V, Preti D, Tabrizi MA, Francesca F, De Clercq E, Balzarini J, Hamel E, *Synthesis and preliminary biological evaluation of new anti-tubulin agents containing different benzoheterocycles*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005. **15**(18): p. 4048-52.

Romagnoli R, Baraldi PG, Pavani MG, Tabrizi MA, Preti D, Fruttarolo F, Piccagli L, Jung MK, Hamel E, Borgatti M, Gambari R, *Synthesis and biological evaluation of 2-amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-5-aryl thiophenes as a new class of potent antitubulin agents*. *J Med Chem*, 2006. **49**(13): p.3906-15.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB, *DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer*. *Oncogene*, 2001. **20**(24):3156-65.

- S -

Safe S, Krishnan V. *Cellular and molecular biology of aryl hydrocarbon (Ah) receptor-mediated gene expression*. *Arch Toxicol Suppl*, 1995. **17**: p. 99-115.

Salazar-Medina AJ, García-Rico L, García-Orozco KD, Valenzuela-Soto E, Contreras-Vergara CA, Arreola R, Arvizu-Flores A, Sotelo-Mundo RR. *Inhibition by Cu²⁺ and Cd²⁺ of a mu-class glutathione S-transferase from shrimp *Litopenaeus vannamei**. *J Biochem Mol Toxicol*, 2010. **24**(4): p. 218-22.

Sanna VK, Jaggi M, Kumar V, Burman AC, *Evaluation of 5-hydroxy-2,3-diaryl (substituted)-cyclopent-2-en-1-ones as cis-restricted analogues of combretastatin A-4 as novel anti angiogenic and anticancer agents*. *Invest New Drugs*, 2010. **28**(4): p. 363-80.

Sarafanov AG, Todorov TI, Centeno JA, Macias V, Gao W, Liang WM, Beam C, Gray MA, Kajdacsy-Balla AA, *Prostate cancer outcome and tissue levels of metal ions*. *Prostate*, 2011. **71**(11): p. 1231-8.

Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA, *Cadmium, environmental exposure, and health outcomes*. *Environ Health Perspect*, 2010. **118**(2): p. 182-90.

Sato K, Fukata H, Kogo Y, Ohgane J, Shiota K, Mori C, *Neonatal exposure to diethylstilbestrol alters the expression of DNA methyltransferases and methylation of genomic DNA in the epididymis of mice*. *Endocr J*, 2006. **53**(3): p. 331-7.

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF, *7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(5): p. 3054-9.

Schaufler K, Haslmayer P, Jäger W, Pec M, Thalhammer T. *The environmental toxin 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces cytochrome P450 activity in high passage PC 3 and DU 145 human prostate cancer cell lines*. *Int J Mol Med*, 2002. **9**(4): p. 411-6.

Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, Riedl SJ, *Targeting XIAP for the treatment of malignancy*. *Cell Death Differ*, 2006. **13**(2): p. 179-88.

Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(11): p. 2517-24.

Schöpfer J, Drasch G, Schrauzer GN, *Selenium and cadmium levels and ratios in prostates, livers, and kidneys of nonsmokers and smokers*. *Biol Trace Elem Res*, 2010. **134**(2): p. 180-7.

Schrauzer GN, *Interactive effects of selenium and cadmium on mammary tumor development and growth in MMTV-infected female mice. A model study on the roles of cadmium and selenium in human breast cancer.* Biol Trace Elem Res, 2008. **123**(1-3): p. 27-34.

Schuetz EG, Furuya KN, Schuetz JD, *Interindividual variation in expression of P-glycoprotein in normal human liver and secondary hepatic neoplasms.* J Pharmacol Exp Ther, 1995. **275**(2): p. 1011-8.

Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD, *P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(9): p. 4001-5.

Schuetz EG, Schinkel AH, *Drug disposition as determined by the interplay between drug-transporting and drug-metabolizing systems.* J Biochem Mol Toxicol, 1999. **13**(3-4): p. 219-22.

Schultz JD, Mühlheim K, Erben P, Hofheinz R.D, Faber A, Thorn C, Sommer JU, Hörmann K, Sauter A, *Chemotherapeutic alteration of VEGF-/PDGF- and PDGF-R α / β expression by imatinib in HPV-transformed squamous cell carcinoma compared to HPV-negative HNSCC in vitro.* Oncol Rep, 2011.

Seruga B, Ocana A, Tannock IF, *Drug resistance in metastatic castration-resistant prostate cancer.* Nat Rev Clin Oncol, 2011. **8**(1): p. 12-23.

Shan Y, Zhang J, Liu Z, Wang M, Dong Y. *Developments of combretastatin A-4 derivatives as anticancer agents.* Curr Med Chem, 2011. **18**(4): p. 523-38.

Singh PB, Ragavan N, Ashton KM, Basu P, Nadeem SM, Nicholson CM, Krishna RK, Matanhelia SS, Martin FL, *Quantified gene expression levels for phase I/II metabolizing enzyme and estrogen receptor levels in benign prostate from cohorts designated as high-risk (UK) versus low-risk (India) for adenocarcinoma at this organ site: a preliminary study.* Asian J Androl, 2010. **12**(2): p. 203-14.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR, *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening.* J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.

Sonn GA, Aronson W, and Litwin MS, *Impact of diet on prostate cancer: a review.* Prostate Cancer Prostatic Dis, 2005. **8**(4): p. 304-10.

Spruill MD, Song B, Whong WZ, Ong T, *Proto-oncogene amplification and overexpression in cadmium-induced cell transformation.* J Toxicol Environ Health A, 2002. **65**(24): p. 2131-44.

Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, Lipp J, *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis.* J Exp Med, 1998. **188**(1): p. 211-6.

Sterling KM Jr, Cutroneo KR, *Constitutive and inducible expression of cytochromes P4501A (CYP1A1 and CYP1A2) in normal prostate and prostate cancer cells.* J Cell Biochem, 2004. **91**(2): p. 423-9.

Stirzaker C, Song JZ, Davidson B, Clark SJ, *Transcriptional gene silencing promotes DNA hypermethylation through a sequential change in chromatin modifications in cancer cells.* Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3871-7.

Stoica A, Katzenellenbogen BS, Martin MB, *Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium.* Mol Endocrinol, 2000. **14**(4): p. 545-53.

Stone A, Ratnasinghe LD, Emerson GL, Modali R, Lehman T, Runnells G, Carroll A, Carter W, Barnhart S, Rasheed AA, Greene G, Johnson DE, Ambrosone CB, Kadlubar FF, Lang NP, *CYP3A43 Pro(340)Ala polymorphism and prostate cancer risk in African Americans and Caucasians.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(5): p. 1257-61.

Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. *Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145).* Int J Cancer, 1978. **21**(3): p. 274-81.

Sueyoshi T, Negishi M. *Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001. **41**: p. 123-43.

Sugatani J, Sueyoshi T, Negishi M, Miwa M, *Regulation of the human UGT1A1 gene by nuclear receptors constitutive active/androstane receptor, pregnane X receptor, and glucocorticoid receptor.* Methods Enzymol, 2005. **400**: p. 92-104.

Suzuki T, Umeyama T, Ohma C, Yamanaka H, Suzuki K, Nakajima K, Kimura M, *Immunohistochemical study of metallothionein in normal and benign prostatic hyperplasia of human prostate .* Prostate, 1991. **19**(1):35-42.

Suzuki K, Matsui H, Nakazato H, Koike H, Okugi H, Hasumi M, Ohtake N, Nakata S, Takei T, Hatori M, Ito K, Yamanaka H, *Association of the genetic polymorphism in cytochrome P450 (CYP) 1A1 with risk of familial prostate cancer in a Japanese population: a case-control study.* Cancer Lett, 2003. **195**(2): p. 177-83.

- T -

Tabaczar S, Koceva-Chyła A, Matczak K, Gwoździński K. *Molecular mechanisms of antitumor activity of taxanes. I. Interaction of docétaxel with microtubules.* Postepy Hig Med Dosw, 2010. **64**: p. 568-81.

Takagi S, Nakajima M, Mohri T, Yokoi T, *Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4.* J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 9674-80.

Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, Shiina H, Igawa M, Dahiya R, *Polymorphisms of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **296**(4): p. 820-6.

Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, Oudard S, Théodore C, James ND, Turesson I, Rosenthal MA, Eisenberger MA; TAX 327 Investigators, *Docétaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. N Engl J Med, 2004. **351**(15): p. 1502-12.

Tate PH, Bird AP, *Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression*. Curr Opin Genet Dev, 1993. **3**(2): p. 226-31.

Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R, *Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5793-801.

Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC, *Disrupting tumour blood vessels*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(6): p. 423-35.

Tran TH, Von Moltke LL, Venkatakrisnan K, Granda BW, Gibbs MA, Obach RS, Harmatz JS, Greenblatt DJ, *Microsomal protein concentration modifies the apparent inhibitory potency of CYP3A inhibitors*. Drug Metab Dispos, 2002. **30**(12): p. 1441-5.

Tron GC, Pirali T, Sorba G, Pagliai F, Busacca S, Genazzani AA, *Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions*. J Med Chem, 2006. **49**(11): p. 3033-44.

Tsuchiya Y, Nakajima M, Takagi S, Taniya T, Yokoi T, *MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9090-8.

Turesky RJ, *The role of genetic polymorphisms in metabolism of carcinogenic heterocyclic aromatic amines*. Curr Drug Metab, 2004. **5**(2): p. 169-80.

- U -

Uren AG, Beilharz T, O'Connell MJ, Bugg SJ, van Driel R, Vaux DL, Lithgow T, *Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(18): p. 10170-5.

- V -

Vaclavikova R, Soucek P, Svobodova L, Anzenbacher P, Simek P, Guengerich FP, Gut I, *Different in vitro metabolism of paclitaxel and docétaxel in humans, rats, pigs, and minipigs*. Drug Metab Dispos, 2004. **32**(6): p. 666-74.

Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, Kaminsky LS, *Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(7): p. 999-1006.

Valko M, Morris H, Cronin MT, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12**(10): p. 1161-208.

VandenBrink BM, Isoherranen N, *The role of metabolites in predicting drug-drug interactions: focus on irreversible cytochrome P450 inhibition*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2010. **13**(1): p. 66-77.

Verdier-Pinard P, Wang F, Burd B, Angeletti RH, Horwitz SB, Orr GA, *Direct analysis of tubulin expression in cancer cell lines by electrospray ionization mass spectrometry*. Biochemistry, 2003. **42**(41): p. 12019-27.

Viala A et Botta A (Coordonateurs), *Toxicologie*. 2^{ème} édition, 2009. Edition Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Von Weymarn LB, Murphy SE. *CYP2A13-catalysed coumarin metabolism: comparison with CYP2A5 and CYP2A6*. Xenobiotica, 2003. **33**(1): p. 73-81.

- W -

Waalkes MP, Poirier LA, *In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium, and zinc*. Toxicol Appl Pharmacol, 1984. **75**(3): p. 539-46.

Waalkes MP, Rehm S, *Cadmium and prostate cancer*. J Toxicol Environ Health, 1994. **43**(3): p. 251-69.

Wadelius M, Autrup JL, Stubbins MJ, Andersson SO, Johansson JE, Wadelius C, Wolf CR, Autrup H, Rane A, *Polymorphisms in NAT2, CYP2D6, CYP2C19 and GSTP1 and their association with prostate cancer*. Pharmacogenetics, 1999. **9**(3): p. 333-40.

Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D, *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology, 2003. **192**(2-3): p. 95-117.

Wang JF, Zhang CC, Chou KC, Wei DQ, *Structure of cytochrome p450s and personalized drug*. Curr Med Chem, 2009. **16**(2): p. 232-44.

Werck-Reichhart D, Feyereisen R, *Cytochromes P450: a success story*. Genome Biol, 2000. **1**(6) : p. 1-9.

Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, Otter C, Andersson TB, Johansson I, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M, *Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism*. Drug Metab Dispos, 2003. **31**(6): p. 755-61.

WHO, Cadmium : Environmental health criteria, 134 Geneva : World health Organisation. 1992a.

WHO, Cadmium : Environmental aspect, environmental health criteria, 135 Geneva : World health Organisation. 1992b.

Wienkers LC, Heath TG, *Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 825-33.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE, *Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity*. Mol Cell, 2000. **5**(1):121-31.

Wloga D and Gaertig J, *Post-translational modifications of microtubules*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 20): p. 3447-55.

Won EJ, Kim RO, Rhee JS, Park GS, Lee J, Shin KH, Lee YM, Lee JS, *Response of glutathione S-transferase (GST) genes to cadmium exposure in the marine pollution indicator worm, *Perinereis nuntia**. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2011. **154**(2): p. 82-92.

Wu CC, Pu YS, Wu HC, Yang CY, Chen YC, *Reversed association between levels of prostate specific antigen and levels of blood cadmium and urinary cadmium*. Chemosphere, 2011. **83**(8): p. 1188-91.

- X -

Xia B, Wang D, Fox LM, *Preclinical pharmacokinetics and metabolism of MNP001, a piperidine analog of 3-carbamyl compounds*. Biopharm Drug Dispos, 2011. **32**(1): p. 25-37.

- Y -

Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD, *Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli*. Science, 2000. **288**(5467): p. 874-7.

Yano JK, Koo LS, Schuller DJ, Li H, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL, *Crystal structure of a thermophilic cytochrome P450 from the archaeon *Sulfolobus solfataricus**. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31086-92.

Yarnell AT, *Heavy-Hydrogen Drugs Turn Heads, Again*. Science Technol, 2009. **87**(25) : p. 36-39.

Yasuda K, Lan LB, Sanglard D, Furuya K, Schuetz JD, Schuetz EG, *Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(1): p. 323-32.

Yokochi T, Robertson KD, *Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase *Dnmt3a**. J Biol Chem, 2002. **277**(14): p. 11735-45.

- Z -

Zeigler-Johnson C, Friebel T, Walker AH, Wang Y, Spangler E, Panossian S, Patacsil M, Aplenc R, Wein AJ, Malkowicz SB, Rebbeck TR, *CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer*. *Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8461-7.

Zencir S, Alptekin D, Celiktaş M, Canturk P, Colak D, Caner V, Luleyap UH, Topcu Z, *Detection of cytochrome P450-2A6, -3A5 and -4B1 with real-time polymerase chain reaction in prostate tissue*. *Z Naturforsch*, 2008. **63**(9-10): p. 780-4.

Zeng X, Jin T, Jiang X, Kong Q, Ye T, Nordberg GF, *Effects on the prostate of environmental cadmium exposure--a cross-sectional population study in China*. *Biometals*, 2004. **17**(5): p. 559-65.

Zhang J, Fu Y, Li J, Wang J, He B, Xu S, *Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2009. **27**(3): p. 345-9.

Zhang LC, Yu HN, Sun SL, Yang JG, He GQ, Ruan H, Shen SR, *Investigations of the cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate against PC-3 cells in the presence of Cd²⁺ in vitro*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(4): p. 953-60.

Zhang Y, Zhao T, Li W, Vore M, *The 5'-untranslated region of multidrug resistance associated protein 2 (MRP2; ABCC2) regulates downstream open reading frame expression through translational regulation*. *Mol Pharmacol*, 2010. **77**(2): p. 237-46.

Zhao CQ, Young MR, Diwan BA, Coogan TP, Waalkes MP, *Association of arsenic-induced malignant transformation with DNA hypomethylation and aberrant gene expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(20): p. 10907-12.

Zhou SF, Liu JP, Chowbay B, *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact*. *Drug Metab Rev*, 2009. **41**(2): p. 89-295.

ANNEXES

ANNEXE 1 (1)Liste des 380 gènes étudiés en qPCR :**ENZYMES DE PHASE I (FONCTIONNALISATION)****Mono-oxygénases à Cytochromes P450 :**

CYP1A1	CYP2R1	CYP4F22	CYP21A2
CYP1A2	CYP2S1	CYP4V2	CYP24A1
CYP1B1	CYP2U1	CYP4X1	CYP26A1
CYP2A6	CYP2W1	CYP4Z1	CYP26B1
CYP2A7	CYP3A4	CYP5A1	CYP26C1
CYP2A13	CYP3A5	CYP7A1	CYP27A1
CYP2B6	CYP3A7	CYP7B1	CYP27B1
CYP2C8	CYP3A43	CYP8A1	CYP27C1
CYP2C9	CYP4A11/22	CYP8B1	CYP39A1
CYP2C18	CYP4B1	CYP11A1	CYP46A1
CYP2C19	CYP4F2	CYP11B1	CYP51A1
CYP2D6	CYP4F3	CYP11B2	CYB5A
CYP2E1	CYP4F8	CYP17A1	POR
CYP2F1	CYP4F11	CYP19A1	
CYP2J2	CYP4F12	CYP20A1	

Oxydases :

ABP1	ALDH1B1	ALDH9A1	FMO1
ADH1A	ALDH1L1	ALDH16A1	FMO2
ADH1B	ALDH2	ALDH18A1	FMO3
ADH1C	ALDH3A1	AOC2	FMO4
ADH4	ALDH3A2	AOC3	FMO5
ADH5	ALDH3B1	AOF1	HSD17B10
ADH6	ALDH3B2	AOF2	MAOA
ADH7	ALDH4A1	AOX1	MAOB
ADHFE1	ALDH5A1	DHRS2	PAOX
ALDH1A1	ALDH6A1	DHRS4	SUOX
ALDH1A2	ALDH7A1	DHRS9	XDH
ALDH1A3	ALDH8A1	DPYD	

Hydrolases :

AADAC	CES2	EPHX1	GZMB
BCHE	CES3	EPHX2	PON1
BLMH	CES4	ESD	PON2
CES1	CES7	GZMA	PON3

Réductases :

AFAR3	AKR1C4	CBR1	MTHFR
AKR1A1	AKR1CL1	CBR3	NQO1
AKR1B1	AKR1CL2	CBR4	NQO2
AKR1B10	AKR1D1	KCNAB1	SPR
AKR1C1/2	AKR7A2	KCNAB2	TXN
AKR1C3	AKR7A3	KCNAB3	TXN2

ANNEXE 1 (2)

ENZYMES DE PHASE II (CONJUGAISON)

Acétyltransférases :

AANAT	NAT1	NAT5
BAAT	NAT2	

Glucuronyltransférases :

UGT1A1	UGT1A8	UGT2B4	UGT2B17
UGT1A4	UGT1A9	UGT2B7	UGT2B28
UGT1A5	UGT1A10	UGT2B10	UGT3A1
UGT1A6	UGT2A1	UGT2B11	UGT3A2
UGT1A7	UGT2A3	UGT2B15	UGT8

Glutathion S-transférases :

GSTA1	GSTK1	GSTM5	GSTT2/B
GSTA2	GSTM1	GSTO1	GSTZ1
GSTA3	GSTM2	GSTO2	MGST1
GSTA4	GSTM3	GSTP1	MGST2
GSTA5	GSTM4	GSTT1	MGST3

Méthyltransférases :

AS3MT	GNMT	INMT	PNMT
COMT	HNMT	NNMT	TPMT

Sulfotransférases :

SULT1A1	SULT1B1	SULT1C4	SULT2B1
SULT1A2	SULT1C2	SULT1E1	SULT4A1
SULT1A3/4	SULT1C3	SULT2A1	SULT6B1

Autres transférases :

GGT1	GLYAT	MPST	TST
------	-------	------	-----

ANNEXE 1 (3)

TRANSPORTEURS

Transporteurs ABC :

ABCA1	ABCB3	ABCB11	ABCC9
ABCA2	ABCB4	ABCC1	ABCC10
ABCA3	ABCB5	ABCC2	ABCC11
ABCA4	ABCB6	ABCC3	ABCC12
ABCA7	ABCB7	ABCC4	ABCD4
ABCA8	ABCB8	ABCC5	ABCG2
ABCB1	ABCB9	ABCC6	ABCG8
ABCB2	ABCB10	ABCC8	

Transporteurs de métaux :

MT1A	MT1H	MT2A
MT1B	MT1M	MT3
MT1F	MT1X	MT4

Solute Carriers :

SLC1A1	SLC10A1	SLC22A9	SLC38A5
SLC1A2	SLC10A2	SLC22A11	SLC47A1
SLC1A3	SLC15A1	SLC22A12	SLC47A2
SLC1A6	SLC15A2	SLC22A16	SLCO1A2
SLC1A7	SLC16A1	SLC22A19	SLCO1B1
SLC2A1	SLC18A2	SLC25A13	SLCO1B3
SLC3A1	SLC19A1	SLC28A1	SLCO1C1
SLC3A2	SLC19A2	SLC28A2	SLCO2A1
SLC5A4	SLC22A1	SLC28A3	SLCO2B1
SLC6A3	SLC22A2	SLC29A1	SLCO3A1
SLC6A4	SLC22A3	SLC29A2	SLCO4A1
SLC7A5	SLC22A4	SLC29A3	SLCO4C1
SLC7A6	SLC22A5	SLC29A4	SLCO5A1
SLC7A7	SLC22A6	SLC31A1	SLCO6A1
SLC7A8	SLC22A7	SLC38A1	
SLC7A11	SLC22A8	SLC38A2	

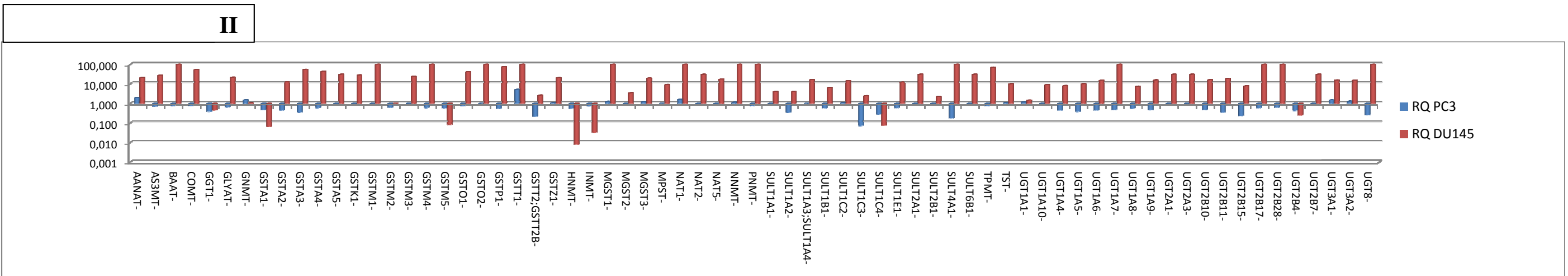
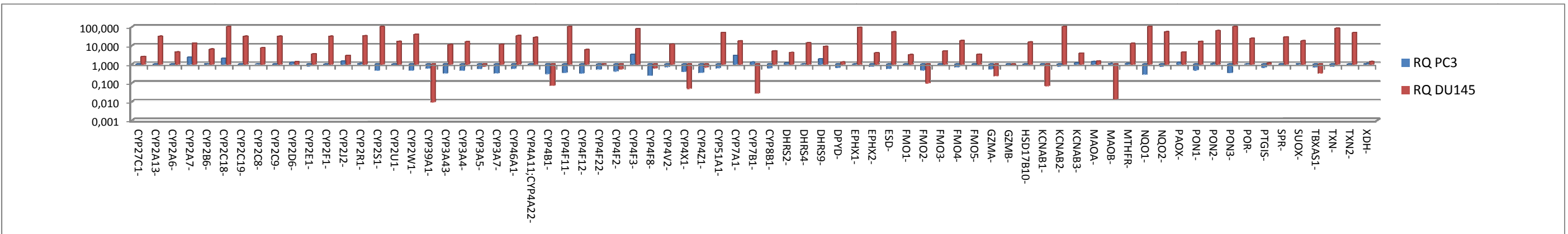
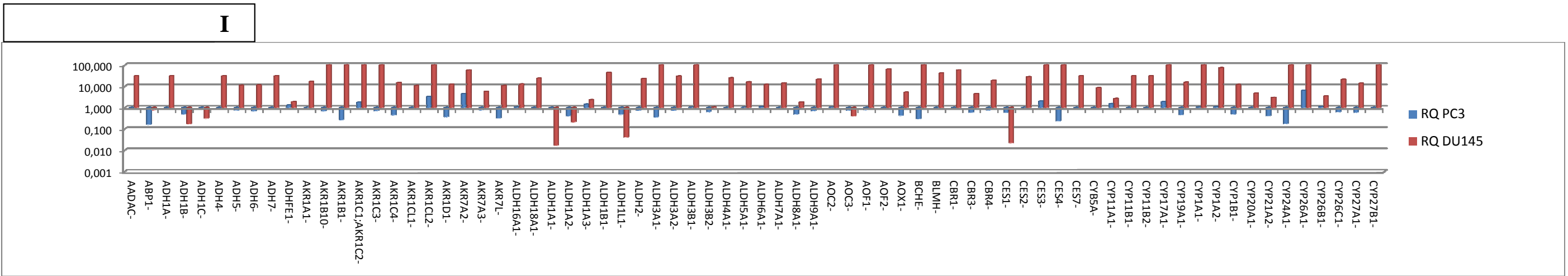
Autres Transporteurs :

ATP6VOC	AQP1	KCNK9	VDAC2
ATP7A	AQP7	MVP	VDAC3
ATP7B	AQP9	VDAC1	

XENOSENSEURS

AHR	NCOA1	NROB2	THRA
AHRR	NCOA2	PPARA	THRB
AIP	NCOA3	PPARD	TRIP11
ARNT	NCOR1	PPARG	VDR
ARNT2	NCOR2	PPARGC1A	
EP300	NFE2L2	PPARGC1B	
ESR1	NR1H2	PPRC1	
ESR2	NR1H3	PTGES3	
GRIP1	NR1H4	RARA	
HIF1A	NR1I2	RARB	
HIF3A	NR1I3	RARG	
HNF4A	NR3C1	RXRA	
HSP90	NR3C2	RXRB	
KEAP	NR5A2	RXRG	

ANNEXE 2



ANNEXE 3Liste des 700 microARNs étudiés en qPCR :

ath-miR159a-000338	hsa-miR-1197-002810	hsa-miR-126#-000451
ath-miR159a-4373390	hsa-miR-1200-002829	hsa-miR-1260-002896
dme-miR-7-000268	hsa-miR-1201-002781	hsa-miR-1262-002852
has-miR-155-4395459	hsa-miR-1203-002877	hsa-miR-1263-002784
hsa-let-7a#-002307	hsa-miR-1204-002872	hsa-miR-1264-002799
hsa-let-7a-4373169	hsa-miR-1205-002778	hsa-miR-126-4395339
hsa-let-7b#-002404	hsa-miR-1206-002878	hsa-miR-1265-002790
hsa-let-7b-4395446	hsa-miR-1208-002880	hsa-miR-1267-002885
hsa-let-7c#-002405	hsa-miR-122#-002130	hsa-miR-1269-002789
hsa-let-7c-4373167	hsa-miR-122-4395356	hsa-miR-1270-002807
hsa-let-7d-4395394	hsa-miR-1224-3P-002752	hsa-miR-1271-002779
hsa-let-7e#-002407	hsa-miR-1225-3P-002766	hsa-miR-1272-002845
hsa-let-7e-4395517	hsa-miR-1226#-002758	hsa-miR-127-3p-4373147
hsa-let-7f-1#-002417	hsa-miR-1227-002769	hsa-miR-1274A-002883
hsa-let-7f-2#-002418	hsa-miR-1228#-002763	hsa-miR-1274B-002884
hsa-let-7f-4373164	hsa-miR-1233-002768	hsa-miR-1275-002840
hsa-let-7g#-002118	hsa-miR-1236-002761	hsa-miR-127-5p-4395340
hsa-let-7g-4395393	hsa-miR-1238-002927	hsa-miR-1276-002843
hsa-let-7i#-002172	hsa-miR-124#-002197	hsa-miR-1278-002851
hsa-miR-100#-002142	hsa-miR-1243-002854	hsa-miR-1282-002803
hsa-miR-100-4373160	hsa-miR-1244-002791	hsa-miR-1283-002890
hsa-miR-101#-002143	hsa-miR-124-4373295	hsa-miR-1284-002903
hsa-miR-101-4395364	hsa-miR-1245-002823	hsa-miR-128-4395327
hsa-miR-103-4373158	hsa-miR-1247-002893	hsa-miR-1285-002822
hsa-miR-105#-002168	hsa-miR-1248-002870	hsa-miR-1286-002773
hsa-miR-105-4395278	hsa-miR-1249-002868	hsa-miR-1288-002832
hsa-miR-106a#-002170	hsa-miR-1250-002887	hsa-miR-1289-002871
hsa-miR-106a-4395280	hsa-miR-1251-002820	hsa-miR-129#-002298
hsa-miR-106b#-002380	hsa-miR-1252-002860	hsa-miR-1290-002863
hsa-miR-106b-4373155	hsa-miR-1253-002894	hsa-miR-1291-002838
hsa-miR-107-4373154	hsa-miR-1254-002818	hsa-miR-1292-002824
hsa-miR-10a#-002288	hsa-miR-1255A-002805	hsa-miR-1293-002905
hsa-miR-10a-4373153	hsa-miR-1255B-002801	hsa-miR-129-3p-4373297
hsa-miR-10b#-002315	hsa-miR-1256-002850	hsa-miR-1294-002785
hsa-miR-10b-4395329	hsa-miR-1257-002910	hsa-miR-129-5p-4373171
hsa-miR-1178-002777	hsa-miR-1259-002796	hsa-miR-1296-002908
hsa-miR-1179-002776	hsa-miR-125a-3p-4395310	hsa-miR-1298-002861
hsa-miR-1180-002847	hsa-miR-125a-5p-4395309	hsa-miR-1300-002902
hsa-miR-1182-002830	hsa-miR-125b-1#-002378	hsa-miR-1301-002827
hsa-miR-1183-002841	hsa-miR-125b-2#-002158	hsa-miR-1302-002901
hsa-miR-1184-002842	hsa-miR-125b-4373148	hsa-miR-1303-002792

hsa-miR-1304-002874	hsa-miR-149-4395366	hsa-miR-193a-5p-4395392
hsa-miR-1305-002867	hsa-miR-150-4373127	hsa-miR-193b#-002366
hsa-miR-130a#-002131	hsa-miR-151-3p-002254	hsa-miR-193b-4395478
hsa-miR-130a-4373145	hsa-miR-151-5p-002642	hsa-miR-194#-002379
hsa-miR-130b#-002114	hsa-miR-152-4395170	hsa-miR-194-4373106
hsa-miR-130b-4373144	hsa-miR-153-4373305	hsa-miR-195#-002107
hsa-miR-132#-002132	hsa-miR-154#-000478	hsa-miR-195-4373105
hsa-miR-1324-002815	hsa-miR-154-4373270	hsa-miR-196a#-002336
hsa-miR-132-4373143	hsa-miR-155#-002287	hsa-miR-196b-4395326
hsa-miR-133a-4395357	hsa-miR-15a#-002419	hsa-miR-197-4373102
hsa-miR-133b-4395358	hsa-miR-15a-4373123	hsa-miR-198-4395384
hsa-miR-134-4373299	hsa-miR-15b#-002173	hsa-miR-199a-3p-4395415
hsa-miR-135a-4373140	hsa-miR-15b-4373122	hsa-miR-199a-5p-4373272
hsa-miR-135b#-002159	hsa-miR-16-1#-002420	hsa-miR-199b-5p-4373100
hsa-miR-135b-4395372	hsa-miR-16-2#-002171	hsa-miR-19a#-002424
hsa-miR-136#-002100	hsa-miR-16-4373121	hsa-miR-19a-4373099
hsa-miR-136-4373173	hsa-miR-17#-002421	hsa-miR-19b-1#-002425
hsa-miR-137-4373301	hsa-miR-17-4395419	hsa-miR-19b-4373098
hsa-miR-138-2#-002144	hsa-miR-181a-2#-002317	hsa-miR-200a#-001011
hsa-miR-138-4395395	hsa-miR-181a-4373117	hsa-miR-200a-4378069
hsa-miR-139-3p-4395424	hsa-miR-181c#-002333	hsa-miR-200b#-002274
hsa-miR-139-5p-4395400	hsa-miR-181c-4373115	hsa-miR-200b-4395362
hsa-miR-140-3p-4395345	hsa-miR-182#-000483	hsa-miR-200c#-002286
hsa-miR-140-5p-4373374	hsa-miR-182-4395445	hsa-miR-200c-4395411
hsa-miR-141#-002145	hsa-miR-1825-002907	hsa-miR-202#-002362
hsa-miR-141-4373137	hsa-miR-1826-002873	hsa-miR-202-4395474
hsa-miR-142-3p-4373136	hsa-miR-183#-002270	hsa-miR-203-4373095
hsa-miR-142-5p-4395359	hsa-miR-183-4395380	hsa-miR-204-4373094
hsa-miR-143#-002146	hsa-miR-184-4373113	hsa-miR-205-4373093
hsa-miR-143-4395360	hsa-miR-185#-002104	hsa-miR-206-000510
hsa-miR-1-4395333	hsa-miR-185-4395382	hsa-miR-208-4373091
hsa-miR-144#-002148	hsa-miR-186#-002105	hsa-miR-208b-4395401
hsa-miR-144-002676	hsa-miR-186-4395396	hsa-miR-20a#-002437
hsa-miR-145#-002149	hsa-miR-187-4373307	hsa-miR-20a-4373286
hsa-miR-145-4395389	hsa-miR-188-3p-4395217	hsa-miR-20b#-002311
hsa-miR-146a#-002163	hsa-miR-18a#-002423	hsa-miR-20b-4373263
hsa-miR-146a-4373132	hsa-miR-18a-4395533	hsa-miR-21#-002438
hsa-miR-146b-3p-4395472	hsa-miR-18b#-002310	hsa-miR-210-4373089
hsa-miR-146b-5p-4373178	hsa-miR-18b-4395328	hsa-miR-211-4373088
hsa-miR-147-4373131	hsa-miR-190-4373110	hsa-miR-212-4373087
hsa-miR-147b-4395373	hsa-miR-190b-002263	hsa-miR-213-000516
hsa-miR-148a#-002134	hsa-miR-191#-002678	hsa-miR-214#-002293
hsa-miR-148a-4373130	hsa-miR-191-4395410	hsa-miR-21-4373090
hsa-miR-148b#-002160	hsa-miR-192#-002272	hsa-miR-214-4395417
hsa-miR-148b-4373129	hsa-miR-192-4373108	hsa-miR-215-4373084
hsa-miR-149#-002164	hsa-miR-193a-3p-4395361	hsa-miR-216a-4395331

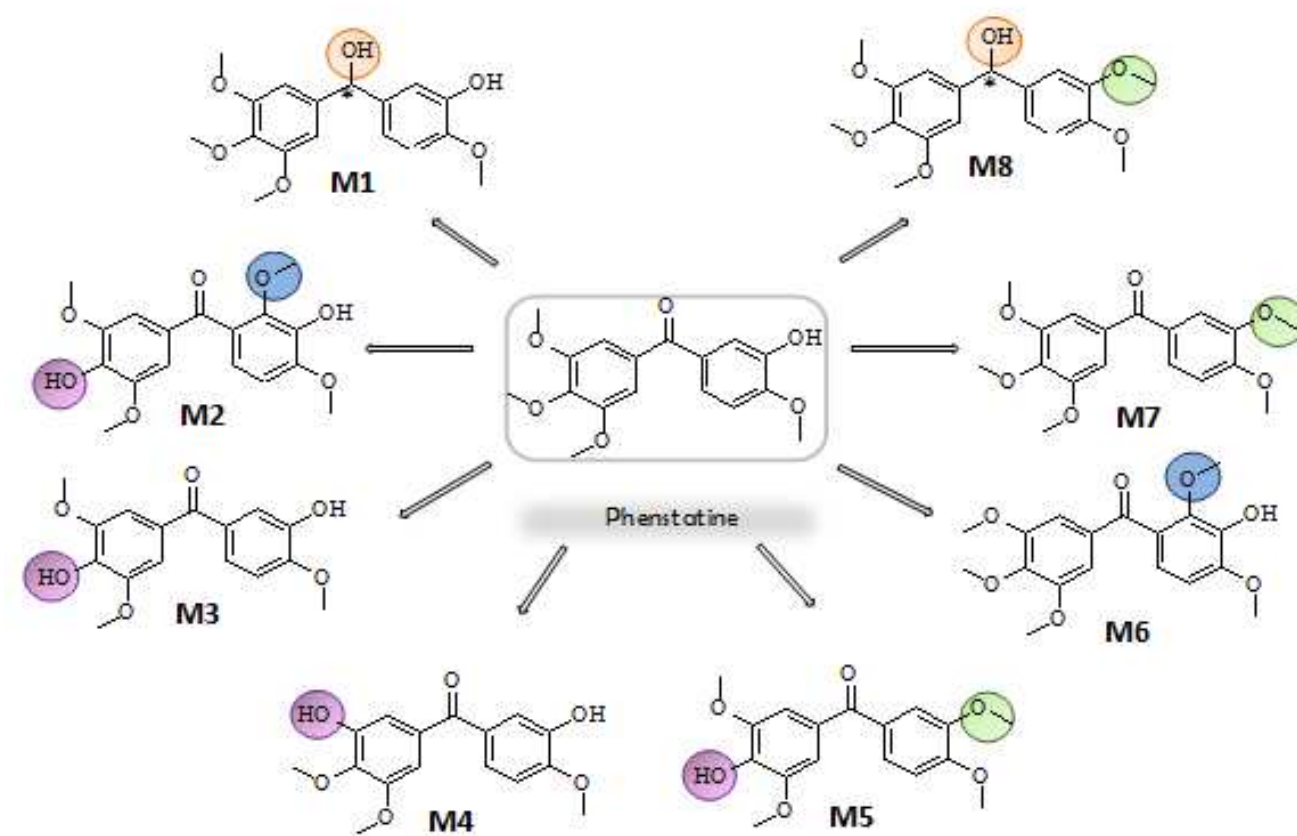
hsa-miR-216b-4395437	hsa-miR-29a-4395223	hsa-miR-338-3p-4395363
hsa-miR-217-4395448	hsa-miR-29b-1#-002165	hsa-miR-338-5p-002658
hsa-miR-218-1#-002094	hsa-miR-29b-2#-002166	hsa-miR-339-3p-4395295
hsa-miR-218-2#-002294	hsa-miR-29b-4373288	hsa-miR-339-5p-4395368
hsa-miR-218-4373081	hsa-miR-29c-4395171	hsa-miR-33a#-002136
hsa-miR-219-1-3p-4395206	hsa-miR-301a-4373064	hsa-miR-33a-002135
hsa-miR-219-2-3p-4395501	hsa-miR-301b-4395503	hsa-miR-33b-4395196
hsa-miR-219-5p-4373080	hsa-miR-302a#-002381	hsa-miR-340#-002259
hsa-miR-22#-002301	hsa-miR-302a-4378070	hsa-miR-340-4395369
hsa-miR-220-4373078	hsa-miR-302b#-002119	hsa-miR-342-3p-4395371
hsa-miR-220b-4395317	hsa-miR-302b-4378071	hsa-miR-342-5p-4395258
hsa-miR-220c-4395322	hsa-miR-302c#-000534	hsa-miR-345-4395297
hsa-miR-221#-002096	hsa-miR-302c-4378072	hsa-miR-346-4373038
hsa-miR-221-4373077	hsa-miR-302d#-002120	hsa-miR-34a#-002316
hsa-miR-222#-002097	hsa-miR-302d-000535	hsa-miR-34a-4395168
hsa-miR-222-4395387	hsa-miR-30a-3p-000416	hsa-miR-34b-000427
hsa-miR-223#-002098	hsa-miR-30a-5p-000417	hsa-miR-34b-002102
hsa-miR-223-4395406	hsa-miR-30b#-002129	hsa-miR-34c-5p-4373036
hsa-miR-22-4373079	hsa-miR-30b-4373290	hsa-miR-361-3p-002116
hsa-miR-224-4395210	hsa-miR-30c-1#-002108	hsa-miR-361-5p-4373035
hsa-miR-23a#-002439	hsa-miR-30c-2#-002110	hsa-miR-362-3p-4395228
hsa-miR-23a-4373074	hsa-miR-30c-4373060	hsa-miR-362-5p-4378092
hsa-miR-23b#-002126	hsa-miR-30d#-002305	hsa-miR-363#-001283
hsa-miR-23b-4373073	hsa-miR-30d-000420	hsa-miR-363-4378090
hsa-miR-24-1#-002440	hsa-miR-30e-3p-000422	hsa-miR-365-4373194
hsa-miR-24-2#-002441	hsa-miR-31#-002113	hsa-miR-367#-002121
hsa-miR-24-4373072	hsa-miR-31-4395390	hsa-miR-367-4373034
hsa-miR-25#-002442	hsa-miR-32#-002111	hsa-miR-369-3p-4373032
hsa-miR-25-4373071	hsa-miR-320-4395388	hsa-miR-369-5p-4373195
hsa-miR-26a-1#-002443	hsa-miR-320B-002844	hsa-miR-370-4395386
hsa-miR-26a-2#-002115	hsa-miR-323-3p-4395338	hsa-miR-371-3p-4395235
hsa-miR-26a-4395166	hsa-miR-32-4395220	hsa-miR-372-4373029
hsa-miR-26b#-002444	hsa-miR-324-3p-4395272	hsa-miR-373-4378073
hsa-miR-26b-4395167	hsa-miR-324-5p-4373052	hsa-miR-374a#-002125
hsa-miR-27a#-002445	hsa-miR-325-4373051	hsa-miR-374a-4373028
hsa-miR-27a-4373287	hsa-miR-326-4373050	hsa-miR-374b#-002391
hsa-miR-27b#-002174	hsa-miR-328-4373049	hsa-miR-374b-4381045
hsa-miR-27b-4373068	hsa-miR-329-4373191	hsa-miR-375-4373027
hsa-miR-28-3p-4395557	hsa-miR-330-3p-4373047	hsa-miR-376a#-002127
hsa-miR-28-5p-4373067	hsa-miR-330-5p-4395341	hsa-miR-376a-4373026
hsa-miR-296-3p-4395212	hsa-miR-331-3p-4373046	hsa-miR-376b-4373196
hsa-miR-296-5p-4373066	hsa-miR-331-5p-4395344	hsa-miR-376c-4395233
hsa-miR-298-4395301	hsa-miR-335#-002185	hsa-miR-377#-002128
hsa-miR-299-3p-4373189	hsa-miR-335-4373045	hsa-miR-377-4373025
hsa-miR-299-5p-4373188	hsa-miR-337-3p-002157	hsa-miR-378-000567
hsa-miR-29a#-002447	hsa-miR-337-5p-4395267	hsa-miR-378-002243

hsa-miR-379-4373349	hsa-miR-487a-4378097	hsa-miR-517a-4395513
hsa-miR-380-4373022	hsa-miR-487b-4378102	hsa-miR-517b-4373244
hsa-miR-380-5p-000570	hsa-miR-488-001106	hsa-miR-517c-4373264
hsa-miR-381-4373020	hsa-miR-488-4395468	hsa-miR-518a-3p-4395508
hsa-miR-382-4373019	hsa-miR-489-4395469	hsa-miR-518a-5p-4395507
hsa-miR-383-4373018	hsa-miR-490-3p-4373215	hsa-miR-518b-4373246
hsa-miR-384-4373017	hsa-miR-491-3p-4395471	hsa-miR-518c#-001158
hsa-miR-409-3p-002332	hsa-miR-491-5p-4381053	hsa-miR-518c-4395512
hsa-miR-409-5p-4395442	hsa-miR-492-4373217	hsa-miR-518d-3p-4373248
hsa-miR-410-4378093	hsa-miR-493-4395475	hsa-miR-518d-5p-4395500
hsa-miR-411#-002238	hsa-miR-494-4395476	hsa-miR-518e#-002371
hsa-miR-411-4381013	hsa-miR-495-4381078	hsa-miR-518e-4395506
hsa-miR-412-4373199	hsa-miR-496-4386771	hsa-miR-518f#-002387
hsa-miR-422a-4395408	hsa-miR-497#-002368	hsa-miR-518f-4395499
hsa-miR-423-5p-4395451	hsa-miR-497-001043	hsa-miR-519a-4395526
hsa-miR-424#-002309	hsa-miR-499-3p-4395538	hsa-miR-519b-3p-002384
hsa-miR-424-4373201	hsa-miR-499-5p-4381047	hsa-miR-519c-3p-4373251
hsa-miR-425#-002302	hsa-miR-500-001046	hsa-miR-519d-4395514
hsa-miR-425-4380926	hsa-miR-500-4395539	hsa-miR-519e#-001166
hsa-miR-429-4373203	hsa-miR-501-3p-4395546	hsa-miR-519e-4395481
hsa-miR-431#-002312	hsa-miR-501-5p-4373226	hsa-miR-520a-3p-4373268
hsa-miR-431-4395173	hsa-miR-502-3p-4395194	hsa-miR-520a-5p-4378085
hsa-miR-432#-001027	hsa-miR-502-5p-4373227	hsa-miR-520b-4373252
hsa-miR-432-001026	hsa-miR-503-4373228	hsa-miR-520c-3p-002400
hsa-miR-433-4373205	hsa-miR-504-4395195	hsa-miR-520D-3P-002743
hsa-miR-448-4373206	hsa-miR-505#-002087	hsa-miR-520d-5p-4395504
hsa-miR-449a-4373207	hsa-miR-505-4395200	hsa-miR-520e-4373255
hsa-miR-449b-4381011	hsa-miR-506-4373231	hsa-miR-520f-4373256
hsa-miR-450a-4395414	hsa-miR-507-4373232	hsa-miR-520g-4373257
hsa-miR-450b-3p-4395319	hsa-miR-508-3p-4373233	hsa-miR-520h-001170
hsa-miR-450b-5p-4395318	hsa-miR-508-5p-4395203	hsa-miR-521-4373259
hsa-miR-451-4373360	hsa-miR-509-3-5p-4395266	hsa-miR-522-4395524
hsa-miR-452#-002330	hsa-miR-509-5p-4395346	hsa-miR-523-4395497
hsa-miR-452-4395440	hsa-miR-510-4395352	hsa-miR-524-001173
hsa-miR-453-4395429	hsa-miR-511-4373236	hsa-miR-524-5p-4395174
hsa-miR-454#-001996	hsa-miR-512-3p-4381034	hsa-miR-525-3p-4395496
hsa-miR-454-4395434	hsa-miR-512-5p-4373238	hsa-miR-525-5p-4378088
hsa-miR-455-3p-4395355	hsa-miR-513-5p-4395201	hsa-miR-526b-4395493
hsa-miR-455-5p-4378098	hsa-miR-513B-002757	hsa-miR-532-3p-4395466
hsa-miR-483-3p-002339	hsa-miR-513C-002756	hsa-miR-532-5p-4380928
hsa-miR-483-5p-4395449	hsa-miR-515-3p-4395480	hsa-miR-539-4378103
hsa-miR-484-4381032	hsa-miR-515-5p-4373242	hsa-miR-541#-002200
hsa-miR-485-3p-4378095	hsa-miR-516-3p-001149	hsa-miR-541-4395312
hsa-miR-485-5p-4373212	hsa-miR-516a-5p-4395527	hsa-miR-542-3p-4378101
hsa-miR-486-3p-4395204	hsa-miR-516b-4395172	hsa-miR-542-5p-4395351
hsa-miR-486-5p-4378096	hsa-miR-517#-001113	hsa-miR-543-002376

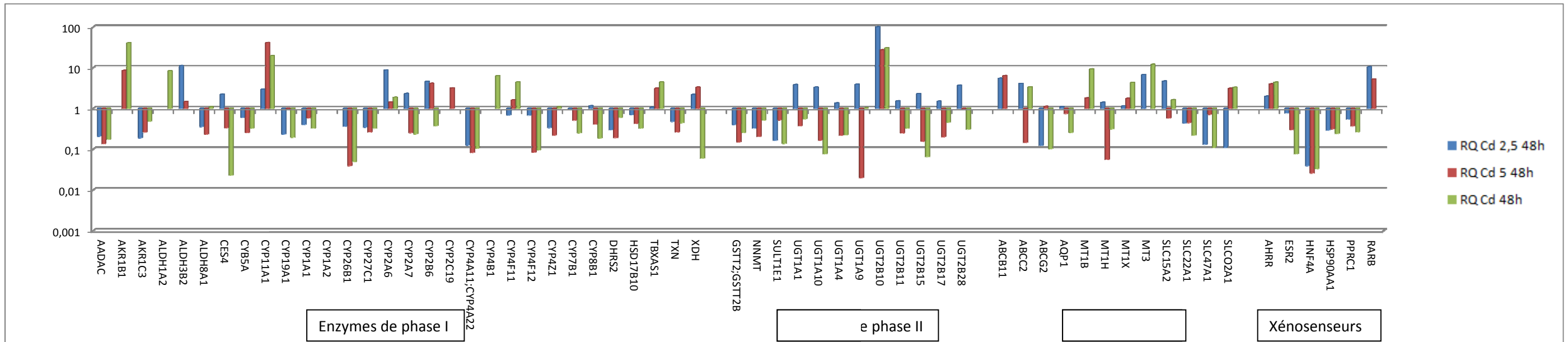
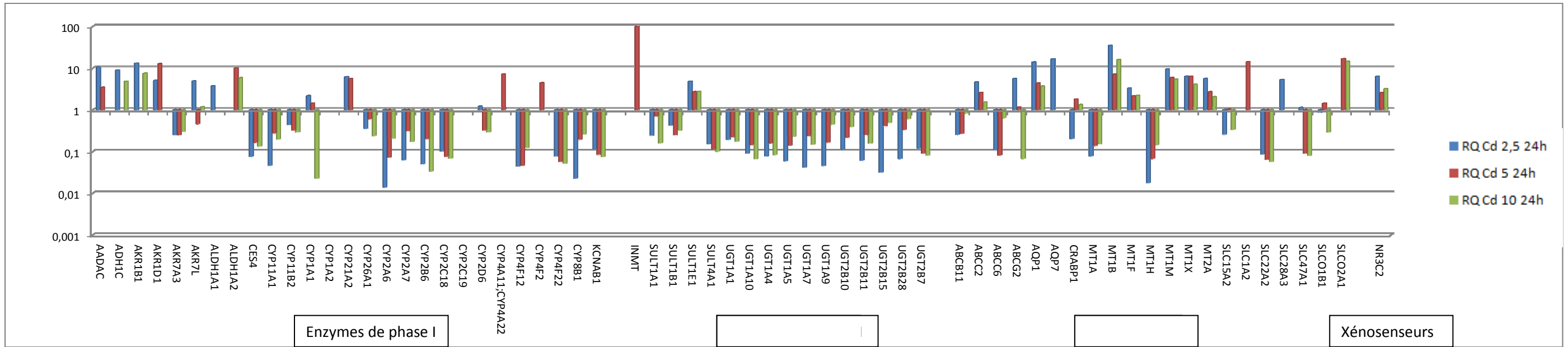
hsa-miR-544-4395376	hsa-miR-573-001615	hsa-miR-617-001591
hsa-miR-545#-002266	hsa-miR-574-3p-4395460	hsa-miR-618-4380996
hsa-miR-545-4395378	hsa-miR-575-001617	hsa-miR-620-002672
hsa-miR-548a-3p-4380948	hsa-miR-576-3p-4395462	hsa-miR-621-001598
hsa-miR-548a-5p-4395523	hsa-miR-576-5p-4395461	hsa-miR-622-001553
hsa-miR-548b-3p-4380951	hsa-miR-577-002675	hsa-miR-623-001555
hsa-miR-548b-5p-4395519	hsa-miR-578-001619	hsa-miR-624-001557
hsa-miR-548c-3p-4380993	hsa-miR-579-4395509	hsa-miR-624-4395541
hsa-miR-548c-5p-4395540	hsa-miR-580-001621	hsa-miR-625#-002432
hsa-miR-548d-3p-4381008	hsa-miR-581-001622	hsa-miR-625-4395542
hsa-miR-548d-5p-4395348	hsa-miR-582-3p-4395510	hsa-miR-626-001559
hsa-miR-548E-002881	hsa-miR-582-5p-4395175	hsa-miR-627-4380967
hsa-miR-548G-002879	hsa-miR-583-001623	hsa-miR-628-3p-002434
hsa-miR-548H-002816	hsa-miR-584-001624	hsa-miR-628-5p-4395544
hsa-miR-548I-002909	hsa-miR-585-001625	hsa-miR-629-001562
hsa-miR-548J-002783	hsa-miR-586-001539	hsa-miR-629-4395547
hsa-miR-548K-002819	hsa-miR-587-001540	hsa-miR-630-001563
hsa-miR-548L-002904	hsa-miR-588-001542	hsa-miR-631-001564
hsa-miR-548M-002775	hsa-miR-589-001543	hsa-miR-633-001574
hsa-miR-548N-002888	hsa-miR-589-4395520	hsa-miR-634-001576
hsa-miR-548P-002798	hsa-miR-590-3p-002677	hsa-miR-635-001578
hsa-miR-549-001511	hsa-miR-590-5p-4395176	hsa-miR-636-4395199
hsa-miR-550-001544	hsa-miR-591-001545	hsa-miR-637-001581
hsa-miR-550-002410	hsa-miR-592-001546	hsa-miR-638-001582
hsa-miR-551a-001519	hsa-miR-593-001547	hsa-miR-639-001583
hsa-miR-551b#-002346	hsa-miR-593-002411	hsa-miR-640-001584
hsa-miR-551b-4380945	hsa-miR-595-001987	hsa-miR-641-001585
hsa-miR-552-001520	hsa-miR-596-001550	hsa-miR-642-4380995
hsa-miR-553-001521	hsa-miR-597-4380960	hsa-miR-643-001594
hsa-miR-554-001522	hsa-miR-598-4395179	hsa-miR-644-001596
hsa-miR-555-001523	hsa-miR-599-001554	hsa-miR-645-001597
hsa-miR-556-3p-4395456	hsa-miR-600-001556	hsa-miR-646-001599
hsa-miR-556-5p-4395455	hsa-miR-601-001558	hsa-miR-647-001600
hsa-miR-557-001525	hsa-miR-603-001566	hsa-miR-648-001601
hsa-miR-558-001526	hsa-miR-604-001567	hsa-miR-649-001602
hsa-miR-559-001527	hsa-miR-605-001568	hsa-miR-650-001603
hsa-miR-561-4380938	hsa-miR-606-001569	hsa-miR-651-4381007
hsa-miR-562-001529	hsa-miR-607-001570	hsa-miR-652-4395463
hsa-miR-563-001530	hsa-miR-608-001571	hsa-miR-653-4395403
hsa-miR-564-001531	hsa-miR-609-001573	hsa-miR-654-3p-4395350
hsa-miR-566-001533	hsa-miR-613-001586	hsa-miR-654-5p-4381014
hsa-miR-567-001534	hsa-miR-614-001587	hsa-miR-655-4381015
hsa-miR-569-001536	hsa-miR-615-3p-4386777	hsa-miR-656-001510
hsa-miR-570-4395458	hsa-miR-615-5p-4395464	hsa-miR-657-001512
hsa-miR-571-001613	hsa-miR-616-001589	hsa-miR-658-001513
hsa-miR-572-001614	hsa-miR-616-4395525	hsa-miR-659-001514

hsa-miR-660-4380925	hsa-miR-874-4395379	hsa-miR-934-002177
hsa-miR-661-001606	hsa-miR-875-3p-4395315	hsa-miR-93-4373302
hsa-miR-662-001607	hsa-miR-875-5p-002203	hsa-miR-935-002178
hsa-miR-663B-002857	hsa-miR-876-3p-4395336	hsa-miR-936-002179
hsa-miR-664-002897	hsa-miR-876-5p-4395316	hsa-miR-937-002180
hsa-miR-665-002681	hsa-miR-885-3p-4395483	hsa-miR-938-002181
hsa-miR-668-001992	hsa-miR-885-5p-4395407	hsa-miR-939-002182
hsa-miR-671-3p-4395433	hsa-miR-886-3p-4395305	hsa-miR-941-002183
hsa-miR-672-4395438	hsa-miR-886-5p-4395304	hsa-miR-942-002187
hsa-miR-674-4395193	hsa-miR-887-4395485	hsa-miR-943-002188
hsa-miR-675-002005	hsa-miR-888#-002213	hsa-miR-9-4373285
hsa-miR-708#-002342	hsa-miR-888-4395323	hsa-miR-944-002189
hsa-miR-708-4395452	hsa-miR-889-4395313	hsa-miR-95-4373011
hsa-miR-7-2#-002314	hsa-miR-890-4395320	hsa-miR-96#-002140
hsa-miR-720-002895	hsa-miR-891a-4395302	hsa-miR-96-4373372
hsa-miR-744#-002325	hsa-miR-891b-4395321	hsa-miR-98-4373009
hsa-miR-744-4395435	hsa-miR-892a-4395306	hsa-miR-99a#-002141
hsa-miR-758-4395180	hsa-miR-892b-002214	hsa-miR-99a-4373008
hsa-miR-765-002643	hsa-miR-9#-002231	hsa-miR-99b#-002196
hsa-miR-766-001986	hsa-miR-920-002150	hsa-miR-99b-4373007
hsa-miR-767-3p-001995	hsa-miR-921-002151	MammU6-4395470
hsa-miR-767-5p-001993	hsa-miR-922-002152	mmu-let-7d#-001178
hsa-miR-769-3p-002003	hsa-miR-924-002154	rno-miR-29c#-001818
hsa-miR-769-5p-001998	hsa-miR-92a-1#-002137	rno-miR-7#-001338
hsa-miR-770-5p-002002	hsa-miR-92a-2#-002138	RNU44-001094
hsa-miR-802-002004	hsa-miR-92a-4395169	RNU44-4373384
hsa-miR-871-4395465	hsa-miR-92b#-002343	RNU48-001006
hsa-miR-872-4395375	hsa-miR-93#-002139	RNU48-4373383
hsa-miR-873-4395467	hsa-miR-933-002176	U6 snRNA-001973

ANNEXE 4



ANNEXE 5



Expression relative logarithmique (log 10) exprimée en RQ des gènes de métabolisation de la lignée cellulaire prostatique cancéreuse PC3 exposée à 2,5 ; 5 et 10 µM de cadmium

RÉSUMÉ

Le cancer de la prostate est la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme après les cancers colorectaux et broncho-pulmonaires avec, en 2010, près de 150 000 décès. On voit donc tout l'intérêt d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques en essayant de prendre en compte à la fois : i) la métabolisation qui peut modifier *in vivo* l'efficacité de la molécule initiale et ii) les différences individuelles intervenant à ce niveau du fait de la nature de l'environnement du patient.

Nous avons porté notre étude, en collaboration avec l'Ecole HEI de Lille, sur l'intérêt de la Phenstatine (molécule en développement pré-clinique) et de ses métabolites puisque qu'au cours de ces dernières années des résultats thérapeutiques prometteurs ont été obtenus, dans les cancers prostatiques hormono-résistants avec les taxanes, dont le rôle est de stabiliser les microtubules en inhibant leur dépolymérisation.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été dans un premier temps d'étudier l'effet pharmacologique de la Phenstatine et de ses métabolites issus de sa biotransformation par des microsomes hépatiques humains sur la polymérisation de la tubuline ainsi que sur la prolifération de la lignée cancéreuse prostatique humaine PC3. Nous avons ensuite essayé de déterminer les CYPs responsables de la formation des métabolites identifiés et quantifiés. Enfin, nous avons abordé l'influence de certaines conditions environnementales, plus particulièrement la présence de cadmium, sur le métabolisme de ces composés originaux et donc sur leur activité vis-à-vis de cellules cancéreuses prostatiques. Pour tenter de comprendre la réponse ou la non réponse à ces différents traitements, nous avons suivi les profils d'expression de gènes impliqués dans la prise en charge cellulaire des xénobiotiques en utilisant une technologie fonctionnant à haut débit et basée sur le principe de la PCR quantitative en temps réel (*TaqmanTM Low Density Arrays*).

Un modèle d'étude a pu ainsi être élaboré afin de montrer l'implication de l'environnement sur l'efficacité d'une molécule à visée anticancéreuse. Ce modèle devrait par la suite pouvoir être élargi à d'autres agents participant à la métabolisation des xénobiotiques et déboucher sur la mise en évidence des mécanismes génétiques ou épigénétiques responsables de ces réponses particulières aux traitements anticancéreux.

ABSTRACT

Prostate cancer is ranked third among fatal cancers, after bronchial and colorectal cancers, with 150,000 deaths recorded in 2010. The design of new prostate cancer drugs should take into account : i) the metabolism which can alter the efficiency of an active compound *in vivo*, and ; ii) the individual differences in metabolism resulting from patients' environments. Our study, in partnership with the HEI School of Lille, is concerned with Phenstatin (a compound in pre-clinical development) and its metabolites : indeed, promising therapeutic results have recently been obtained with taxanes in hormone-resistant prostate cancers which stabilize microtubules by inhibiting their depolymerization.

The aim of this work was firstly to study the pharmacological effect of Phenstatin and its metabolites, obtained after biotransformation by human liver microsomes, on tubulin polymerization and the proliferation of human prostate cancer cells (PC3 cell line). Secondly, we attempted to determinate the CYPs responsible for the formation of the Phenstatin metabolites we have identified and quantified. Thirdly, we addressed the influence of environmental conditions, more specifically the presence of cadmium, on the metabolism of these novel compounds and their activity towards prostate cancer cells. In order to understand the response or non-response of different treatments, we determined expression profiles of genes involved in the metabolism of xenobiotics by using high throughput technology based on real time quantitative PCR (*TaqmanTM Low Density Arrays*).

A study model was designed in order to show the effect of environmental factors on anticancer compounds' efficiency. This model should subsequently be transposable to other agents involved in xenobiotic metabolism and reveal genetic or epigenetic mechanisms responsible for individuals' responses to anticancer treatments.