

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Ecole Doctorale Biologie-Santé

Par

Valérie CHOPIN

**MECANISMES D'ACTION DU BUTYRATE SUR LA
CROISSANCE DES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN**

Soutenue le 27 novembre 2003 devant la commission d'examen :

Rapporteurs : Dr. Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL

Pr. Olivier COQUERET

Membres : Dr. Corinne ABBADIE

Dr. Dominique LEPRINCE

Pr. Hubert HONDERMARCK

Directeur de thèse : Pr. Xuefen LE BOURHIS

*A François,
A mes Parents,
A mon Frère.*

Pour leur amour, leur patience et leur soutien.

Avant propos

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie du Développement (UPRES-EA 1033, IFR-118) à l'USTL. Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à :

- Messieurs les Professeurs Xavier DESBIENS et Hubert HONDERMARCK, qui se sont succédés en tant que directeur du Laboratoire pour l'accueil et le soutien qu'ils m'ont apportés lors de la réalisation de ce travail. Merci au Professeur HONDERMARCK pour nos discussions sur l'apoptose et sur le butyrate en vue d'une application thérapeutique...

- Madame le Professeur Xuefen LE BOURHIS qui m'a dirigée et soutenue lors de mon stage de DEA puis lors de la thèse. Votre patience, votre disponibilité et votre gentillesse m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci pour nos discussions scientifiques et pour la confiance que vous m'avez accordée.

Je souhaite remercier vivement les membres du Jury pour l'honneur qu'ils me font :

Madame le Docteur Marie-Thérèse DIMANCHE-BOITREL (U 456, Rennes)

Monsieur le Professeur Olivier COQUERET (U 564, Angers)

Qui ont accepté de juger ce travail

Madame le Docteur Corinne ABBADIE (UMR 8117, Lille)

Monsieur le Docteur Dominique LEPRINCE (UMR 8526, Lille)

Monsieur le Professeur Hubert HONDERMARCK (UPRES-EA 1033, Villeneuve d'Ascq)

Qui ont bien voulu examiner ce travail

Je remercie également toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail. Merci tout particulièrement au Dr. Maud COLLYN, à Nathalie JOUY et à Murielle VERGOTHE (Service Commun de Cytométrie et d'Imagerie de l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, Lille) qui m'ont permis de réaliser les expériences de cytométrie en flux et de microscopie confocale. Leur compétence et leur bonne humeur ont jalonné chacune de mes visites, même à des heures tardives... Merci également au Dr. Daniel WOUTERS pour nos expériences d'échelle d'ADN et au Dr. Rodolphe VEREECQUE pour le tri de cellules transfectées.

Je ne voudrais pas oublier toutes les personnes du Laboratoire de Biologie du Développement et du Bâtiment SN3 qui ont apporté leurs connaissances scientifiques ainsi que leur sympathie et leur amitié. Merci en particulier à :

Robert-Alain, même si tu n'es plus au SN3 et que tu appartiens maintenant au plat pays, merci pour tes enseignements précieux sur la culture cellulaire et pour tous les petits et gros coups de main....

Chann pour avoir supporté pendant un an mes petites habitudes maniaques tout en gardant ta bonne humeur mais également pour les délicieuses recettes de tartes tatin aux pommes et aux tomates... Maintenant petit scarabée, tu vas devoir voler de tes propres ailes.

Nathalie, Virginie, Alessandro et David pour nos conversations non-scientifiques lors des pauses thé, votre disponibilité et votre gentillesse même aux heures les plus avancées de la journée, le pari de multiples paquets de chamallow et le suivi de l'actualité « hors thèse » à savoir les résultats des matchs de la Juventus ainsi que ceux des derniers grands prix de Formule 1....

Je remercie également ceux qui m'ont aidé et supporté ces dernières années : Eric, Ikram, Laurent, Séverine, Franck et Sylvain. Merci à Johann, Isabelle, Valérie et Sylvianne pour les milliers de litres de milieu de culture, les boites à lamelles, les Western-blot et les commandes. Le Professeur Benoni BOILLY pour nos discussions scientifiques. Albin pour tous les problèmes d'ordinateurs, d'imprimantes et de réseau que tu as réussi à débrouiller. Loïc et Gilles pour les scanners effectués. Sans oublier nos chers « physiologistes » Etienne, Christian et Fabien pour leur patience infinie lorsque je venais leur demander un renseignement ou emprunter un anticorps.

Merci à tous...

Enfin, je tiens à remercier le Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité du Nord) et l'Association pour la Recherche sur le Cancer pour leur soutien financier au cours de ces années.

SOMMAIRE

MECANISMES D'ACTION DU BUTYRATE SUR LA CROISSANCE DES CELLULES CANCEREUSES DE SEIN

RESUME	1
INTRODUCTION	3
I Développement normal et tumoral de la glande mammaire	4
I.A Développement normal de la glande mammaire	5
<i>I.A.1 Anatomie et histologie</i>	5
<i>I.A.2 Développement</i>	7
<i>a) Etape prénatale</i>	8
<i>b) Etape pubertaire</i>	8
<i>c) Gestation et lactation</i>	9
<i>I.A.3 Contrôle du développement</i>	9
I.B Développement tumoral de la glande mammaire	11
<i>I.B.1 Différents types de cancer du sein</i>	11
<i>I.B.2 Cancérogenèse mammaire</i>	13
- Mutations héritées (germinales)	15
- Mutations acquises (somatiques)	15
II Apoptose : mécanismes moléculaires et implication dans le développement tumoral	17
II.A Définition et description	18
II.B Mécanismes moléculaires	20
<i>II.B.1 Caspases : acteurs principaux de l'exécution de l'apoptose</i>	20
<i>a) Activation des caspases</i>	20
<i>b) Substrats des caspases</i>	22
<i>c) Inhibiteurs des caspases</i>	23

II.B.2 Voies biochimiques de l'apoptose	24
a) Voie intrinsèque mitochondriale	24
- Conséquences de la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux	24
- Contrôle de la libération des facteurs pro-apoptotiques par la famille Bcl-2	25
b) Voie extrinsèque des récepteurs de mort	27
- Différents récepteurs de mort et leur ligand	27
- Voie commune de la signalisation des récepteurs de mort	28
- Signalisation des différents récepteurs de mort	31
Signalisation de TNF-R1	31
Signalisation de Fas	33
Signalisation de TRAIL-R	36
- Inhibition des voies de signalisation des récepteurs de mort	36
II.C Défauts d'apoptose et implication dans le développement tumoral	39
III Traitements actuels et développement de nouvelles stratégies contre le cancer du sein	41
III.A Traitements actuels	42
III.A.1 Traitement loco-régional	42
a) Chirurgie	42
b) Radiothérapie	42
III.A.2 Traitement général	43
a) Hormonothérapie	43
b) Chimiothérapie	44
c) « Agents biologiques »	45
III.B Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses	46
III.B.1 Modulation de gènes anti- ou pro-apoptotiques	46
a) Inhibition de gènes anti-apoptotiques	46
b) Activation de gènes pro-apoptotiques	46
III.B.2 Utilisation de ligands des récepteurs de mort	47
a) Fas L	47
b) TRAIL	48

III.C Les inhibiteurs d'HDAC : agents anti-cancéreux potentiels	49
<i>III.C.1 Rôle des inhibiteurs d'histone déacetylases</i>	49
<i>a) Histone acétyltransferases et histone déacétylases</i>	49
<i>b) Acétylation et cancérogénèse</i>	50
<i>c) Inhibiteurs de HDAC</i>	51
<i>III.C.2 Le butyrate : un inhibiteur de HDAC prototypique</i>	54
<i>a) Production du butyrate</i>	54
<i>b) Effets biologiques du butyrate de sodium (NaB)</i>	54
<i>c) Effets moléculaires du NaB</i>	56
<i>III.C.3 Le butyrate et ses analogues : applications cliniques</i>	57
OBJECTIF DU TRAVAIL DE RECHERCHE	60
RESULTATS	62
I Effets et mécanismes d'action du NaB sur les cellules cancéreuses de sein	63
<i>I.A Article 1 “ Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells ”</i>	64
<i>I.B Article 2 “ P21^{WAF1/CIP1} is dispensable for G1 arrest but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells ”</i>	66
II Vers une application thérapeutique potentielle du NaB contre le cancer du sein ?	69
<i>II.A Article 3 “ Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by cotreatment with butyrate and TNF-alpha, TRAIL or anti-Fas agonist antibody involves enhancement of death receptors' signalling and requires P21^{waf1} ”</i>	70
<i>II.B Résultats non publiés</i>	112
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	120
BIBLIOGRAPHIE	132
ANNEXE	157

RESUME

Le cancer du sein est le premier cancer féminin de la communauté européenne avec près de 210 000 nouveaux cas par an. Face aux limites des thérapies classiques, la découverte de nouvelles molécules anti-tumorales et des approches combinant plusieurs agents anti-cancéreux font l'objet de nombreuses recherches. Dans ce cadre, le butyrate de sodium (NaB) a été proposé en tant qu'agent anticancéreux potentiel.

Nos résultats montrent que le NaB inhibe la croissance des cellules cancéreuses de sein. Cette inhibition est due à un blocage du cycle cellulaire et à une induction de l'apoptose. Ces deux phénomènes dépendent de l'inhibiteur de CDK (Cyclin Dependent Kinase) P21^{waf1} et non du suppresseur de tumeurs P53. De plus, l'induction de l'apoptose par le NaB impliquerait l'interaction de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) avec P21^{waf1} tandis que l'inhibition de la prolifération serait le résultat de l'inhibition des CDKs. Par ailleurs, des ligands de la superfamille du récepteur du TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor alpha) tels que TNF-alpha, TRAIL (TNF-alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) et Fas L potentialisent l'apoptose induite par le NaB. Ce phénomène est observé à la fois sur des lignées cancéreuses de sein hormono-sensibles (MCF-7, T47-D) et des lignées hormono-résistantes (BT-20). Cette induction synergique de l'apoptose est associée à une augmentation de plusieurs protéines clés impliquées dans la voie de signalisation des récepteurs de mort telles que les récepteurs de mort, l'adaptateur FADD, les caspases 8 et 9, Bid le membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, et le cytochrome c cytosolique. La transfection transitoire d'un plasmide p21^{waf1} antisens ou déficient pour son interaction avec PCNA diminue fortement l'induction synergique de l'apoptose. Cette inhibition est associée à l'absence de relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. De manière intéressante, les cellules épithéliales mammaires normales ne sont pas induites en apoptose par les cotraitements.

L'ensemble de ces travaux montrent que le NaB, seul ou en combinaison avec des ligands des récepteurs de mort, induit l'apoptose des cellules cancéreuses de sein. Cette apoptose est sous le contrôle P21^{waf1} et non de P53. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que 30 à 50% des tumeurs mammaires présentent des mutations de P53. Cependant, une meilleure compréhension du mécanisme d'action du NaB, ainsi que le test *in vivo* de l'efficacité des cotraitements dans l'inhibition du développement tumoral devraient contribuer à ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre le cancer du sein.

INTRODUCTION

I Développement normal et tumoral de la glande mammaire

I Développement normal et tumoral de la glande mammaire

I.A Développement normal de la glande mammaire

I.A.1 Anatomie et histologie

La glande mammaire est une glande cutanée au même titre que les glandes sudoripares et sébacées. Cette glande, incluse entièrement dans le tissu adipeux sous-cutané, est rattachée à la peau par ses seuls canaux excréteurs. C'est une glande tubulo-acineuse, de type composé, formée de 15 à 20 unités glandulaires indépendantes nommées lobes mammaires. La glande mammaire est une glande exocrine dont la fonction est la sécrétion lactée (Figure 1).

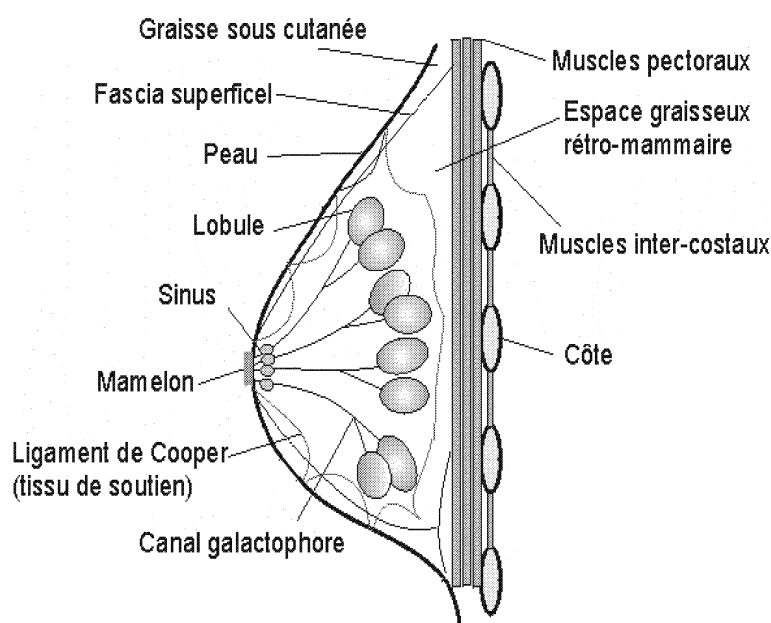


Figure 1 : Anatomie et structure de la glande mammaire. Adapté de <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

Chacun des lobes s'organise autour d'un canal excréteur (canal galactophore) qui conduit le lait au niveau de l'extrémité mamelonnaire par un orifice propre. Juste avant de s'ouvrir au niveau du mamelon, le canal galactophore forme une dilatation nommée sinus lactifère. A l'autre extrémité, le canal galactophore se divise en plusieurs canaux dits lobulaires. Chaque canal lobulaire se ramifie en canaux alvéolaires autour desquels se réunissent de façon très dense les acini. L'ensemble, acini, canaux alvéolaires et canaux

lobulaires constitue un lobule. L'ensemble des lobules drainés par un canal galactophorique se nomme un lobe (Figure 2).

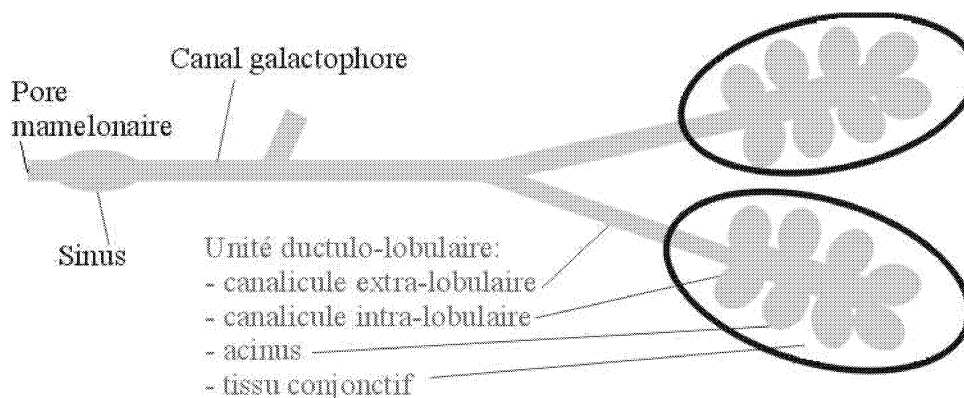


Figure 2 : Organisation générale d'un lobe mammaire. Chaque lobe est constitué de plusieurs lobules connectés à un même canal galactophorique. Adapté de <http://home.tiscali.be/salvatore.murgo/anatomie.htm>.

La glande mammaire est composée de plusieurs types cellulaires distincts. Le système lobulo-canalair est constitué d'une assise continue de cellules épithéliales, doublée d'une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales. Ces deux couches cellulaires reposent sur une lame basale recouverte d'un manchon fibroblastique plus ou moins développé. Les acini ou alvéoles sont composés de cellules épithéliales et de cellules myoépithéliales. Celles-ci sont entourées d'une lame basale et d'un tissu mésenchymateux (tissu palléal), composé de fibroblastes et d'adipocytes, fortement irrigué par les vaisseaux sanguins. Les cellules épithéliales ont plutôt une forme cylindrique, elles synthétisent et sécrètent le lait. Les cellules myoépithéliales ont une forme plus allongée et permettent par leur contraction l'évacuation du lait (Figure 3).

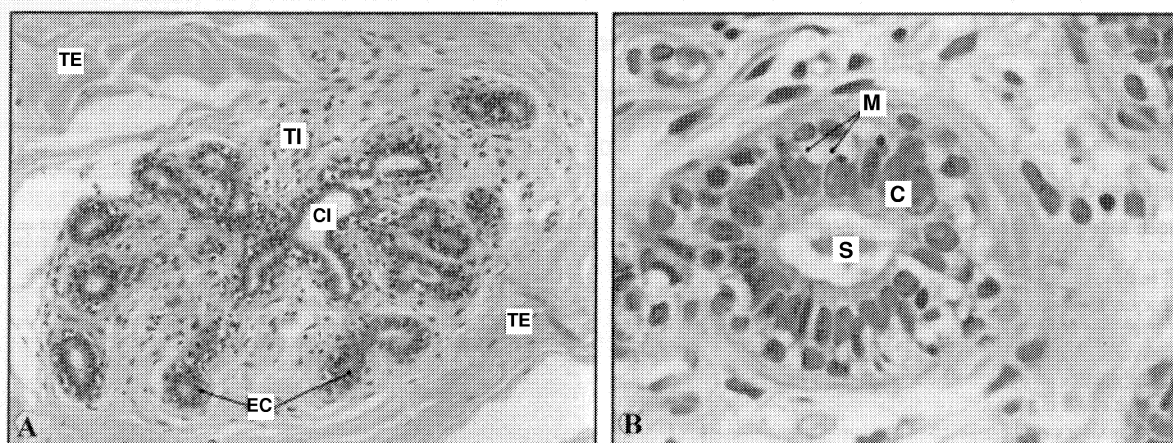


Figure 3 : Histologie de la glande mammaire normale. A, Lobule mammaire : CI canal intralobulaire ; EC extrémités canalaire ; TI tissu de soutien intralobulaire ; TE tissu de soutien extralobulaire. B, Canal terminal intralobulaire : C couche interne de l'épithélium présentant un aspect cubique, M couche externe constituée de cellules myoépithéliales, S canal sécrétoire. Adapté de Stevens and Lowe, 1992.

I.A.2 Développement

La période de croissance de la glande mammaire débute au cours de la vie fœtale et se poursuit lentement tout au long de l'existence. Ce développement s'effectue en plusieurs étapes et ne s'achève réellement que pendant la gestation et la lactation (Figure 4).

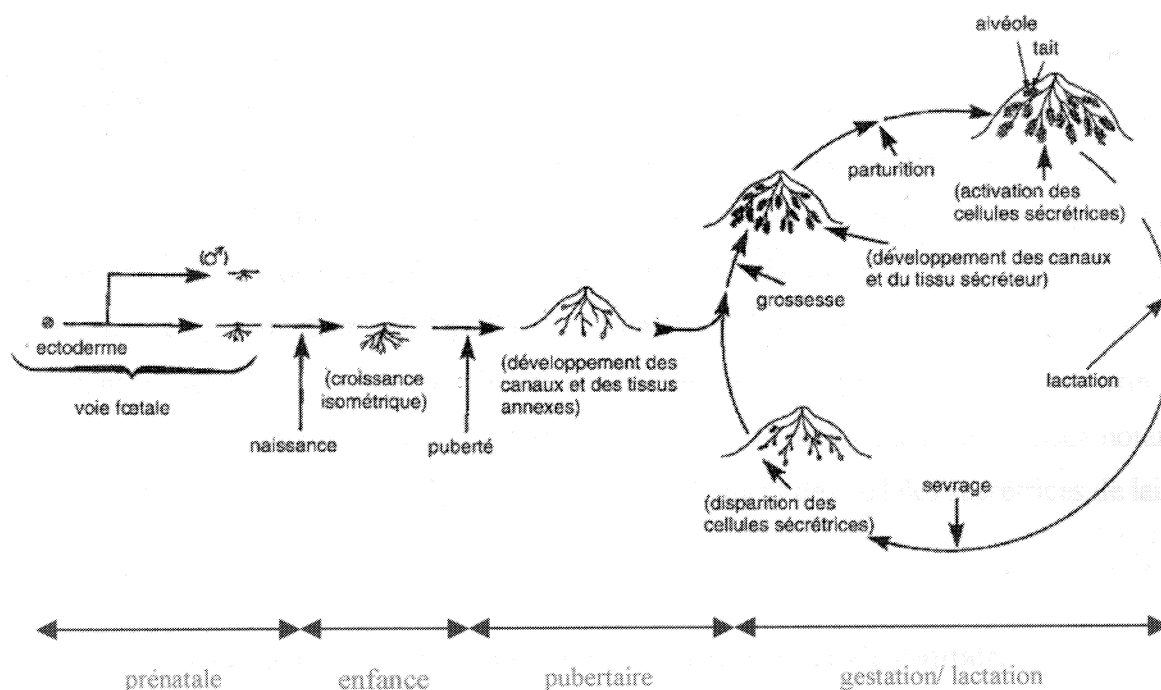


Figure 4 : Différentes étapes de la croissance et du fonctionnement de la glande mammaire. Adapté de Espie and Gorins, 1995.

a) Etape prénatale

Au cours de la 4^{ème} semaine du développement de la vie embryonnaire apparaît une paire symétrique de bourgeons mammaires primitifs le long de la crête mammaire (ligne lactéale), ces bourgeons correspondent à un épaissement de l'ectoderme (Figure 5). Dès la 6^{ème} semaine, la crête mammaire disparaît et seul les bourgeons mammaires subsistent, c'est la fin du développement embryonnaire (environ 7^{ème} semaine). Au cours du 5^{ème} mois, les bourgeons mammaires vont émettre dans le mésoderme sous-jacent 10 à 20 prolongements cylindriques. Ces derniers vont se ramifier, se dilater et se creuser pour former une lumière (futurs canaux galactophores), et ce vers les 7^{ème}-8^{ème} mois. A la naissance, la glande mammaire est donc réduite à un système de tubules très courts dont 15 à 20 canaux (futurs canaux galactophoriques) s'ouvrant au sommet de l'ébauche du futur mamelon. Lors de cette période, le mamelon fait saillie et l'aréole se pigmente légèrement. L'ébauche de la glande mammaire masculine est similaire à celle de la femme et s'arrête à ce moment là.

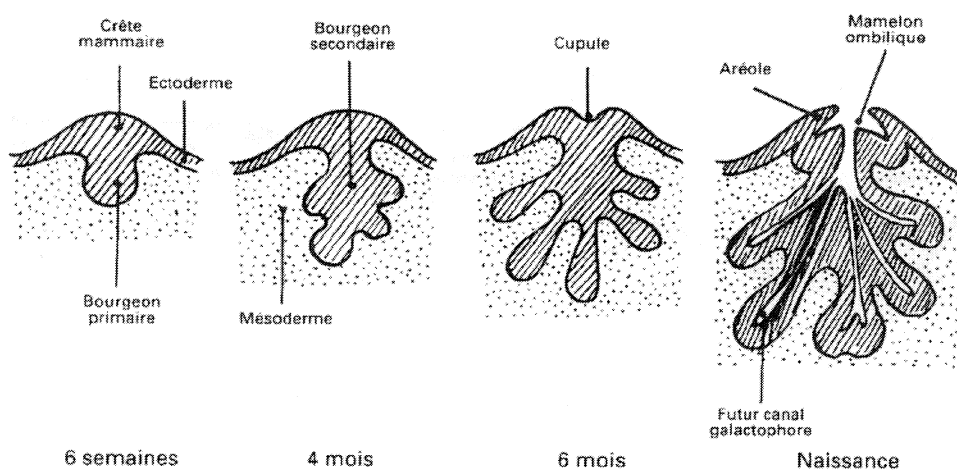


Figure 5 : Développement prénatal de la glande mammaire. Adapté de Espie and Gorins, 1995.

b) Etape pubertaire

De la naissance à la puberté, la croissance de la glande mammaire est minime et isométrique. A la puberté, la croissance s'accélère et des modifications morphologiques comme une augmentation de volume se produisent. Ceci est notamment dû à l'augmentation des adipocytes et le développement des canaux galactophoriques. D'autres modifications sont observées telles que la saillie du mamelon, et la pigmentation et la saillie de l'aréole. Les

lobules ne se forment que lors de la première ovulation (vers 14-15 ans) et le sein prend alors sa forme de nullipare.

c) Gestation et lactation

L'extension des canaux galactophores et la différenciation des acini glandulaires s'effectuent au cours de la gestation. La glande mammaire n'achève son développement qu'avec la lactation, période pendant laquelle les acini sont parfaitement différenciés et produisent alors le lait.

1.A.3 Contrôle du développement

Le tissu sécréteur mammaire n'a qu'une existence transitoire et cyclique. La glande mammaire connaît donc des phases successives de prolifération et d'involution ce qui explique que cet organe soit hautement contrôlé à la fois par des facteurs de croissance et des hormones.

Les facteurs de croissance sont des polypeptides de faible poids moléculaire se liant à des récepteurs transmembranaires de haute affinité sur des cellules cibles. Cette liaison entraîne, au niveau intracellulaire, une cascade de transduction permettant la transcription de gènes impliqués notamment dans la prolifération. Il est maintenant bien établi que chaque organe synthétise une grande partie des facteurs de croissance dont il a besoin. Ces facteurs agissent alors de manière paracrine et autocrine et non plus endocrine. Dans ce cadre, le sein synthétise un certain nombre de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor), les TGF-alpha et -beta (Transforming Growth Factor alpha et beta), les FGF (Fibroblaste Growth factors), MDGF-1 (Mammary Derived Growth Factor-1), les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins). Ces facteurs stimulant ou inhibant la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales, leur expression permet de réguler finement la prolifération de ces cellules et donc l'homéostasie des tissus normaux (Tableau 1).

Effet sur la prolifération	Facteur de croissance	Cellule productrice
Stimulateur	EGF	Epithéliale
	IGF-I	Epithéliale et myoépithéliale
	TGF-alpha	Epithéliale
	FGF	Epithéliale, myoépithéliale, fibroblaste
	MDGF-1	Epithéliale
Inhibiteur	TGF-beta	Epithéliale
	IGFBP	Epithéliale

Tableau 1 : Facteurs impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales mammaires normales. Les IGFBP ne sont pas à proprement parler des facteurs de croissance mais permettent principalement la capture des IGF, modulant ainsi de façon négative la prolifération.

La croissance de la glande mammaire est également sous le contrôle d'hormones qui agissent de manière endocrine sur les cellules cibles et participent à l'homéostasie tissulaire du sein. Parmi ces hormones, il est possible de citer les oestrogènes et la progestérone mais également la prolactine et l'insuline. Oestrogènes et progestérone sont des hormones d'origine ovarienne jouant un rôle clef dans le contrôle de la croissance. En effet, à la puberté et durant la grossesse, les oestrogènes stimulent la croissance des canaux et augmentent le taux de récepteurs à la progestérone, tandis que la progestérone stimule plutôt le développement des acini (Hansen and Bissell, 2000). Les oestrogènes agissent de diverses manières sur la prolifération des cellules. Ainsi, le traitement de cellules par l'œstradiol permet une synthèse précoce d'ADN mais également l'activation de gènes cibles tels que fos, jun, myc et myb. L'œstradiol régule également l'expression de gènes codant : (1) des facteurs de croissance tels que l'EGF, les TGF-alpha, et -beta, l'IGF-II, le FGF-I, et leurs récepteurs (El Yazidi et al., 1998) ; (2) des récepteurs des hormones stéroïdiennes tels que les récepteurs aux oestrogènes ; (3) des composants des voies de transduction des facteurs de croissance tels que Fos et la Cycline D1 (May and Westley, 1995). De même que pour les facteurs de croissance, le contrôle de la prolifération par les oestrogènes est finement régulé. Ainsi, la stimulation de la production de facteurs de croissance par les oestrogènes s'accompagne de possibles mécanismes de rétrorégulation négative permettant à la cellule d'éviter de proliférer de manière incontrôlée. Par ailleurs, les oestrogènes stimulent la synthèse de protéases (uPA, Cathepsine D) qui, en dégradant la matrice extracellulaire, vont contribuer indirectement à la multiplication des cellules (Rocheffort et al., 2001).

Enfin, la matrice extracellulaire joue également un rôle essentiel dans le contrôle de l'homéostasie de cet organe. La croissance normale du sein dépend donc d'une balance complexe entre facteurs inhibiteurs et activateurs de la croissance. Cette balance met en jeu à la fois des interactions directes cellules/cellules, cellules/matrice extracellulaire et des interactions indirectes *via* les hormones et/ou les facteurs de croissance.

I.B Développement tumoral de la glande mammaire

I.B.1 Différents types de cancer du sein

Le cancer du sein est le premier cancer féminin de la communauté européenne avec environ 210 000 nouveaux cas par an et 73 000 décès annuels. Les études statistiques permettent d'estimer que 1 femme sur 10 développera un cancer du sein au cours de sa vie. C'est une maladie grave représentant la première cause de mortalité chez les femmes de 35 à 55 ans des pays développés. La survie globale tous stades confondus (avec bien entendu des écarts importants selon les stades) est d'environ 65 % à 5 ans et de 50 % à 10 ans. Cependant, cette pathologie est une maladie à évolution lente caractérisée par l'apparition de métastases. Ainsi, 6 à 8 ans sont nécessaires pour qu'à partir d'une cellule apparaisse une tumeur d'un volume de 2 cm³. Pendant cette phase infra-clinique (période de non détection de la tumeur), il existe des phénomènes d'invasion microscopique de la membrane basale faisant passer la tumeur d'un état de carcinome *in situ* (non invasif) à un état de carcinome invasif. Les cellules néoplasiques essaient de la tumeur primitive par voie lymphatique ou sanguine. De ce fait, les premiers relais ganglionnaires atteints sont les ganglions axillaires (inférieur puis moyen puis supérieur), viennent ensuite les chaînes mammaires internes, et enfin les ganglions sus-claviculaires en cas de tumeur externe. Cet envahissement ganglionnaire est un reflet du potentiel métastatique et sa présence est corrélée à la taille de la tumeur et au grade histologique. Le cancer du sein peut également donner des métastases à distance notamment au niveau des os, du foie, des poumons, de la plèvre, de la peau et du cerveau.

Les cancers du sein peuvent se classer en 2 catégories :

- Les carcinomes primitifs du sein (adénocarcinomes). Ils représentent 99 % des cancers et correspondent à des tumeurs épithéliales à différenciation glandulaire.

- Les autres tumeurs malignes du sein. Ces dernières représentent un groupe de lésions disparates comportant des sarcomes, des lymphomes non hodgkiniens et des métastases mammaires témoignant d'un cancer primitif de nature variable. Vue leur rareté, ces tumeurs ne seront pas évoquées ultérieurement.

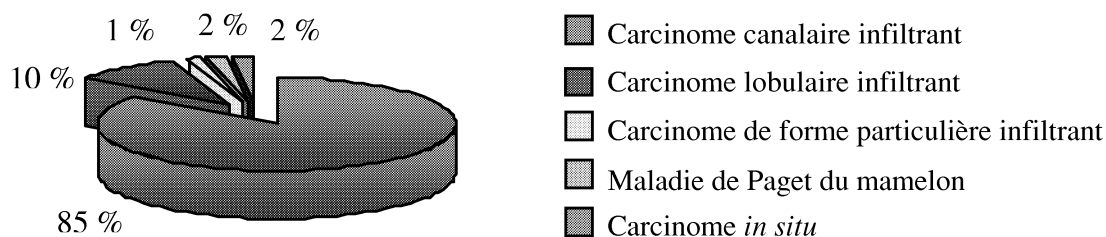
Parmi les adénocarcinomes sont distingués (Figure 6) :

- **Les carcinomes *in situ* (non infiltrants).** Ces carcinomes sont soit *canalaires* (CCIS) soit *lobulaires* (CLIS). Les carcinomes canauxaires sont définis comme « des carcinomes des galactopores n'infiltrant pas le tissu conjonctif ». Il existe 4 types architecturaux différents. Ces carcinomes ne franchissent pas la lame basale et sont de bon pronostic. Les carcinomes lobulaires sont « des carcinomes intéressant les canalicules intralobulaires qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives sans envahissement du tissu conjonctif voisin ». Ces carcinomes sont souvent bilatéraux et évoluent dans 20 % des cas vers une forme infiltrante.

- **Les carcinomes infiltrants.** Ces carcinomes sont souvent *canalaires* (85 % des cas de cancers), ou *lobulaires* (10 %). Il existe des *formes plus rares* (1 %) qui sont les carcinomes médullaires, tubuleux, bulbaires, cylindromes et colloïdes.

- **La maladie de Paget du mamelon** (2 %). Cette lésion correspond à une extériorisation au niveau du mamelon d'un carcinome mammaire sous-jacent de nature canalaire et parfois infiltrant.

A- Distribution des carcinomes primitifs du sein



B- Histologie des carcinomes

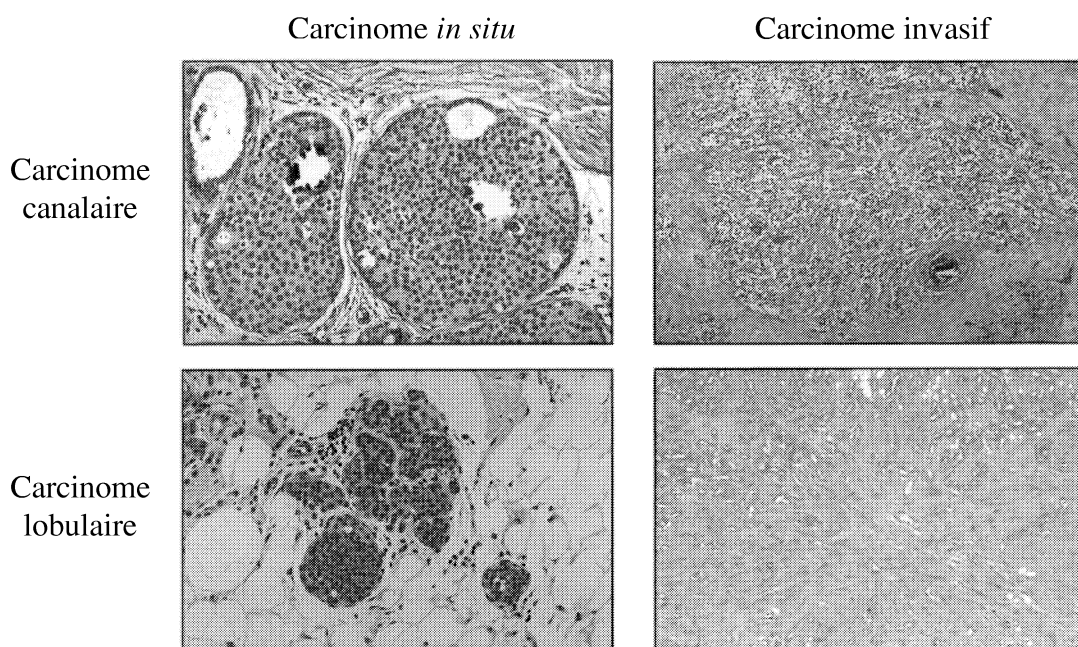


Figure 6 : Différents types de carcinomes primitifs de sein. A, Distribution des adénocarcinomes primitifs du sein. B, Immuno-histologie de cancers *in situ* ou invasifs. Adapté de <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/BREAST/BREAST.html>

I.B.2 Cancérogenèse mammaire

La cancérogenèse mammaire est un phénomène complexe résultant de la combinaison d'une multitude de facteurs, que cela soit dans les cas de cancers héréditaires (anomalies génétiques constitutives germinales) et/ou les cas sporadiques de cancer (anomalies génétiques acquises somatiques). L'acquisition de ce polymorphisme de mutations de gènes de susceptibilité au cancer dépend d'agents environnementaux, du comportement et de facteurs locaux et systémique. Schématiquement, la carcinogenèse mammaire est le résultat

d'une succession d'étapes contribuant à l'évolution d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (Sidransky, 2002) (Figure 7).

Ce processus est du à l'altération progressive de l'expression de gènes favorisant (oncogènes) ou au contraire empêchant (suppresseurs de tumeurs) le développement cancéreux (Macleod, 2000). Ces altérations permettent à la cellule de :

- se répliquer de façon infinie (immortalisation des cellules)
- croître en l'absence de stimulation externe
- être insensible au rétrocontrôle modérant la prolifération cellulaire
- échapper à la mort par apoptose
- favoriser l'angiogenèse
- envahir les tissus adjacents et métastaser

La transmission de ces acquis par mitose favorise donc la croissance clonale des cellules. Les modifications les plus fréquemment observées dans le cas du cancer du sein sont des pertes d'hétérozygotie concernant un chromosome ou un bras de chromosome, des amplifications d'oncogènes et des mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeur.

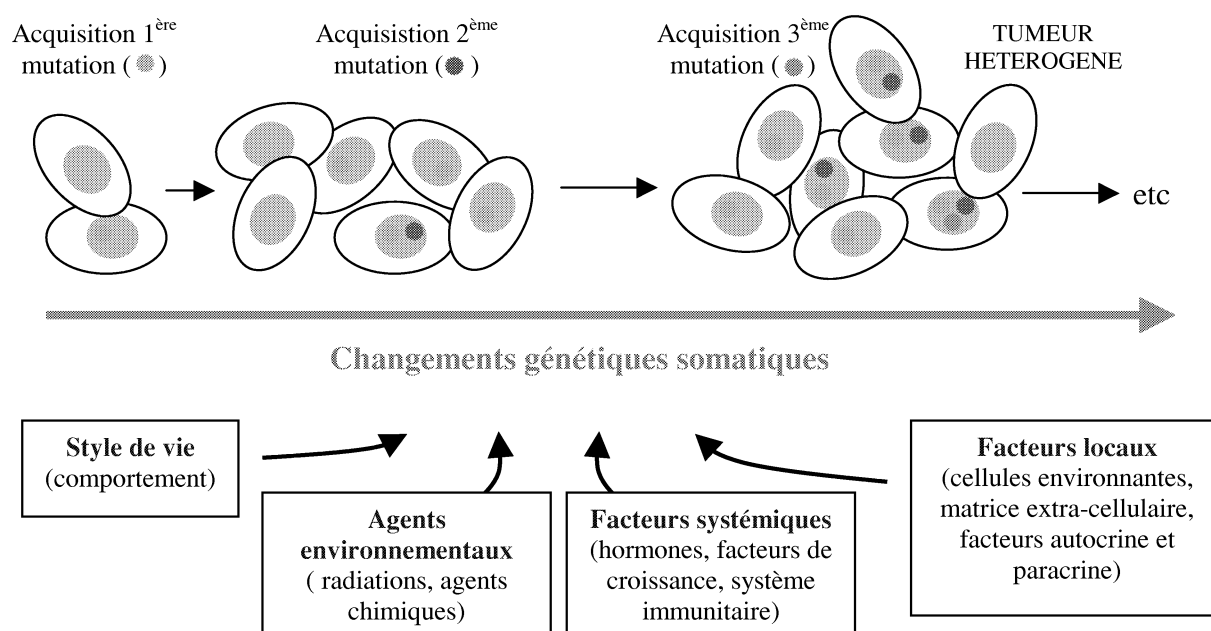


Figure 7 : Facteurs influençant la cancérogénèse mammaire. La cancérogénèse est un processus d'accumulations d'altérations génétiques. Ces mutations peuvent être induites par une multitude des facteurs différents.

Mutations héritées (germinales)

Les mutations héritées sont responsables de 5 à 10 % des cancers du sein. Le nombre de membres de la famille atteints et l'âge de déclaration de la pathologie sont corrélés à la pénétrance des altérations génétiques héritées. Deux de ces gènes ont été identifiés sur la base d'analyses de liaison dans des familles atteintes. Il s'agit des gènes *bca1* et *bca2* codant des protéines nucléaires contribuant à la recombinaison homologue, à la réparation de l'ADN et à l'expression de certains gènes (Rosen et al., 2003 ; Daniel, 2002). La mutation d'un de ces gènes contribue grandement à augmenter le risque de développer un cancer du sein. Il existe d'autres gènes associés à cette pathologie, ces derniers présentent toutefois une pénétrance moins grande que celle de *bca1* et *bca2*. Ainsi, le syndrome de Cowden (tumeurs du sein et de la thyroïde) présente des mutations dans la lignée germinale du gène suppresseur de tumeur *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog Protein) (Longy, 2001). Le syndrome de Li-Fraumeni (forme héréditaire de cancers touchant l'enfant et l'adulte jeune, caractérisé par un large spectre tumoral incluant les sarcomes des tissus mous, les ostéosarcomes, les tumeurs cérébrales, les corticosurrénales et les cancers du sein préménopausiques) est associé à des mutations dans la lignée germinale du gène *p53* (Varley, 2003). Dans d'autres cas plus rares, *rad 53* (également connu sous le nom de *chk2* pour checkpoint kinase 2) est impliqué dans les cas de leucémies, de tumeurs du sein, du cerveau (Ingvarsson et al., 2002). A l'exception de *PTEN*, les gènes impliqués dans la prédisposition génétique au cancer du sein codent des protéines associées à la réponse aux dommages à l'ADN, suggérant une connection encore non expliquée entre la maintenance de l'intégrité du génome et une tumorigénèse spécifique de l'organe.

Mutations acquises (somatiques)

La majorité des cancers du sein ne paraissent pas dépendre d'une histoire familiale et les bases moléculaires de ces cancers sporadiques ne sont pas encore bien définies. Parmi les oncogènes, la sur-expression et/ou l'amplification génique de *c-myc* (facteur de transcription impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose), de *ccnd* (gène codant la Cycline D contrôlant le cycle cellulaire par régulation de kinases cycline-dépendantes) et de *erb-B2* (récepteur de type I de facteurs de croissance s'hétérodimérisant avec d'autres récepteurs de cette famille) est fréquemment reportée. Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, des altérations de l'expression de *p53*, de *rb*, de *p16^{INK4}*, de *p27^{KIP1}* et de *bca* sont souvent décrites. Ainsi, des mutations de *p53* sont décrites dans 30 à 50 % des tumeurs

primitives du sein (Hill and Sommer, 2002). P53 est un facteur de transcription participant au maintien de l'intégrité du génome par arrêt du cycle cellulaire en G1 voire en G2. Il permet également la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose (récepteurs de mort et membres de la famille bcl-2) et la survie (IGF-1, IGF-R1) (Gasco et al., 2002). Le gène rb est quant à lui le premier gène suppresseur de tumeur découvert. Il code une protéine impliquée dans le contrôle de la croissance et du cycle cellulaire s'associant notamment au facteur de transcription E2F et à la Cycline D. Des anomalies de structure de ce gène sont constatées dans 20 % des cas de cancer du sein, et dans 30 % des cas il y a une absence d'expression de la protéine. Les gènes p16^{INK4} et p27^{KIP1} codent des inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes et sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Dans environ 46 % des lignées étudiées, des délétions de p16^{INK4} ou de p27^{KIP1} sont constatées (Tsihlias, 1999). Toutes ces altérations sont d'ordre génétique, cependant il ne faut pas oublier que d'autres altérations dites épigénétiques telles que l'acétylation ou la méthylation de l'ADN peuvent jouer également un rôle dans le processus de cancérogénèse. Schématiquement, l'acétylation des histones permettrait un décompactage de la chromatine favorisant ainsi l'accès de facteurs de transcription au niveau de l'ADN et donc la transcription des gènes. Au contraire, la méthylation des cytosines regroupées sous forme d'îlots CpG inhiberait la transcription des gènes, ce qui contribuerait au processus de cancérogénèse (Widschwendter and Jones, 2002). Ainsi, dans certains cas de cancers du sein, une inactivation de bcr1 due à l'hyperméthylation de son promoteur a été constatée (Lu et al., 2001).

II Apoptose : mécanismes moléculaires et implication dans le développement tumoral

II Apoptose : mécanismes moléculaires et implication dans le développement tumoral

II.A Définition et description

L'apoptose est un processus physiologique permettant le contrôle du nombre de cellules et jouant un rôle critique à la fois dans le développement et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Il était déjà connu dès le milieu du XIX siècle que la disparition d'une cellule n'était pas simplement le résultat de l'usure du temps ou des agressions de l'environnement, mais était plutôt due à une capacité de s'autodétruire (Vogt C, 1842). Néanmoins, ce n'est que depuis une trentaine d'années que l'apoptose a été considérée comme une fonction à part entière, provoquant un essor soudain et considérable de ce domaine de recherche. Le terme apoptose est issu du grec et signifie « chute des feuilles en automne ». Il a été introduit pour la première fois en 1972 par Kerr et désigne à la base une séquence d'altérations morphologiques dont la condensation du cytoplasme, la fragmentation de l'ADN et une perte de l'asymétrie membranaire (Kerr et al., 1972). Ces réarrangements morphologiques sont accompagnés d'évènements biochimiques et dépendent de l'existence d'un programme moléculaire permettant aux cellules de déclencher leur suicide. Cependant, la définition de l'apoptose reposant uniquement sur une description morphologique, il est apparu depuis 3 à 4 ans que ce terme était trop restrictif pour définir l'ensemble des morts cellulaires programmées (certaines ne s'accompagnant pas forcément de tous les critères décrits initialement) (Wyllie and Golstein, 2001 ; Leist and Jaattela, 2001). Ainsi, le concept de mort programmée s'est élargi et l'apoptose est maintenant considérée comme une forme de mort cellulaire programmée parmi d'autres.

L'apoptose peut être décrite comme une succession de plusieurs étapes qui se chevauchent plus ou moins dans le temps. Au niveau morphologique, les mitochondries se condensent et les organites intracellulaires s'agrègent en se localisant autour du noyau. La chromatine est condensée en amas péri-nucléaires puis le noyau se fragmente (Figure 8). Les cellules initialement adhérentes perdent leur faculté d'adhésion et deviennent rondes. Le cytoplasme se rétracte et la cellule se fragmente en corps apoptotiques qui sont rapidement phagocytés sans induire de réponse inflammatoire (Keer et al., 1972). Au niveau biochimique,

l'ADN est clivé entre les nucléosomes donnant naissance à des fragments multiples de 180 à 200 paires de bases visibles en gel d'agarose sous forme « d'échelle d'ADN ». La membrane cytoplasmique subit des remaniements avec la translocation des phosphatidyl-sérines vers le feuillet externe. Enfin, un certain nombre de substrats intracellulaires tels que la PARP (Poly ADP Ribose Polymerase) sont clivés (Cohen et al., 1994 ; Martin et al., 1995 ; Martin and Green, 1995).

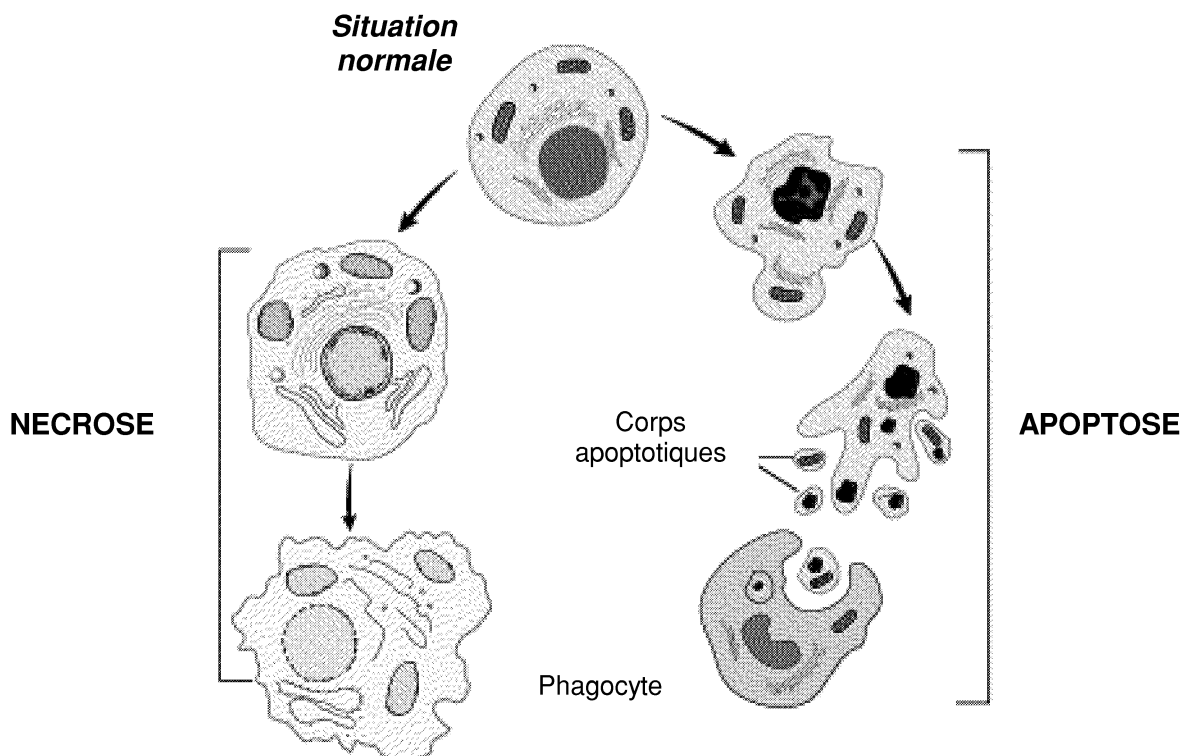


Figure 8 : Morphologie des cellules apoptotiques. Lors de l'apoptose les cellules diminuent de volume, la chromatine se condense et se fragmente, le cytoplasme se divise sans perte de l'intégrité membranaire en corps apoptotiques qui seront par la suite phagocytés. Lors de la nécrose, les cellules augmentent de volume et la membrane est endommagée entraînant la libération du cytosol dans l'espace extracellulaire. Adapté de Saikumar (Saikumar et al., 1999.)

II.B Mécanismes moléculaires

II.B.1 Les caspases : acteurs principaux de l'exécution de l'apoptose

a) Activation des caspases

L'induction de l'apoptose requiert dans la grande majorité des cas l'activation de protéases à cystéine, appelées caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinases). C'est une famille très conservée au cours de l'évolution et des analogues des caspases sont trouvés chez les hydres, les insectes et les nématodes. L'ensemble des membres de cette famille possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine localisé dans un motif QACXG (Gln-Ala-Cys-X-Gly) (Figure 9).

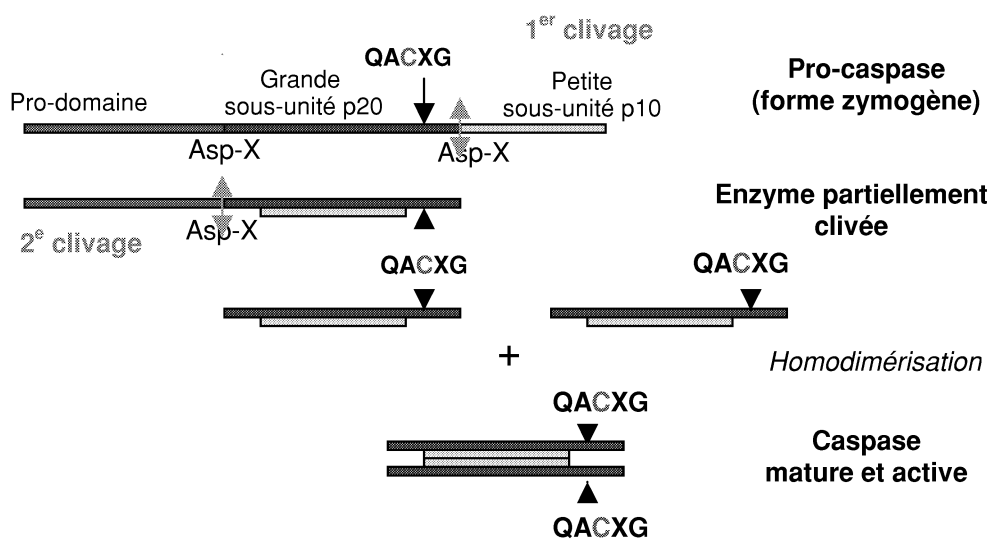


Figure 9 : Activation des caspases. Les formes inactives des caspases sont constituées d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité portant le site catalytique (p20) et d'une petite sous-unité (p10). Leur clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande, aboutit à la formation de la forme active de l'enzyme. Adapté de Couzinet (Couzinet et al., 2002).

Le résidu X peut être R (Arg), Q (Gln) ou G (Gly) et le résidu cystéine est directement impliqué dans le site catalytique. Ces enzymes reconnaissent puis clivent des chaînes polypeptidiques après un résidu aspartique situé au niveau de l'extrémité carboxyle. La spécificité des caspases pour leur substrat est fonction de la nature du résidu situé en quatrième position du site de reconnaissance/clivage. Ces enzymes existent sous une forme

inactive (zymogène ou pro-caspase) dans le cytoplasme. Leur protéolyse, par d'autres caspases ou par elle-même (grâce à leur activité autocatalytique), induit la formation d'une forme active de l'enzyme. La caspase ainsi formée est composée de 2 hétérodimères. Chacun de ces dimères est constitué de l'association de 2 sous-unités et comprend 1 site catalytique (Budihardjo et al., 1999). La caspase possède donc en tout deux sites catalytiques potentiellement actifs.

Toutes les caspases possèdent en position amino-terminale un pro-domaine dont la taille est variable et a permis une classification de ces enzymes (Tableau 2).

Largeur du pro-domaine	Nom de la caspase	Poids (kD)
Pro-domain long (Caspase initiatrice)	Caspase 13	43
	Caspase 5	48
	Caspase 4	43
	Caspase 1	45
	Caspase 8	55
	Caspase 10	55
	Caspase 2	51
Pro-domain court (Caspase effectrice)	Caspase 9	46
	Caspase 7	35
	Caspase 3	32
	Caspase 6	34
	Caspase 14	30

Tableau 2 : Classifications des caspases.

Les caspases « initiatrices » sont situées en amont de la cascade du signal pro-apoptotique et présentent un long pro-domaine. Elles contiennent des motifs d'interactions protéine-protéine impliqués dans la transduction du signal tels que les DED (Death Effector Domain) pour les caspases 8 et 10 ou CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les caspases 1, 2, 4, et 9. Les caspases 8 ou 10 seraient activées par auto-clivage résultant de la concentration importante de pro-caspases recrutées au niveau d'un complexe de signalisation de la mort ou DISC (Death Inducing Signaling Complex). Ce complexe comprend des récepteurs membranaires, la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et les procaspases 8 ou 10. Cette hypothèse supposerait la présence dans les pro-caspases initiatrices d'une activité de clivage intrinsèque suffisante pour leur auto-activation. La caspase 9 est intégrée quant à elle au sein d'un complexe multiprotéique nommé « apoptosome » et nécessite la présence d'autres protéines telles qu'Apaf-1 et le cytochrome c pour être active.

Les caspases « exécutoires » sont situées plus en aval et présentent un pro-domaine plus court. Il s'agit des caspases 3,6,7 et 14. Elles sont activées suite à leur clivage par d'autres caspases. Le clivage de ces caspases induit l'activation et l'amplification d'une cascade de caspases se clivant les unes les autres, aboutissant à la dégradation de substrats.

b) Substrats des caspases

Le clivage de substrats par les caspases « effectrices » est à l'origine de la plupart des événements biochimiques et morphologiques de l'apoptose (Thornberry and Lazbenik, 1998). Les cibles des caspases peuvent être classées en deux groupes : (1) des protéines régulatrices, (2) des protéines de structure et de « ménage ». Le clivage des protéines régulatrices renforce l'activité pro-apoptotique tandis que celui des protéines du second groupe induit la désorganisation de la cellule.

Le premier groupe inclut plusieurs kinases telles que MEKK1 (MAPK/ERK Kinase Kinase 1), PAK-2 (P21-Activated protein Kinase 2) et Mst-1. Le clivage de ces kinases par les caspases provoque une rétro-régulation positive de JNK (Jun N-terminal Kinase) et de SAPK (Stress Activated Protein Kinase) contrôlant certaines voies apoptotiques. Le clivage par les caspases peut également inactiver des régulateurs négatifs de l'apoptose tels que FAK (Focal Adhesion Kinase), PI-3 Kinase (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase), Akt (également appelée PKB pour Protein Kinase B), des inhibiteurs endogènes des caspases tels que les IAP, et des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Un autre exemple est le clivage de ICAD. En effet, la fragmentation de l'ADN est due à l'action de la caspase 3 sur un complexe comprenant une nucléase (CAD : Caspase dependent DNase), un facteur de fragmentation de l'ADN (DFF40 : DNA Fragmentation Factor 40), et l'inhibiteur de CAD (ICAD) (Enari et al., 1998). Dans les cellules non-apoptotiques, CAD est présent dans un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD. Lors de l'apoptose, la caspase 3 clive l'inhibiteur ICAD permettant à la nucléase de cliver la chromatine. L'autre groupe cible des caspases inclut des protéines de structure (lamines nucléaires, actine, gelsoline, fodrine, spectrine) et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN dont PARP et MCM-3. Ces protéolyses induisent à terme une dissociation de la membrane plasmique du cytosquelette et la formation des corps apoptotiques. La translocation des phosphatidyl-sérines sur le feuillet externe de la membrane cytoplasmique lors de l'induction de l'apoptose est généralement dépendante des caspases.

c) Inhibiteurs des caspases

Les cellules contiennent des inhibiteurs naturels des caspases nommées IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins). Ces IAP, initialement découverts dans les baculovirus, furent par la suite trouvés dans les cellules humaines et présentent une activité anti-apoptotique en culture. Cette famille comporte à ce jour 8 membres : XIAP (X-linked Inhibitors of Apoptosis Proteins), c-IAP1, c-IAP2, NIAP (neuronal IAP), BRUCE, ML-IAP, KIAP et la survivine (Richter and Duckett, 2000). Les IAP se lient aux caspases par l'intermédiaire de un à trois domaines BIR (baculovirus IAP repeats). Ces mêmes motifs BIR inhibent l'activation des caspases. XIAP a été décrit comme inhibant notamment la caspase initiateur 9 et les caspases effectrices 3 et 7. Certains IAP possèdent en plus un domaine RING agissant comme une ubiquitine ligase et permettant la dégradation du complexe IAP/Caspase. A proximité du domaine RING se trouve parfois un domaine CARD, ce qui suggère que les IAP pourraient également réguler l'activation des caspases *via* des interactions des domaines CARD. Ainsi, les IAP inhibent l'apoptose soit par liaison et blocage du site actif de la caspase, soit par induction de la dégradation des caspases par le protéasome (Yang and Li, 2000). Néanmoins, les IAP sont également capables d'activer la kinase IKK2 (I Kappa B Kinase) qui phosphoryle IKB (Inhibitor of NF Kappa B). Cette phosphorylation induit la libération de NF Kappa B (Nuclear Factor of Kappa B) qui passe alors dans le noyau et exerce son rôle de facteur de transcription (Hofer-Warbinek et al., 2000). Les IAP et particulièrement XIAP ont été également décrits comme inhibant l'apoptose à travers leur activation par la voie PI-3K/Akt (Gagnon et al., 2003 ; Carter et al., 2003). Enfin, l'activité des IAP peut être modulée par des inhibiteurs tels que XIAP1 (Xiap-Associated Factor 1), Smac/Diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP Binding protein with Low Pi) et HtrA2/Omi (High Temperature Requirement A) (Holcik et al., 2001).

II.B.2 Voies biochimiques de l'apoptose

L'activation de caspases en cascade permet l'amplification du signal initial. Actuellement, deux voies principales conduisant à l'activation des caspases et donc à l'induction de l'apoptose ont été décrites :

- la voie « intrinsèque » dépendant de la participation de la mitochondrie
- la voie « extrinsèque » impliquant des récepteurs membranaires dits « récepteurs de mort » tels que le récepteur du TNF (Tumor Necrosis Factor).

a) Voie intrinsèque mitochondriale

La mitochondrie, bien que depuis longtemps connue pour être indispensable à la production d'ATP, a été récemment découverte comme étant impliquée dans l'apoptose. Ainsi, l'induction de dommages à l'ADN, des défauts dans le cycle cellulaire, des conditions d'hypoxie, la perte de facteurs de croissance ou d'autres stress cellulaires induisent des modifications mitochondriales aboutissant au relargage de facteurs contenus dans l'espace intermembranaire vers le cytoplasme.

Conséquences de la libération de facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux

Les protéines ainsi libérées possèdent des propriétés pro-apoptotiques et sont regroupées sous le nom de SIMP (Soluble Inter-membrane Mitochondrial Proteins). Les SIMP comprennent notamment des facteurs tels que le cytochrome c, la pro-caspase 9, Apaf-1, Smac/Diablo, AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et l'endonucléase G.

Une fois libéré dans le cytoplasme, le cytochrome c en présence d'ATP interagit avec Apaf-1. Ce complexe recrute alors notamment la pro-caspase 9 et forme une structure multiprotéique nommée apoptosome. La forme active de la caspase 9 ainsi obtenue ne résulte pas d'un simple clivage mais apparaît être nécessairement liée à Apaf-1. L'apoptosome active alors à son tour d'autres caspases effectrices telles que les caspases 3 et 7 (Zou et al., 1999). La protéine Smac/Diablo, quant à elle, permet l'activation des caspases par inactivation des inhibiteurs de caspases, les IAPs. AIF agit différemment, c'est une protéine SIMP qui induit une apoptose indépendante des caspases. Une fois relargué de la mitochondrie, AIF se localise dans le noyau et provoque une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN.

De même, Endo G est une endonucléase responsable de la dégradation de l'ADN, et ce de manière indépendante des caspases (Candé et al., 2002 ; Van Loo et al., 2002) (Figure 10).

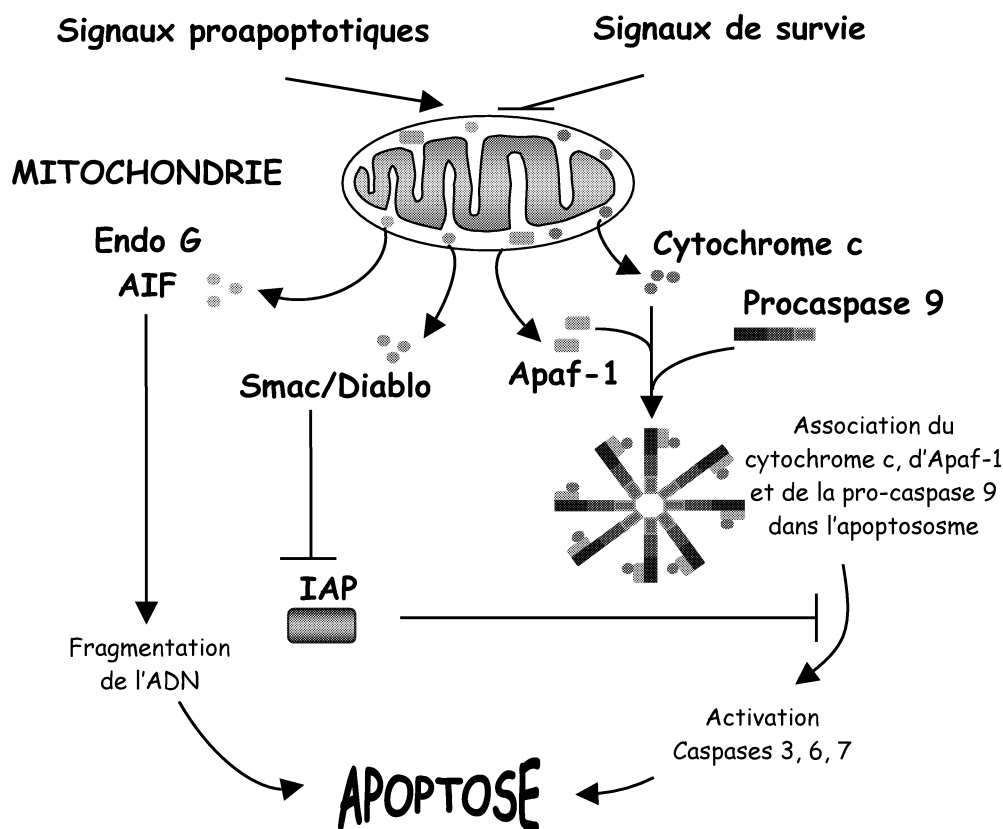


Figure 10 : Induction de l'apoptose par la voie mitochondriale. Adapté de Zimmermann (Zimmermann et al., 2001).

Contrôle de la libération des facteurs pro-apoptotiques par la famille Bcl-2

Le relargage des facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytoplasme est sous le contrôle des protéines membres de la famille Bcl-2. Bcl-2 a été identifié initialement comme proto-oncogène dans les lymphomes folliculaires B. Jusqu'à présent, 19 membres de la famille Bcl-2 ont été identifiés dans les cellules de mammifères. Ces membres possèdent tous de 1 à 4 motifs nommés BH pour Bcl-2 homology domains (BH1 à BH4). La famille Bcl-2 peut se subdiviser en trois catégories suivant leur fonction et leur structure. (1) Les membres anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl-X1, Bcl-W, Mcl-1, A1 (Bfl-1), NR-13 et Boo (Diva) inhibent l'apoptose et contiennent au moins les domaines BH1, BH2 et BH4. Des

membres d'origine virale tels que ORF16, BHRF1, E1B-19K et LMW5-HL peuvent également se classer dans cette catégorie. (2) Les membres pro-apoptotiques tels que Bax, Bak, Bok (Mtd) possèdent les domaines BH1, BH2 et BH3. (3) Les membres pro-apoptotiques « BH3 only » tels que Bid, Bad, Bim, Bik, Blk, Hrk (DP5), Bnip3, Bim_L, Noxa et Puma présentent seulement un domaine BH3 central (Antonsson et Martinou, 2000) (Figure 11).

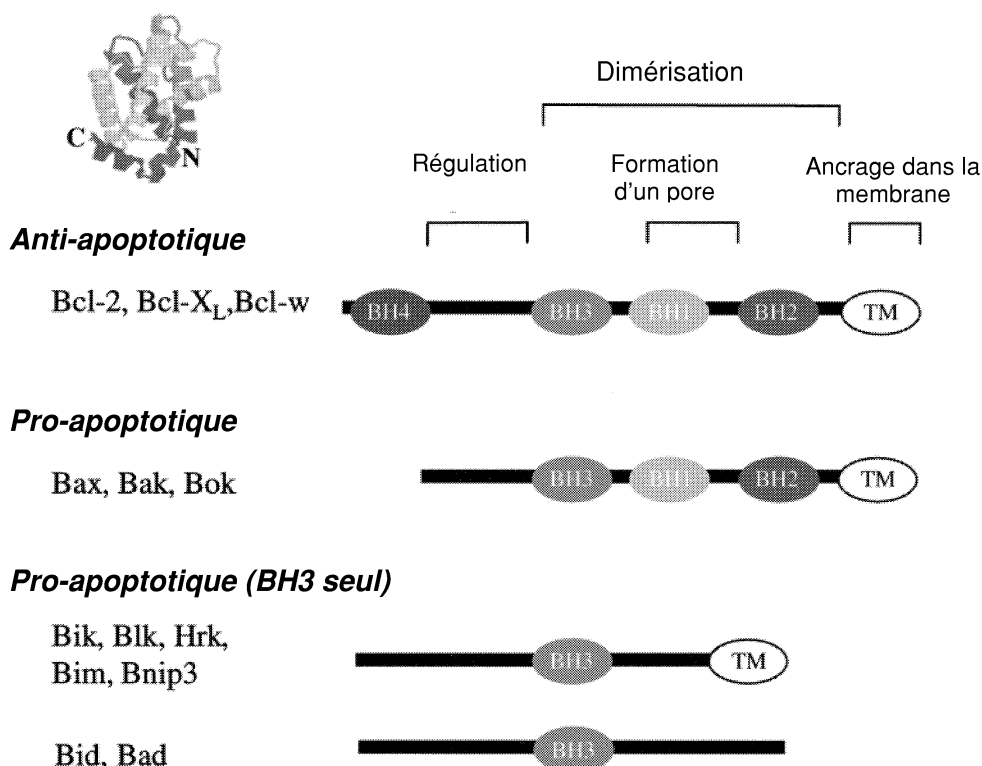


Figure 11 : Membres de la famille Bcl-2. Trois sous-groupes sont indiqués, les membres anti-apoptotiques permettent la survie tandis que les membres pro-apoptotiques induisent l'apoptose. Plusieurs domaines fonctionnels sont représentés et le domaine d'ancrage à la membrane (TM) n'est pas présent dans tous les membres de la famille. Adapté de Zimmermann (Zimmermann et al., 2001).

Des études de localisation intracellulaire ont montré que les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 se trouvent déjà insérés principalement au niveau des membranes intracellulaires (noyau, reticulum endoplasmique, mitochondrie), et ce contrairement aux membres pro-apoptotiques qui sont plutôt cytoplasmiques. Lors de l'induction de l'apoptose, les membres pro-apoptotiques sont relocalisés notamment au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Les mécanismes aboutissant à la relocalisation de

ces protéines sont plus ou moins bien décrits et plusieurs mécanismes tels que la déphosphorylation, le clivage ou des changements conformationnels semblent entrer en jeu. Ainsi, Bad est initialement séquestré dans le cytoplasme sous une forme phosphorylée par la protéine 14-3-3 (Datta et al., 2000). Lors de l'apoptose, la protéine 14-3-3 se dissocie de Bad qui est alors déphosphorylé (Chiang et al., 2001). Bad est alors relocalisé dans la membrane de la mitochondrie. D'autre part, la caspase 8 clive Bid, aboutissant à la formation d'une forme tronquée de cette protéine nommée tBid. tBid est alors capable de s'insérer dans la membrane de la mitochondrie (Luo et al., 1998). Cependant, le rôle exact des membres de la famille Bcl-2 dans le mécanisme à l'origine de la libération des SIMP n'est pas encore totalement élucidé. Ainsi, la translocation de membres pro-apoptotiques au niveau de la membrane externe mitochondriale induirait soit la formation d'un pore dans la membrane externe mitochondriale soit la modification de canaux existants tel que le PTPC (Permeability Transition Pore Complex).

b) Voie extrinsèque des récepteurs de mort

Différents récepteurs de mort et leur ligand

Les récepteurs de mort sont une sous-famille de protéines transmembranaires appartenant à la famille du récepteur du TNF. Ils sont caractérisés par la présence de 2 à 5 domaines extracellulaires riches en cystéine. Ces récepteurs possèdent également au niveau intracellulaire des motifs nommés « domaines de mort » ou DD (Death Domain) nécessaires à la transduction du signal apoptotique. Jusqu'à présent, 8 récepteurs de mort ont été répertoriés (Figure 12) :

- Fas (ou CD95, Apo1)
- TNF-R1 (ou CD120a, p55TNF-R)
- DR-3 (Death Receptor 3) (ou WSL-1/Apo3/ TRAMP/LARD)
- TRAIL-R1 (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor 1) (ou DR-4)
- TRAIL-R2 (ou DR-5/Apo2/TRICK-2/KILLER)
- DR-6
- EDA-R (syntenic EctoDysplasin A Receptor)
- p75^{NTR} / NGF-R (p75 Nerve Growth Factor Recepteur).

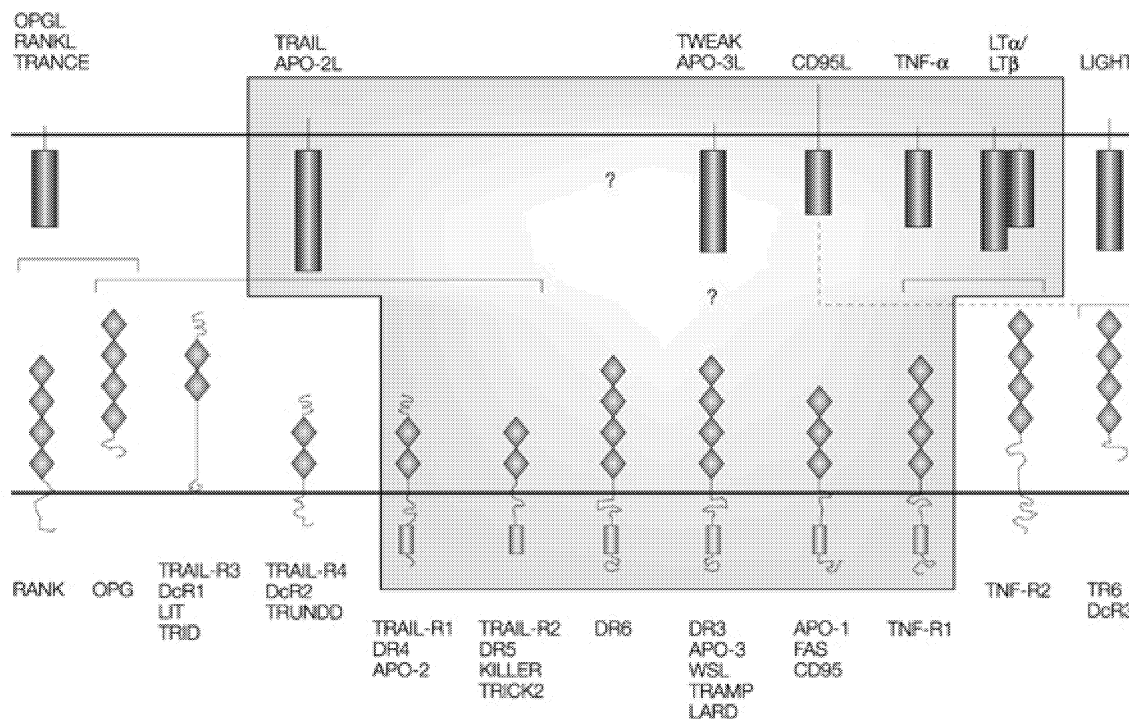


Figure 12 : Membres de la famille du récepteur du TNF et leurs ligands. Les ligands sont représentés en haut, les récepteurs en bas. Récepteurs de mort et leurs ligands sont encadrés. Adapté de Igney and Krammer, 2002.

Voie commune de la signalisation des récepteurs de mort

Initialement, il avait été supposé que les récepteurs de mort étaient activés par la liaison de leur ligand respectif. La liaison des ligands sur les récepteurs induisait alors la trimérisation des récepteurs, entraînant le recrutement au niveau intracellulaire de protéines adaptatrices. Néanmoins, des travaux plus récents démontrent que Fas et TNF-R1 possèdent en fait la propriété de s'associer sous forme de trimères indépendamment de la liaison de leur ligand (Chan et al., 2000 ; Siegel et al., 2000). La zone nécessaire à cette trimérisation est nommée PLAD (PreLigand Assembly Domain) et est située dans la région N-terminale de la partie extracellulaire du récepteur. PLAD est physiquement distinct de la zone de liaison du ligand mais est essentiel pour la liaison du ligand et pour la fonction du récepteur. Actuellement, il est admis que les membres de la famille des récepteurs de mort se présentent sous forme de complexes trimériques indépendamment de la présence du ligand. Ces récepteurs, préalablement trimérisés, sont activés par la liaison de leurs ligands respectifs également sous forme de trimères.

Suite à la liaison du ligand sur l'assemblage trimérique des récepteurs, un changement de conformation induit l'agrégation de protéines adaptatrices au niveau de la partie cytoplasmique du récepteur. Fas, TRAIL-R1 et TRAIL-R2 interagissent avec la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain également nommée MORT1) tandis que TNF-R1 et DR-3 interagissent initialement avec l'adaptateur TRADD (TNF-R Associated Death Domain). TRADD peut alors par la suite lier un certain nombre de protéines dont FADD. Dans un second temps, FADD recrute au niveau de sa partie amino-terminale des pro-caspases. L'ensemble multiprotéique constitué du récepteur de mort, de FADD et des pro-caspases est nommé DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Au niveau du DISC, l'agrégation de deux molécules voire plus de pro-caspases, telles que les pro-caspases 8 et 10, induit leur activation (Figure 13) (Kischkel et al., 1995). Ces caspases en retour clivent et activent un certain nombre de caspases effectrices telles que les caspases 3, 6 et 7 impliquées dans le clivage de substrats et conduisant à l'apoptose.

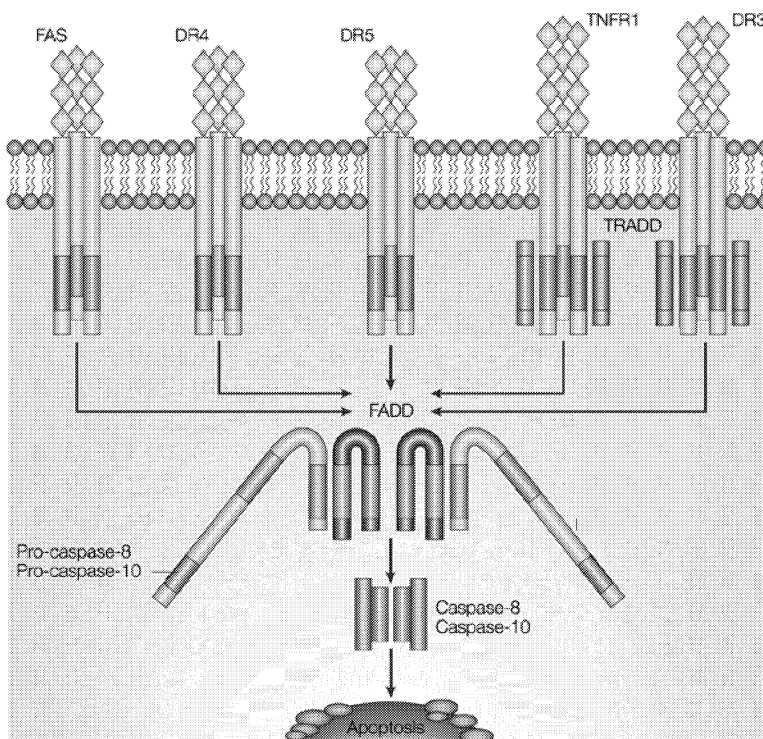


Figure 13 : Transduction du signal par l'intermédiaire des récepteurs de mort. Après la liaison du ligand sur le récepteur, FADD est recruté au niveau cytoplasmique soit directement soit indirectement par l'intermédiaire de TRADD et permet alors l'activation des pro-caspases 8 et/ou 10 en caspases actives. Adapté de Ashkenazi, 2002.

Dans certaines cellules dites de type I, la quantité de caspase 8 active formée au niveau du DISC est suffisante pour initier l'apoptose par clivage direct des pro-caspases 3, 6 et 7, et ce sans implication de la mitochondrie. Dans ce type de cellules, la surexpression de Bcl-2 ou de Bcl-x_L ne peut pas inhiber l'induction de l'apoptose. En effet, bien que ces protéines inhibent le relargage de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie, leur action reste sans effet puisque que l'apoptose induite par les récepteurs de mort dans ce type de cellules est indépendante de la mitochondrie.

Dans d'autres cellules, nommées cellules de type II, le DISC ne se forme pas de façon efficace. La quantité de caspase 8 active est insuffisante pour activer directement la caspase 3 (revue dans Barnhart et al., 2003). La petite quantité de caspase 8 activée au niveau du DISC étant tout de même suffisante pour cliver Bid, la mitochondrie est alors utilisée comme « amplificateur » du signal apoptotique. La forme tronquée de Bid (tBid) est alors transloquée au niveau de la membrane mitochondriale. L'interaction de tBid avec d'autres membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bax et Bak permet le relargage de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie vers le cytoplasme (Scaffidi et al., 1998). Ainsi, dans ce type de cellules, l'apoptose induite par les récepteurs de mort dépend de la mitochondrie (Figure 14) et la surexpression de Bcl-2 et de Bcl-x_L est capable d'inhiber l'induction de l'apoptose.

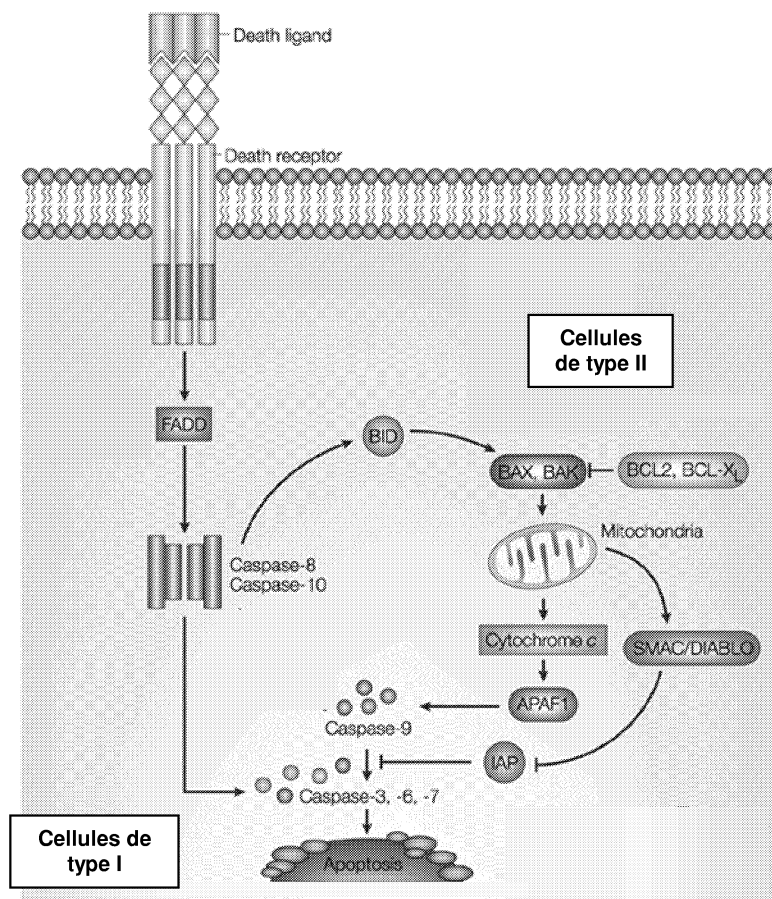


Figure 14 : Description des cellules de type I et II lors de l'induction de l'apoptose par les récepteurs de mort. Les récepteurs de mort peuvent activer la voie mitochondriale suite au clivage d'un membre de la famille Bcl-2 nommé Bid par la caspase 8. Adapté de Ashkenazi, 2002.

Signalisation des différents récepteurs de morts

Par soucis de clarté, nous décrivons préférentiellement les étapes principales menant à l'induction de l'apoptose. Nous évoquerons brièvement les voies NF-Kappa B (Nuclear Factor Kappa B) et JNK (c-Jun N terminal Kinase) qui sont notamment impliquées dans la modulation du processus apoptotique.

Signalisation de TNF-R1

La signalisation principale du TNF-R1 conduisant à la mort par apoptose des cellules se décompose en deux étapes. Initialement, la fixation du TNF sur TNF-R1 induit le recrutement, au niveau cytoplasmique du récepteur, de la protéine adaptatrice TRADD et de

RIP (Receptor Interacting Protein) *via* le motif DD. Ce complexe de signalisation est requis pour la liaison de protéines telles que TRAF-2 (TNF-R-Associated Factor 2) voire la liaison d'inhibiteur de l'apoptose tels que c-IAP1. L'ensemble comprenant le récepteur lui-même, TRADD, RIP, TRAF-2, c-IAP1 et peut être d'autres protéines encore non identifiées est nommé complexe I. Il ne comprend ni FADD ni les pro-caspases 8 et 10.

Le complexe I initialement formé se dissocie du récepteur et se retrouve au niveau du cytosol. Le DD de TRADD et de RIP initialement engagé dans une interaction avec le DD de TNF-R1 est libre d'interagir avec d'autres protéines contenant également un DD. TRADD recrute alors FADD. Bien qu'une interaction entre RIP et FADD ait été également décrite, cette dernière semble moins importante que la liaison de TRADD et de FADD puisqu'une apoptose induite par TNF-R1 est observée dans des cellules Jurkat déficiente en RIP. FADD recrute à son tour les pro-caspases 8 et 10, ces caspases sont activées probablement par auto-clivage du fait de la proximité d'un grand nombre de caspases. Le complexe cytosolique constitué de TRAF2, RIP, TRADD, FADD et des pro-caspases 8 et 10 est nommé complexe II (Micheau and Tschopp, 2003 ; Barnhart and Peter, 2003). Une fois les caspases 8 et 10 activées, l'apoptose est induite (Figure 15).

La formation du complexe I au niveau de TNF-R1 peut également activer les voies NF-Kappa B et JNK. L'activation de la voie NF Kappa B dépend de RIP et de TRAF2 (Devin et al, 2000). NF Kappa B induit la transcription de gènes anti-apoptotiques tels que des inhibiteurs endogènes de l'apoptose (IAP), des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x_L, Bfl-1) et des molécules leurres entrant en compétition avec des molécules participant à la transduction du signal apoptotique (FLIP, TRAIL-R3). Ces dernières protéines seront définies par la suite. Ces données suggèrent que la voie NF Kappa B interviendrait comme une « boucle » retro régulant négativement le processus apoptotique (Chen and Goeddel, 2002). Néanmoins, il existe d'autres gènes cibles de NF-Kappa B dont des gènes pro-apoptotiques tels que Fas, Fas L, TRAIL-R1 et -R2. Ainsi, selon les stimuli et le contexte cellulaire, NF-Kappa B pourrait également agir comme un « amplificateur » de la cascade de caspases. Enfin, il semble que NF Kappa B puisse également réguler négativement la voie JNK. L'activation de la voie JNK dépend de TRAF2. Ainsi, la délétion de TRAF2 induit une incapacité de l'activation de la voie JNK suite à l'activation de TNF-R1. TRAF2 a été reporté comme activant MEKK1 (MAPK/ERK Kinase Kinase 1) et ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1). Ces kinases activent alors JNK qui phosphoryle à son tour c-Jun. Suite à l'activation de TNF-R1, la voie JNK semble plutôt impliquée dans le processus anti-

apoptotique et la réponse inflammatoire. Cependant, certaines données suggèrent que cette voie posséderait également une action pro-apoptotique, ainsi c-Jun augmente la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Fas L (Yang et al., 1997). JNK peut également phosphoryler P53 ou Bcl-2. Cette phosphorylation induit une apoptose P53-dépendante et inhibe l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 (Basu et Kolesnick, 1998).

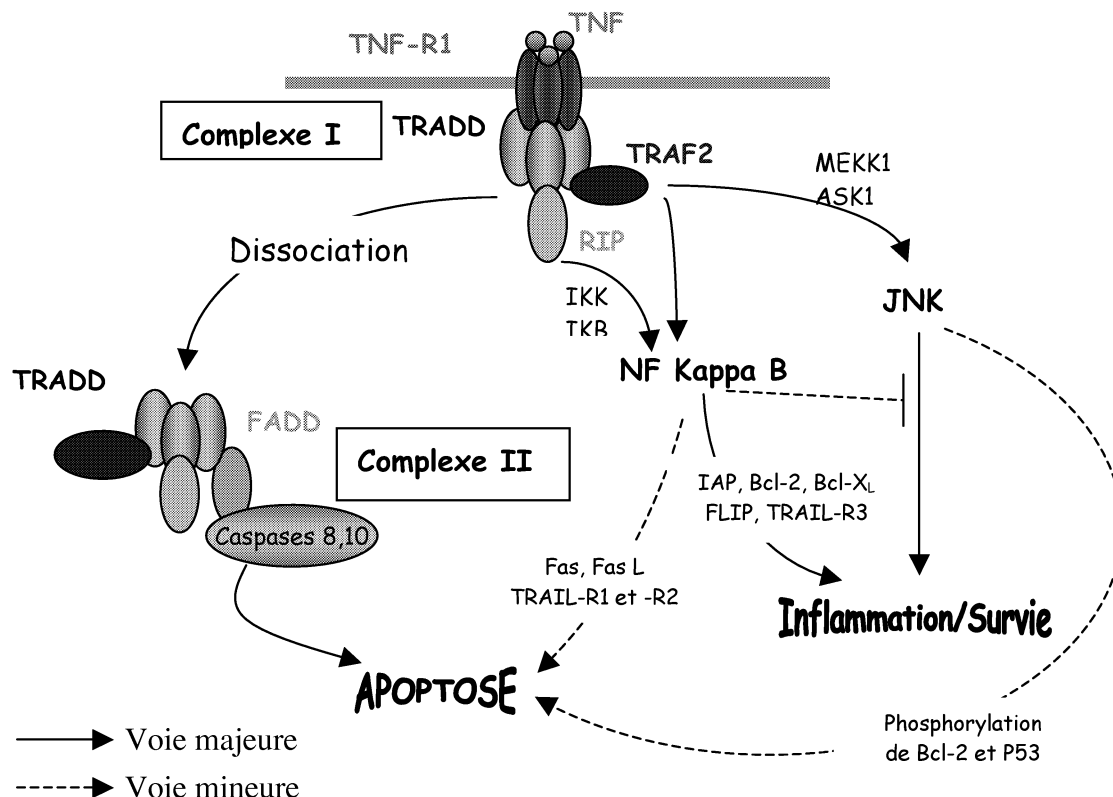


Figure 15 : Voies de transduction du TNF.

Signalisation de Fas

Fas est une protéine membranaire dont le ligand est Fas L. Il existe également une forme soluble de Fas, sFas, issue d'un épissage alternatif. sFas est capable d'entrer en compétition avec Fas et agit donc en tant que dominant négatif. Le fait qu'une augmentation de sFas soit observée dans plusieurs cancers (cancer du sein, lymphomes et leucémies), et soit associée à un faible pronostic, suggère que les cellules cancéreuses elles-mêmes surexprimeraient sFas dans le but de se protéger de l'apoptose induite par Fas (Takayuki et al., 1999). Fas L est une protéine de surface ancrée dans la membrane plasmique de la cellule. Il existe également des formes solubles de Fas L, qui bien que se liant à Fas, présentent une activité apoptotique plus faible (Schneider et al., 1998). Fas est exprimé dans de nombreux types cellulaires (lymphocytes activés, macrophages, thymus, foie, rate, poumon, cœur,

intestin, cerveau, testicules et ovaires) et son expression peut être augmentée par diverses cytokines telles que l'interferon-gamma, et le TNF-alpha. En revanche, l'expression de Fas L est plus étroitement contrôlée et souvent induite dans des conditions spécifiques. L'expression de Fas L est retrouvée dans des cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, cellules Natural Killer) et des cellules non-immunitaires (testicule, rein, intestin et oeil).

La liaison de Fas L sur son récepteur Fas induit la formation d'un DISC constitué du récepteur lui-même, de l'adaptateur FADD et des pro-caspases 8 et 10 conduisant à l'induction de l'apoptose. Néanmoins, Fas peut induire l'apoptose indépendamment de sa liaison avec FADD en fixant d'autres protéines telles que Daxx (Fas death-domain associated protein) et RIP (Figure 16). Daxx est capable de se lier au DD de Fas et recrute ASK1. ASK1 active une MAP-kinase-kinase qui phosphoryle JNK (Chang et al., 1998). Daxx, bien qu'initialement identifiée comme une molécule se liant au DD de Fas, a été découverte par la suite comme une protéine nucléaire capable d'interagir au sein de complexes multiprotéiques et d'inhiber la transcription. De manière intéressante, la présence de Daxx dans ces complexes semble être un pré-requis à l'apoptose induite par Fas (Zhong et al., 2000). RIP peut également se lier au DD de Fas et recruter la protéine adaptatrice RAIDD (RIP Associated ICH1/CED3 homologous protein with a Death Domain). RAIDD à son tour recrute la pro-caspase 2 par interaction au niveau de domaine CARD. Le clivage et l'activation de la caspase 2 contribue alors à l'activation de la voie apoptotique passant par Fas (Droin et al., 2001). Cependant, les expériences d'inactivation génique suggèrent que les protéines Daxx et RIP ne jouent pas un rôle central dans l'apoptose induite par Fas L, et ce contrairement à FADD (Villunger et al., 2000).

De même que pour TNF-R1, la liaison de Fas L sur Fas induit l'activation de la voie NF-Kappa B (Marusawa et al., 2001 ; Russo et al., 2002). Dans ce cadre, NF-Kappa B jouerait un rôle plutôt anti-apoptotique. La voie JNK est quant à elle a plutôt été étudié dans le cadre de son activité pro-apoptotique, elle serait activée *via* Daxx et/ou *via* l'activation de MEKK1 par la caspase 3 (Deak et al., 1998). Néanmoins, l'implication exacte de ces voies dans le processus apoptotique reste complexe et ne sera pas détaillée dans ce manuscrit.

Fas est capable d'activer également la sphingomyélinase acide (aSMase) et la sphingomyélinase neutre (nSMase) (Malisan et Testi, 1999), ce qui induit alors la synthèse de céramides. L'implication des céramides dans l'apoptose induite par Fas est encore sujet à controverse. Ainsi, les céramides ont été décrits comme activant la voie mitochondriale en provoquant le relargage d'AIF et du cytochrome c (de Maria et al., 1997). Ils peuvent également se comporter comme un second messager activant la kinase Raf, des protéines phosphatases spécifiques de sérines et thréonines, et la cathepsine D (Pettus et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que l'activation initiale d'un petit nombre de récepteurs Fas par Fas L est insuffisante pour induire l'apoptose mais suffisante pour induire l'activation de la aSMase au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Localisée au sein de zones riches en sphingolipides et en cholestérol nommées radeaux, la aSMase induirait la production de céramides permettant de former des structures dans lesquelles s'agrègerait un plus grand nombre de récepteurs Fas ce qui favoriserait l'apoptose (Grassmé et al., 2001a et b).

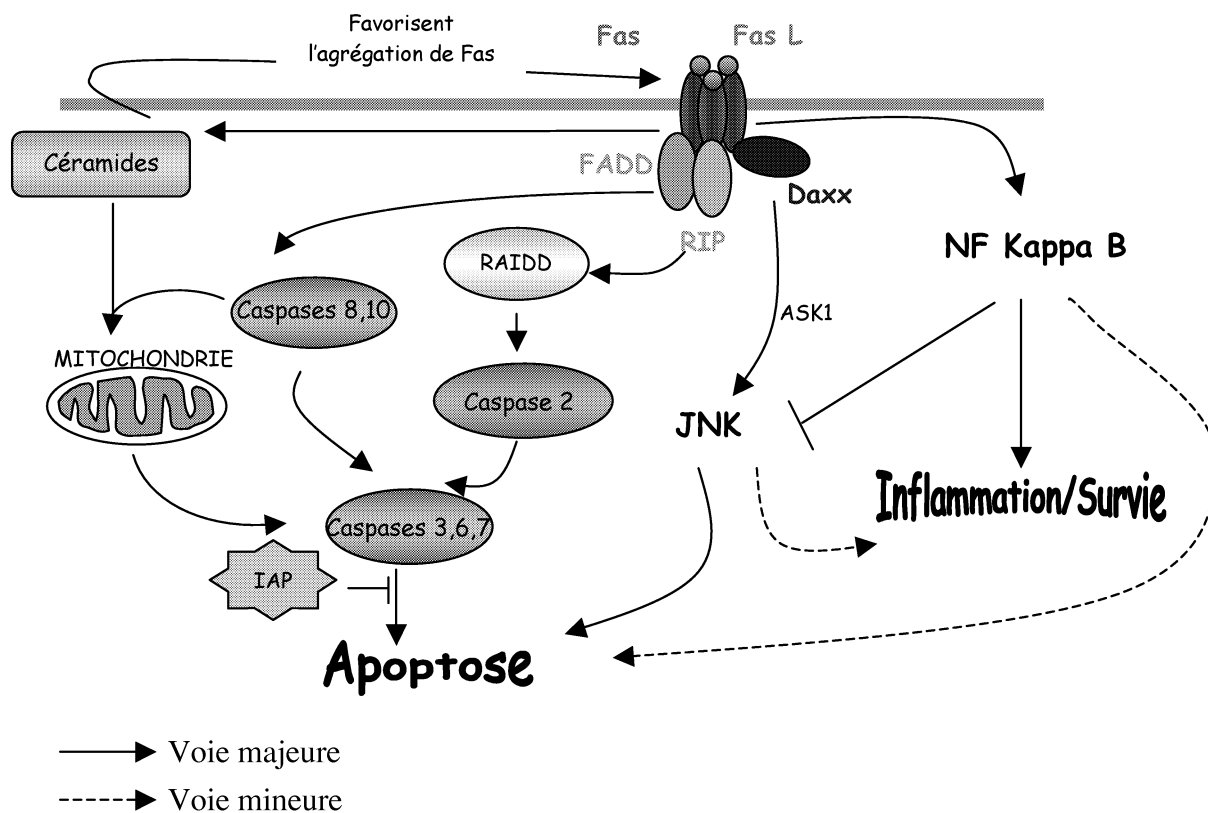


Figure 16 : Voies de transduction de Fas

Signalisation de TRAIL-R

TRAIL-R1 et -R2 sont des récepteurs qui possèdent également un domaine de mort intracytoplasmique très similaire à celui de TNF-R1 et permettant la transduction du signal apoptotique. Le ligand de ces récepteurs est TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) (MacFarlane, 2003). Ce ligand présente deux caractéristiques essentielles : d'une part TRAIL est capable d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses et transformées mais pas dans les cellules normales, d'autre part l'ARNm de TRAIL est exprimé de manière constitutive dans un grand nombre de tissus (Wiley et al., 1995), et ce contrairement aux autres membres de la famille du TNF qui sont exprimés de façon très contrôlée et de manière transitoire dans les cellules activées. TRAIL étant exprimé dans de nombreux tissus, ses récepteurs présentent bien évidemment une expression plus contrôlée dépendant de conditions physiologiques particulières.

De même que pour les autres membres de la famille du récepteur du TNF, la fixation de TRAIL sur TRAIL-R1 ou -R2 induit la formation du DISC comprenant l'adaptateur FADD et les caspases 8 et 10 (Kischkel et al., 2000) La présence de l'adaptateur TRADD a été également reportée (Schneider et al., 1997), TRADD recrutant TRAF2 et/ou RIP, ces données contribuent à expliquer l'activation des voies NF Kappa B et JNK observée lors de la fixation de TRAIL sur ses récepteurs (Hu et al., 1999). Plus récemment, l'apoptose induite par TRAIL a été démontrée résultant de l'activation de la voie JNK de manière dépendante des caspases (MacFarlane et al., 2000).

Inhibition des voies de signalisation des récepteurs de mort

La signalisation des récepteurs de mort peut être inhibée à plusieurs niveaux : soit au niveau des récepteurs par la présence de récepteurs de leurre, soit au niveau du recrutement des pro-caspases 8 et 10 par la substitution de FADD. Nous ne citerons pas dans ce chapitre les inhibiteurs endogènes de caspases IAP déjà évoqués précédemment.

En effet, il existe des membres de la famille du récepteur au TNF qui ne présentent pas au niveau cytoplasmique de DD. Ces récepteurs nommés également « decoy receptors » sont incapables de transduire un signal et agissent en tant que « récepteurs de leurre » en entrant en compétition avec les récepteurs de mort. Cinq récepteurs de leurre ont été décrits à ce jour :

- l'OPG (osteoprotegerine). Il s'agit d'un récepteur soluble dont le ligand principal est RANKL, une cytokine jouant un rôle au niveau immunitaire. Néanmoins, OPG peut également lier avec une affinité plus faible TRAIL.

- TRAIL-R3 (DcR1) et TRAIL-R4 (DcR2). Ces récepteurs lient tous deux TRAIL. TRAIL-R3 est attaché à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un motif glycoposphatidylinositol tandis que TRAIL-R4 est une protéine transmembranaire présentant un DD tronqué inactif dans le cytoplasme.

- DcR3 et sFas. DcR3 est une protéine soluble se liant à Fas L ainsi qu'à d'autres ligands tels que LIGHT et TL1A. LIGHT et TL1A sont des cytokines appartenant également à la superfamille du TNF et régulant des aspects spécifiques de l'immunité. sFas est la forme soluble du récepteur Fas et ne se lie qu'à Fas.

Par ailleurs, plusieurs régulateurs peuvent intervenir au niveau de la formation du DISC, les plus connus sont les FLIP (FADD-like ICE inhibitory proteins) (Krueger et al., 2001). Le gène c-FLIP également nommé FLAME-1, I-FLICE, Casper, CASH, RIT, CLARP et usurpine donne naissance à de multiples variants issus de l'épissage alternatif. Cependant, seuls 2 variants désignés sous le nom de c-FLIP_L et c-FLIP_S sont détectables au niveau protéique. Ces protéines sont en fait des analogues de la caspase 8 (Figure 17). c-FLIP_L contient des DED en tandem et un domaine homologue à celui de la pro-caspase 8. Toutefois il ne possède pas les acides aminés responsables de l'activité protéolytique des caspases dont la cystéine présente au niveau du site catalytique. c-FLIP_S ressemble à l'homologue viral de c-FLIP nommé v-FLIP et présente 2 DED (Death Effector Domain) ainsi qu'une courte extrémité carboxylique différente de c-FLIP_L.

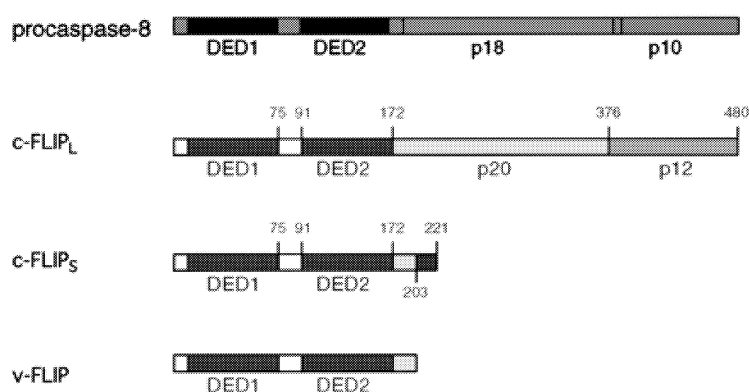


Figure 17 : Similarités structurales entre la pro-caspase 8 et FLIP. Adapté de Krueger (Krueger et al., 2001).

Les protéines c-FLIP_L et c-FLIP_S peuvent être recrutées au niveau du DISC lors de l'activation des récepteurs de mort. Ces protéines agissent alors en tant qu'inhibiteurs compétitifs empêchant la fixation de la pro-caspase 8 au niveau du DISC donc prévenant l'activation de cette caspase. En présence de c-FLIP_S, le recrutement et le clivage de la caspase 8 sont totalement inhibés. En présence de c-FLIP_L, la situation est plus complexe. Ainsi, l'induction ectopique de grandes quantités de c-FLIP_L a été démontrée comme inhibant le processus apoptotique. A l'inverse, les travaux de Chang prouvent que l'expression ectopique de quantités physiologiques de c-FLIP_L induit l'apoptose à travers l'activation de la caspase 8 (Chang et al., 2002). Ainsi, de grandes quantités de c-FLIP_L (dépourvu d'activité catalytique) satureraient le DISC en empêchant le recrutement de la pro-caspase 8. Au contraire, de petites quantités de c-FLIP_L permettraient toujours le recrutement et le clivage de la caspase 8 au niveau du DISC. Ces résultats suggèrent notamment que l'étape initiale du clivage de la caspase 8 résulte d'un procédé auto-catalytique (Figure 18).

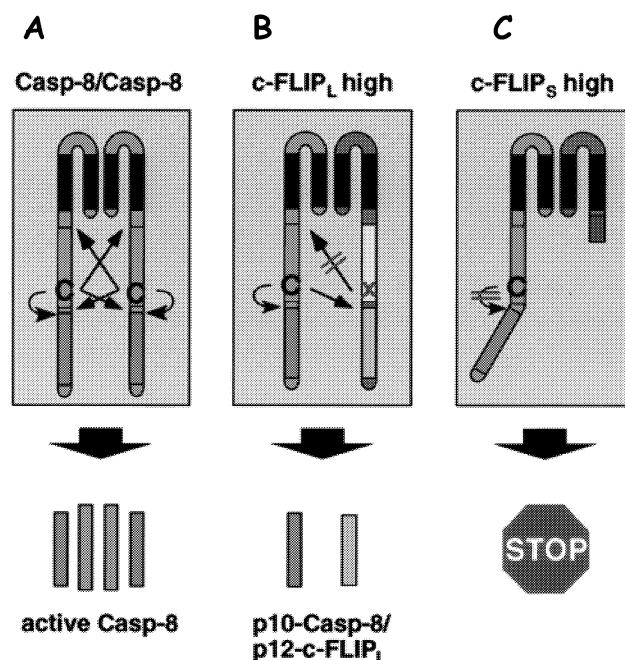


Figure 18: Modélisation de l'inhibition de l'apoptose par FLIP au niveau du DISC. Suivant le ratio de pro-caspase 8 et de protéines c-FLIP au niveau du DISC, plusieurs produits peuvent être formés suite à l'activation du récepteur. **A**, de petites quantités de c-FLIP permettent le clivage normal et donc l'activation de la caspase 8. **B**, en présence de quantités élevées de c-FLIP_L, la pro-caspase 8 peut tout de même être recrutée au niveau du DISC mais son clivage est incorrect et ne génère pas de caspase 8 active. **C**, en présence de quantités élevées de c-FLIP_S la pro-caspase 8 est recrutée mais ne peut être clivée. Adapté de Krueger (Krueger et al., 2001).

II.C Défauts d'apoptose et implication dans le développement tumoral

Le développement tumoral est lié entre autres à une diminution de l'apoptose induite par des mécanismes interférant à différents niveaux de la signalisation apoptotique. Cette diminution résulte de l'expression de gènes anti-apoptotiques, de l'inactivation de gènes pro-apoptotiques, d'altérations de P53 voire d'activation constitutive des signaux de survie.

Un des exemples les plus connus de l'expression de gènes anti-apoptotiques est trouvé dans les lymphomes folliculaires de type B où la translocation chromosomique t(14;18) couple le gène de bcl-2 au locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines, ce qui induit une surexpression de Bcl-2 (Tsujimoto et al., 1985). D'autre part, certains mélanomes humains et lymphomes de type B murins présentent des niveaux élevés d'expression de FLIP (Krueger et al., 2001 ; Mueller and Scott, 2000). La surexpression de récepteurs de leurres tels que DcR3 est observée dans des adénocarcinomes, des gliomes et des glioblastomes (Roth et al., 2001). L'expression de membres de la famille des IAP contribue également au développement d'un phénotype tumoral. Par exemple, la survivine est trouvée dans la plupart des tumeurs humaines et non dans les tissus adultes normaux (Ambrosini et al., 1997) ; et cIAP2 présente une translocation t(11;18) (q21;q21) observée dans 50 % des lymphomes de type MALT (Mucosa-Associated Lymphoid Tissu) (Dierlamm et al., 1999). Par ailleurs, le développement tumoral peut être également dû à l'inactivation de gènes pro-apoptotiques. Ainsi, Bax, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, est muté dans certains types de cancer. De plus, son expression réduite est associée à une faible efficacité du traitement chimiothérapeutique ainsi qu'à une faible survie (Krajewski et al., 1995). Dans le cas des mélanomes malins, l'absence d'expression d'Apaf-1 est responsable d'un défaut d'apoptose (Soengas et al., 2001). Une méthylation de la caspase 8 associée à la perte d'expression de ce gène a été également décrite dans certains cancers de l'enfant (Harada et al., 2002). Par ailleurs, les récepteurs de mort sont sous-exprimés voire inactivés dans de nombreuses tumeurs. C'est le cas de Fas qui est inactivé dans certaines leucémies et des carcinomes du colon et du foie (Butler et al., 1998 ; Muschen et al., 2002). De même, TRAIL-R1 et-R2 sont sous-exprimés dans des cancers de la peau (Bachmann et al., 2001).

D'autres mécanismes peuvent être aussi à l'origine de l'échappement tumoral. Un des éléments clefs dans l'apoptose est la protéine P53 (Ryan et al., 2001). La rapide induction des fonctions de P53 suite au stress est due à des mécanismes post-traductionnels. P53 peut être

stabilisée et activée grâce à l'inactivation de son inhibiteur MDM2 par ARF ou par phosphorylation directe de MDM2. De plus, l'activité transcriptionnelle de P53 est augmentée en réponse au stress par de nombreuses modifications telles que la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation. Cette activité transcriptionnelle joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose. En effet, P53 peut induire l'expression de membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bax, Noxa, Puma et donc activer la voie mitochondriale de l'apoptose. P53 induit également l'expression de Fas, TRAIL-R1 et -R2 et, par la même, active la voie des récepteurs de mort. Enfin, certains des effets pro-apoptotiques de P53 sont indépendants de son activité transcriptionnelle. Il s'agit d'interactions protéines-protéines, d'effets directs sur la mitochondrie ou de la relocalisation de récepteurs de mort à la surface de la cellule (Caelles et al., 1994 ; Soengas et al., 1999 ; Bennett et al., 1998). P53 jouant un rôle important dans l'apoptose, l'inactivation de ce gène par mutations directes ou par dérégulation de protéines régulatrices de P53 inhibe le processus apoptotique dans les tumeurs. P53 est mutée dans de nombreuses tumeurs (Lowe et al., 1994). Dans le cas des cancers du sein, près de 30 à 50% des tumeurs primaires présentent des mutations de p53 (Ziyaie et al., 2000). De plus, les cancers du sein exprimant normalement P53 présentent souvent des altérations de l'expression des protéines ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of P53), ces protéines interagissent avec P53 et augmentent ses capacités de liaison à l'ADN et de transactivation des gènes pro-apoptotiques (Samuels-Lev et al., 2001 ; Slee and Lu, 2003). Il est à noter que même si P53 est intacte, souvent des gènes cibles de ce facteur de transcription sont alors mutés rendant inactive la voie de transduction du signal apoptotique.

Enfin, il existe au sein de la cellule des voies de survie telles que la voie de la PI-3K (Phosphatidyl Inositol-3 Kinase). L'activation de cette voie permet d'interférer avec la machinerie apoptotique, soit par phosphorylation et donc inhibition de la protéine Bad (Datta et al., 1997), soit par modulation de la transcription de gènes pro-apoptotiques sous contrôle de NF Kappa B (Hatano and Brenner, 2001). La plupart des tumeurs présentent des altérations de cette voie aboutissant à une activation constitutive des signaux de survie et donc augmentant la résistance des tumeurs face à un stimulus apoptotique (Paez and Sellers, 2003). Ainsi, des oncogènes tels que ras et bcr-abl peuvent augmenter l'activité de la PI-3K, de plus la sous-unité catalytique de la PI-3K est amplifiée dans des cancers des ovaires. Par ailleurs, PTEN, une phosphatase inhibant l'activité de la PI-3K, est mutée dans plusieurs types de cancers et fréquemment délétée dans les tumeurs les plus avancées (Simpson and Parsons, 2001).

III Traitements actuels et développement de nouvelles stratégies contre le cancer du sein

III Traitements actuels et développement de nouvelles stratégies contre le cancer du sein

III.A Traitements actuels

Le cancer du sein est considéré comme une maladie hétérogène à la fois locale et générale. En raison de la présence fréquente de micro-métastases dès le stade de tumeur localisée et de l'impossibilité de guérir le cancer du sein au stade de dissémination métastatique, le traitement doit avoir pour but :

- le contrôle loco-régional de la pathologie (chirurgie et radiothérapie)
- la prévention ou le traitement des métastases (chimiothérapie, hormonothérapie, traitements biologiques)

III.A.1 Traitement loco-régional

a) Chirurgie

Le traitement chirurgical est le plus ancien traitement utilisé pour lutter contre le cancer. Il a trois objectifs : (1) la confirmation du diagnostic avec un examen histologique de la pièce de tumorectomie, (2) le recueil des principaux éléments du pronostic, (3) le traitement loco-régional proprement dit. Dans le passé, la mammectomie radicale (comprenant le sein, le muscle environnant et les chaînes ganglionnaires) était le seul traitement possible. Actuellement, peu de patients subissent une mammectomie radicale et d'autres alternatives chirurgicales moins agressives sont disponibles. Il s'agit d'actes chirurgicaux concernant le sein (mammectomie simple) ou une partie du sein (chirurgie limitée) associés si nécessaire à un curage ganglionnaire axillaire homolatéral.

b) Radiothérapie

La chirurgie est associée à une irradiation externe de 5 à 6 semaines utilisant des photons de haute énergie. Cette irradiation inclut la totalité de la glande mammaire et/ou la paroi thoracique ainsi que les aires ganglionnaires. Dans le cas d'un traitement conservateur,

le « lit tumoral » est susceptible de recevoir un complément soit par radiothérapie externe localisée, soit par l'implantation locale de fils d'iridium (curiethérapie).

III.A.2 Traitement général

Le rôle du traitement général est d'éradiquer la maladie micro-métastatique infraclinique potentiellement présente au moment du diagnostic. Ce traitement, nommé également traitement adjuvant, est appliqué après l'acte chirurgical chez des patients sélectionnés comme étant à risque métastatique (facteurs pronostiques). Il est quelquefois appliqué avant la chirurgie afin de réduire la taille de la tumeur, le traitement est alors qualifié de néo-adjuvant. L'utilisation de ce traitement est controversé chez les femmes présentant des stades précoces sans atteinte ganglionnaire de cancer du sein, la sévérité des effets secondaires pouvant en effet surpasser les effets bénéfiques pour ces patients dont les cancers ne paraissent pas agressifs. L'explosion des connaissances en matière de biologie de la cellule cancéreuse se traduit par l'introduction en clinique de thérapies moléculaires plus ciblées exerçant à la fois une activité anti-tumorale propre et une synergie d'action avec les traitements hormonaux ou cytotoxiques. Le traitement médical repose actuellement sur 3 approches différentes pouvant se combiner entre elles : l'hormonothérapie et la chimiothérapie, utilisées depuis un quart de siècle, et les traitements biologiques plus récents et amenés à prendre un essor plus important.

a) Hormonothérapie

Les oestrogènes stimulent la prolifération, favorisant l'expansion du tissu tumoral (60 % des cancers du sein expriment les récepteurs aux oestrogènes) (Lucchi-Angellier, 2001). Les anti-oestrogènes sont utilisés soit chez les femmes ménopausées soit chez les femmes non-ménopausées ; dans ce dernier cas ils sont associés à une castration chimique (analogues de la LH-RH), chirurgicale (ovariectomie) ou radiothérapique (irradiation des ovaires). Actuellement trois types de drogues présentent des effets anti-oestrogéniques : des antagonistes d'oestrogènes, des inhibiteurs de la synthèse des oestrogènes et des inhibiteurs d'aromatase.

- ***Les antagonistes d'oestrogènes.*** Ces molécules se fixent aux récepteurs des oestrogènes et provoquent une inhibition compétitive de la liaison de l'oestradiol sur son récepteur bloquant ainsi l'action des oestrogènes. Le plus utilisé est le Tamoxifène, cependant

le Tamoxifène a des effets variables selon la dose utilisée et l'organe considéré. C'est un anti-oestrogène mixte présentant un effet antagoniste pour les tissus mammaires et osseux (risque d'inhibition de la résorption osseuse post-ménopausique) et un effet agoniste sur la muqueuse endométriale (risque accru de cancers de l'endomètre). Ces graves effets secondaires ont amené au développement de nouveaux anti-oestrogènes mixtes dont le Toremifène (commercialisé en France en 2000), ou purs dont le RU 58668, l'EM 800 et le Fulvestrant. Ces molécules ne présentent pas d'effets agonistes et sont en cours d'évaluation clinique, le Fulvestrant présente notamment une affinité pour le récepteur des oestrogènes 100 fois supérieure à celle du Tamoxifène.

- **Les inhibiteurs de la synthèse des oestrogènes.** Ces molécules suppriment la synthèse d'oestrogènes dans les ovaires de femmes non-ménopausées en inhibant la LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) au niveau de l'hypothalamus. La LH-RH stimule la glande pituitaire à fabriquer et relarguer la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicule Stimulating Hormone), qui toutes deux induisent la production d'oestrogènes. Les drogues telles que la Leuprolide (Lupron) ou la Gosereline (Zoladex) possèdent une structure chimique similaire à la LH-RH. Elles induisent le système endocrine à agir comme s'il y avait assez de LH-RH et à en inhiber la synthèse.

- **Les inhibiteurs d'aromatase.** L'aromatase est une enzyme contribuant à la formation de petites quantités d'oestrogènes dans différents tissus incluant le tissu tumoral. Chez la femme ménopausée les oestrogènes proviennent principalement de la conversion des androgènes *via* l'aromatase. Les inhibiteurs d'aromatase stéroïdiens (Formestane, Exemestane) sont utilisés chez la femme ménopausée. Les inhibiteurs d'aromatase non stéroïdiens (Letrozole, Anastrozole, Vorozole) sont actuellement en étude pré-clinique.

b) Chimiothérapie

La chimiothérapie vise à diminuer la fréquence des métastases chez les femmes ayant des facteurs pronostics défavorables. Elle est utilisée en thérapie adjuvante après le traitement loco-régional à la fois chez les femmes préménopausées et postménopausées. La chimiothérapie peut être également utilisée en thérapie néo-adjuvante afin d'obtenir une réduction tumorale et d'effectuer éventuellement un traitement conservateur. Les agents anticancéreux les plus utilisés dans le cadre du cancer du sein sont les intercalants avec les anthracyclines (doxorubicine), les alkylants (cyclophosphamide), les anti-métabolites (méthotrexate, 5-fluoro-uracile), et surtout les « poisons du fuseau » dont les taxanes

(paclitaxel, docétaxel). Ces agents apparaissent plus efficaces lorsqu'ils sont utilisés en première ligne de traitement plutôt qu'en complément d'un protocole traditionnel déjà effectué. Néanmoins, ils induisent de graves effets secondaires et ne peuvent être appliqués que dans les cas de cancers du sein déjà avancés, là où le bénéfice du traitement surpasse les risques dus aux effets secondaires.

c) « Agents biologiques »

L'amélioration de nos connaissances de la biologie de la cellule cancéreuse a permis de mettre en évidence des nouvelles protéines qui deviennent autant de cibles potentielles permettant de ralentir voire d'inhiber la croissance tumorale. Le chef de file de ces nouveaux agents est l'Herceptine (Trastuzumab). Commercialisé en 2000 en Europe, cet agent cible le récepteur ErbB2. Ce récepteur appartient à la famille des récepteurs de facteurs de croissance de l'EGF à activité tyrosine kinase et induit, en se dimérisant, une cascade de phosphorylation impliquant des protéines telles que Ras et Raf. ErbB2 est surexprimé par amplification génique dans 25 à 30 % des cancers du sein et il a été identifié comme facteur de mauvais pronostic. Les tumeurs présentant une surexpression du gène (méthode de FISH) ou de la protéine (Immunohistochimie) sont susceptibles de répondre à l'herceptine. L'herceptine est en fait un anticorps monoclonal murin humanisé à 95 % présentant une très grande affinité pour le domaine extracellulaire du récepteur ErbB2. Ce traitement, dont le rapport bénéfice/risque demande à être défini avec soin compte tenu de la cardiotoxicité potentielle de l'herceptine, est administré après des thérapies adjuvantes classiques et éventuellement en parallèle avec une hormonothérapie. Toutefois, il est à noter que 60 % des femmes recevant l'herceptine en première ligne de traitement métastatique ne répondent pas *de novo* à ce traitement ciblé. De plus, parmi celles qui bénéficient d'une réponse positive à ce traitement, une résistance à l'herceptine s'installe souvent au bout de 9 à 10 mois. Ainsi, les mécanismes de résistance à l'herceptine font actuellement l'objet d'études très actives. D'autres thérapies moléculaires ciblées (anticorps ou petites molécules) dirigées contre le récepteur ErbB1 (récepteur de l'EGF) sont actuellement testées dans des études cliniques de phase I et II. C'est le cas du Cetuximab et de l'Iressa.

III.B Développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à induire spécifiquement l'apoptose des cellules cancéreuses

Ces dernières années, la découverte et la compréhension des mécanismes de l'induction de l'apoptose et de la résistance tumorale face aux différents traitements nous permet d'espérer développer de nouvelles stratégies dans la lutte contre le cancer. Les challenges actuels consistent à transposer ces connaissances dans des applications cliniques directes. La sensibilisation des tumeurs à l'apoptose peut être envisagée soit par inhibition de gènes anti-apoptotiques soit par induction ou introduction de gènes pro-apoptotiques.

III.B.1 Modulation de gènes anti- ou pro-apoptotiques

a) Inhibition de gènes anti-apoptotiques

Une des stratégies envisagées pour induire l'apoptose a été d'utiliser des oligonucléotides antisens bcl-2 ou bcl-X_L. L'application d'oligonucléotides antisens de bcl-2 dans des souris porteuses de tumeurs réduit de manière importante la croissance tumorale (Jansen et al., 1998 et 2000), et des études cliniques sont actuellement menées (Waters et al., 2000). Par ailleurs, la double inhibition spécifique de bcl-2 et de bcl-X_L dans des cellules cancéreuses de colon augmente notablement l'apoptose induite par des drogues anti-cancéreuses (Zangermeister-Wittke et al., 2000). Le ciblage de la protéine IAP survivine a également permis la restauration de l'apoptose spontanée des cellules cancéreuses de sein, de poumon et de colon *in vitro*. De plus, l'utilisation d'un adénovirus mutant de survivine augmente l'action de drogues telles que le paclitaxel et la doxorubicine sur des xénogreffes de cellules cancéreuses de sein *in vivo* (Mesri et al., 2001).

b) Activation de gènes pro-apoptotiques

L'introduction du gène bax dans des cellules cancéreuses ovariennes et gastriques *in vitro* et *in vivo*, ou celle de bcl-X_S dans des cellules cancéreuses de sein *in vitro* a permis de sensibiliser ces cellules à l'action d'agents anti-cancéreux et ce par induction de l'apoptose. D'autres exemples tels que l'introduction de la caspase 3 dans des cellules cancéreuses de sein MCF-7 permet de restaurer une voie de l'apoptose dépendante de la caspase 3. Il est à

noter que les cellules MCF-7 ne possèdent pas de caspase 3, néanmoins ces cellules sont sensibles à l'apoptose induite par des agents anti-cancéreux notamment par l'intermédiaire des caspases 6 et 7. L'utilisation d'un adénovirus porteur d'un gène p53 a également permis d'induire l'apoptose et d'inhiber la croissance tumorale dans des souris nude (Asgari et al., 1997).

III.B.2 Utilisation de ligands des récepteurs de mort

L'activation des récepteurs de mort induit la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Par conséquent, les ligands des récepteurs de mort tels que TNF, Fas L et TRAIL sont les candidats potentiels de thérapies anti-cancéreuses (French and Tschopp, 2003 ; Ashkenazi, 2002). Le TNF présente une forte activité anti-tumorale *in vitro* et a été initialement considéré comme un agent anti-cancéreux largement applicable dans l'organisme. Cependant, l'application systémique de TNF chez l'homme a été compromise par l'apparition de graves effets secondaires allant de symptômes d'influenza au développement d'états de chocs mettant en danger la vie des patients (Mannel and Echtenacher, 2000). Les travaux se sont donc reportés sur Fas L et TRAIL, bien que les effets de Fas L apparaissent beaucoup moins sélectifs des cellules cancéreuses que TRAIL.

a) Fas L

En 1989, Trauth *et al.* démontraient pour la première fois que l'utilisation d'un anticorps monoclonal agoniste de Fas mimant donc l'action de Fas L était applicable dans le cadre d'une thérapie anti-cancéreuse. Ainsi, l'injection intra-veineuse d'un anticorps anti-Fas humain dans des souris nude présentant une transplantation d'un lymphome B humain induit rapidement la régression de la tumeur. Cependant, une telle approche réalisée dans des souris avec un anticorps anti-Fas murin provoque une mort rapide des souris 6 h après l'injection (Ogasawara et al., 1993). Ceci est le résultat de l'induction de l'apoptose dans les tissus normaux présentant le récepteur Fas et particulièrement dans le foie. Ces résultats rendent actuellement impossible l'utilisation systémique d'anticorps anti-Fas ou de molécules recombinantes Fas L et des recherches plus prometteuses s'orientent sur des mesures permettant un ciblage plus spécifique de la tumeur. Dans ce cadre, l'injection locale de Fas par voie intra-péritonéale induit l'apoptose de cellules de lymphome murin implantées dans la cavité péritonéale des souris sans présenter de toxicité systémique (Rensing-Ehla et al., 1995).

b) TRAIL

L'utilisation d'une forme recombinante soluble de TRAIL sur des souris immunodéficientes portant diverses tumeurs telles que des myélomes, des gliomes, des tumeurs de sein et de colon inhibe le développement tumoral en induisant l'apoptose (Pollack et al., 2001 ; Mitsiades et al., 2001 ; Ashkenazi et al., 1999). De plus, l'utilisation combinée de TRAIL et de drogues anti-cancéreuses ou de radiations diminue de façon drastique la taille des tumeurs dans des modèles murins. Enfin, des anticorps monoclonaux dirigés contre TRAIL-R1 et -R2, les récepteurs de mort de TRAIL, ont prouvé leur efficacité en inhibant la croissance tumorale *in vivo* (Chuntharapai et al., 2001 ; Ichikawa et al., 2001). De manière intéressante, les travaux effectués *in vivo* utilisant l'anticorps anti-TRAIL-R2 ont montré une activité anti-tumorale élevée sans toxicité hépatique, ce qui confirme l'intérêt de cette approche thérapeutique.

En dépit de tous les efforts menés, avant qu'une thérapie restaurant une sensibilité normale à l'apoptose dans les cellules cancéreuses puisse être développée, plusieurs problèmes doivent être résolus. Un des principes de la cancérologie est que la tumeur est issue initialement d'une seule cellule qui évolue de façon clonale. Néanmoins, les tumeurs macroscopiques sont hétérogènes et les différentes cellules qui les composent possèdent par conséquent différents mécanismes de résistance face à l'apoptose. Par ailleurs, de multiples mécanismes de résistance peuvent également se développer au sein d'une seule cellule tumorale. Ainsi, un traitement combiné de plusieurs stratégies thérapeutiques semble être actuellement la meilleure alternative pour lutter contre ces phénomènes de résistance. TRAIL paraît tout particulièrement intéressant puisqu'il semble moduler la sensibilité des cellules tumorales sans affecter celle des cellules normales. Enfin, notre connaissance accrue des effets anti-tumoraux des drogues au niveau moléculaire suggère la possibilité d'une individualisation des chimiothérapies qui sera alors fonction des particularités présentes chez le patient.

III.C Les inhibiteurs de HDAC : agents anti-cancéreux potentiels

III.C.1 Rôle des inhibiteurs d'histone déacétylases

a) Histone acétyltransférases et histone déacétylases

Dans les cellules eucaryotes, le génome est empaqueté dans une configuration hautement compacte et organisée qui est la chromatine. De manière à permettre la transcription des gènes, cette chromatine doit être remodelée pour rendre l'ADN accessible à l'action des facteurs de transcription. La chromatine est composée de la double hélice d'ADN qui interagit de manière électrostatique avec des protéines dites histones (protéines basiques contenant de multiples résidus de lysine et d'arginine). L'unité structurale fondamentale constituant la chromatine est le nucléosome, il sert de base à la compaction de la chromatine ce qui permet de réguler l'accessibilité et donc la transcription des gènes. Un nucléosome est formé d'un noyau constitué d'un octamère d'histones, comprenant 2 copies de chaque types d'histones (H2A, H2B, H3 et H4), autour duquel est enroulé 146 paires de bases d'ADN. Chaque histone présente 2 domaines : un domaine central interne qui maintient l'ADN et aide à la compaction du nucléosome, un domaine flexible externe comprenant la partie N-terminale. L'architecture de la chromatine peut être modifiée par plusieurs processus dont un des mieux caractérisés est l'acétylation des histones, notamment des histones H3 et H4, sur des résidus lysines au niveau N-terminal. Cette modification réversible est sous le contrôle de deux classes d'enzymes : les histones acétyltransférases (HAT), et les histones déacétylases (HDAC). L'acétylation des histones altère les interactions électrostatiques entre ADN et histones et contribue à la présence d'un effet stérique avec le placement d'un groupement acétyl hydrophobe. Au niveau de la régulation de l'expression des gènes, cette acétylation est associée à l'activation de la transcription tandis que la déacétylation est corrélée à une répression de la transcription.

- Les **HAT** représentent une famille d'enzymes classés sur la base de motifs conservés. Le premier groupe contient les protéines GCN5 et P/CAF qui sont similaires à HAT GCN5 de levure. Le second groupe contient les protéines CBP et p300 qui agissent en tant que coactivateurs dans plusieurs complexes de facteurs de transcription. Le troisième groupe contient la protéine TAF250 et fait partie du complexe de transcription TFIID qui se

lie sur la TATA box. Le quatrième groupe contient les protéines SRC-1 et ACTR qui sont des coactivateurs de récepteurs nucléaires ligands-activés. Enfin, il existe d'autres protéines présentant une activité HAT telles que la protéine BRCA2.

- Les **HDAC** peuvent être divisées en 3 sous-classes. Les enzymes de classe I sont homologues à la protéine RPD3 de levure et incluent les enzymes HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8 (poids moléculaires de 42 à 55 kDa). Les enzymes de classe II sont homologues à la protéine HDA1 de levure et comprennent les enzymes HDAC4, HDAC5, HDAC6 et HDAC7 (PM 120 à 130 kDa). Récemment, une troisième classe d'enzymes homologues à la protéine SIR2 de levure a été identifiée. A la suite de la caractérisation des fonctions des HDAC dans plusieurs systèmes biologiques tels que la carcinogénèse et l'angiogénèse, d'autres substrats des HDAC différents des histones ont été découverts. Parmi ces protéines non-histones se trouvent des facteurs de transcription (P53, E2F, GATA et le récepteur de l'activine), et des protéines du cytosol (tubuline et importine). L'acétylation des facteurs de transcription P53, E2F, GATA et TCF induit une augmentation de la liaison à l'ADN de ces protéines. E2F et la tubuline une fois acétylés présentent une demi-vie plus longue que les formes non-acétylées. Par ailleurs, l'acétylation de TCF inhibe l'interaction de TCF avec son coactivateur. Enfin, l'acétylation de l'importine est impliquée dans le transport des protéines du cytoplasme vers le noyau. Toutes ces données montrent que l'acétylation/déacétylation peut se produire sur plusieurs types de protéines dans la cellule. Ainsi, les HDAC sont impliqués dans de multiples processus cellulaires incluant la liaison des protéines avec l'ADN, les interactions protéine-protéine, la stabilité protéique et la translocation des protéines.

b) Acétylation et cancérogénèse

Les protéines HAT et HDAC sont trouvées au sein de complexes multi-protéiques qui régulent la transcription des gènes. Des altérations au niveau des activités HAT ou HDAC pourraient donc contribuer au processus de cancérogénèse. Ainsi, la répression inappropriée de gènes requis dans la différenciation cellulaire a été constatée dans le cas de leucémies myéloïdes aiguës. Dans des formes fréquentes de cette maladie, la translocation t(8;21) provoque la formation d'une protéine de fusion AML1-ETO dans laquelle le domaine transactivateur du facteur de transcription AML1 est remplacé par celui de ETO. ETO interagissant avec des HDAC, la protéine de fusion recrute des complexes corépresseurs

contenant des activités HDAC au lieu de recruter des coactivateurs. Les leucémies promyélocyaires aiguës sont également dues à des translocations qui donnent naissance à des protéines de fusion PML-RAR pouvant interagir avec des complexes de corépresseurs. Enfin, la résistance à l'hormone thyroïde (maladie génétique caractérisée par des désordres à la fois au niveau de la rétro-régulation négative et de la régulation positive par l'hormone tri-iodothyronine) peut être due à des mutations du récepteur hormonal de la thyroïde. Ces mutations induisent alors une liaison constitutive de corépresseurs et des HDAC associés.

c) Inhibiteurs de HDAC

Puisque les leucémies aiguës sont associées à la répression aberrante des gènes requis dans la différenciation cellulaire, il est possible que ce mécanisme soit également trouvé dans d'autres types de cancers, notamment les tumeurs solides. Les inhibiteurs de HDAC empêchent la déacétylation. En conséquent, ils pourraient induire la réactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui auraient été inhibés lors de la transformation néoplastique en restaurant une acétylation appropriée (Figure 19). En ce sens, les inhibiteurs de HDAC constituent des candidats anti-cancéreux potentiels dans des tumeurs hématologiques et solides. Les composants inhibant les HDAC sont classés sur la base de leur structure et peuvent schématiquement être regroupés en 4 grandes classes : les acides gras à chaîne courte, les dérivés de l'acide hydroxamique, les térapeptides cycliques et les dérivés synthétiques de benzamide (Tableau 3). Parmi ces différents inhibiteurs de HDAC, les premiers identifiés ont été le butyrate, la TSA et la trapoxine. La TSA a été isolée de cultures de *Streptomyces hygroscopicus* en tant qu'antibiotique anti-fongique et la trapoxine de cultures de *Helioma ambiens* en tant que métabolite naturel. Depuis, de nouveaux inhibiteurs de HDAC ont été soit isolés soit créés sur la base de similitudes structurales.

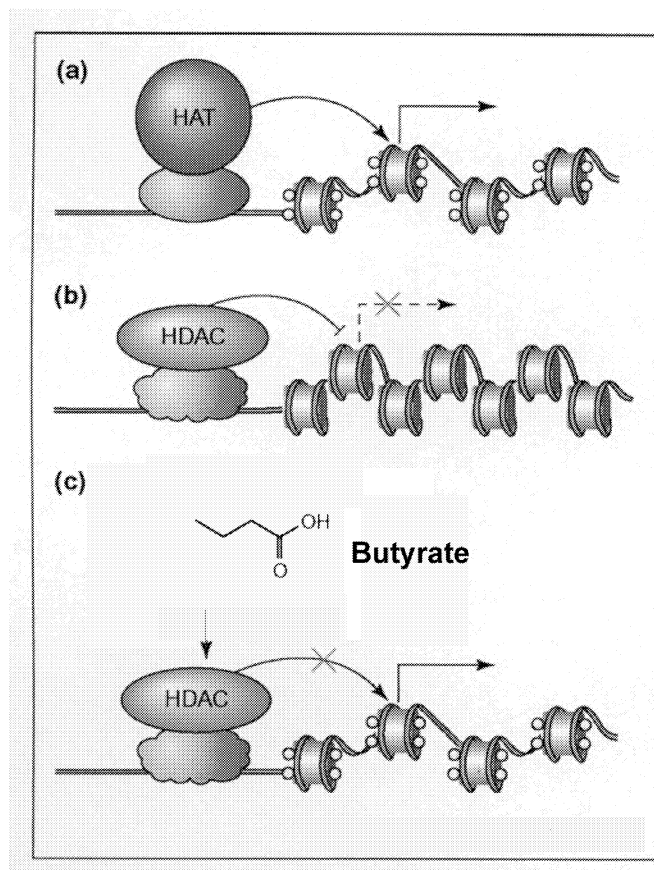
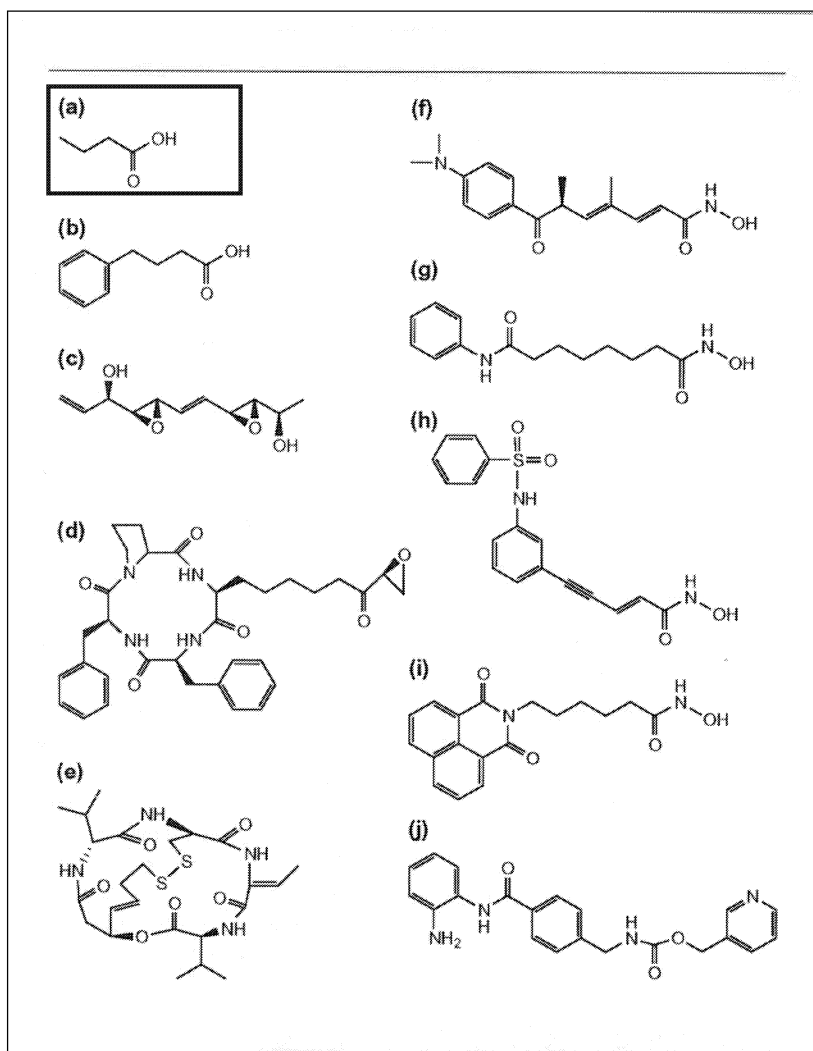


Figure 19 : Régulation de l'expression des gènes par les inhibiteurs de HDAC. (a) En temps normal, les facteurs de transcription (en bleu) sont associés à un complexe de coactivateurs contenant notamment une activité HAT. L'acétylation des histones (en jaune) permet alors la relaxation de l'ADN et donc la transcription des gènes (flèche). (b) A la suite de mutations, les propriétés des facteurs de transcription peuvent changer et agir en tant que répresseur constitutif liant un complexe corepresseur contenant une activité HDAC (en rouge). Le répression de l'acétylation induit la condensation de la chromatine et inhibe la transcription des gènes cibles contribuant ainsi la transformation maligne de la cellule. (c) Les inhibiteurs de HDAC diminuent l'activité de déacétylation et induisent l'accumulation d'histones hyperacétylées. La relaxation de la chromatine qui en résulte permet l'expression des gènes cibles à des niveaux similaires à ceux observés dans une situation normale. Ce processus contribue à l'arrêt de la croissance tumorale et à la redifférenciation des cellules transformées. Adapté de Krämer (Krämer et al., 2001).



Inhibiteur	MM (Da)	Classe structurale	Concentration permettant l'inhibition
a Butyrate	88,1	Acide gras à chaîne courte	mM
b Phenylbutyrate	165,2	Acide gras à chaîne courte	mM
c Depucidine	210,2	Epoxides	μ M, liaison irréversible
d Trapoxine	589,3	Tetrapetide cyclique	nM, liaison irréversible
e Depsipeptide	541,7	Tetrapetide cyclique	μ M
f Trichostatine A (TSA)	302,4	Acide hydroxamique	μ M
g Acide Suberoylanidile Hydroxamique (SAHA)	264,3	Acide hydroxamique	μ M
h Scriptaide	326,4	Acide hydroxamique	μ M
i Oxamaflatine	342,4	Acide hydroxamique	μ M
j MS-27-275	376,4	Benzamides	μ M

Tableau 3 : Structure chimique des différents inhibiteurs de HDAC. Adapté de Krämer (Krämer et al., 2001).

III.C.2 Le butyrate : un inhibiteur de HDAC prototypique

a) Production du butyrate

Le butyrate est un métabolite physiologique issu de la fermentation de la flore microbienne intestinale présente chez tous les mammifères. Il s'agit d'un acide gras à chaîne courte (4 carbones) de type aliphatique, c'est notamment un des acide gras à chaîne courte le plus commun avec le propionate et l'acétate. Il est produit au niveau du colon et résulte de la non-absorption de carbohydrates. Sa concentration au niveau du colon ou des fèces des animaux et des humains peut atteindre près de 15 à 20 mM. Le butyrate est présent plus particulièrement dans le lait entier (3 à 4 % contenu dans des complexes de glycérides ou d'esters de glycérol), l'huile d'olive, le beurre et de nombreux fruits et végétaux. Le butyrate est absorbé par les colonocytes au niveau du colon proximal par diffusion passive et transport actif (Ruppin et al., 1980). Au niveau du colon distal, le principal mécanisme permettant son absorption est la diffusion passive grâce à des transporteurs de molécules lipidiques solubles (Harig et al., 1996). Par ailleurs, le butyrate pourrait agir notamment en tant que comburant générateur d'énergie. En effet, l'oxydation du butyrate a été montrée comme étant responsable de près de 70 % de la consommation d'oxygène par le tissu intestinal humain (Roediger, 1980), indiquant que le butyrate est le principal substrat énergétique des colonocytes.

b) Effets biologiques du butyrate de sodium (NaB)

Dés 1967, des études portant sur les acides gras à chaîne courte démontrèrent que certains d'entre eux tels que le butyrate présentaient une action antiproliférative sur les cellules tumorales. Malgré ces résultats positifs, quelques essais cliniques montrèrent que cette molécule présentait une courte demi-vie sérique et n'induisait qu'une faible augmentation du temps de survie des patients. L'intérêt de cette molécule en tant qu'agent antitumoral déclinait alors pour quelques années. Actuellement, les études réalisées sur cette molécule montrent que l'inhibition de la croissance est due à l'induction d'un blocage du cycle cellulaire, de la différenciation, et de la mort cellulaire programmée. Dans ce cadre, le butyrate bénéficie d'un regain d'intérêt tant au point de vue de l'étude de l'activité que du mécanisme d'action. Par ailleurs, le fait que le butyrate présente une relative absence de

toxicité systémique et la synthèse de dérivés plus stables en font un agent chimiothérapeutique potentiel dans la lutte contre le cancer.

Le NaB est un inhibiteur de la croissance cellulaire *in vitro* (Kruh J, 1982), et ce à des concentrations « physiologiques » (de l'ordre du mM). Cette inhibition de la croissance passe par une inhibition de la synthèse d'ADN et un arrêt de la prolifération se traduisant le plus souvent par un blocage du cycle cellulaire en G1 dans des cellules transformées ou non telles que des cellules de myélomes, de gliomes, de rétinoblastomes, de cancers ovariens et des cellules normales de colon (Dai et al., 2003 ; Terao et al., 2001 ; Ito et al., 2001 ; Vaziri et al., 1998 ; Fajkus et al., 2003). Il est également capable d'induire la réapparition de certains marqueurs spécifiques de la différenciation. Ainsi après une exposition au NaB, les cellules de lignées sanguines immatures se transforment en cellules différenciées, l'antigène carcinoembryonnaire est augmenté dans les cellules cancéreuses de colon tout comme l'antigène PSA dans les cellules cancéreuses de prostate. Dans la lignée cancéreuse de sein MCF-7, l'exposition au NaB induit une régulation positive de l'antigène PME.

Dans les cellules de tumeurs telles que les rétinoblastomes, les lymphomes, les cellules cancéreuses de colon et de poumon, le NaB est également capable d'induire l'apoptose. Néanmoins, certaines études ont montré que, dans le cas des cellules de carcinome de colon, cette induction de l'apoptose n'est pas corrélée à l'intensité de l'inhibition de la prolifération (Galfi et al., 2002). La sélectivité de l'effet apoptotique du NaB sur les cellules transformées en fait ainsi un candidat de choix dans la lutte contre le cancer. Par ailleurs, l'ensemble de ces observations et le fait que des études épidémiologiques ont montré qu'un régime riche en fibres était associé à une faible fréquence de cancer colorectaux ont permis de suggérer que les acides gras à chaîne courte et notamment le butyrate était responsable des effets « bénéfiques » de ces régimes. Cette hypothèse a été confirmée *in vivo* dans des rats soumis à un régime de blé et de son favorisant la production de butyrate ou par administration intragastrique de butyrate (Boffa et al., 1992 ; Wargovich and Levin, 1996). Le butyrate en induisant l'apoptose permettrait ainsi une protection naturelle contre le processus de carcinogénèse en éliminant les cellules anormales avant qu'elles ne constituent des lésions pré-cancéreuses.

Le NaB est également capable de stimuler l'immunogénicité des cellules cancéreuses. Ainsi le traitement de cellules cancéreuses de colon faiblement immunogènes induit l'augmentation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1), et ce de manière dose-dépendante. De plus,

l'utilisation combinée du NaB et de l'interleukine-2 provoque la disparition de tumeurs induites dans des rats par injection intrapéritonéale de cellules de carcinome de colon (Perrin et al., 1994). Cette complète régression peut être attribuée non seulement aux effets propres du NaB (inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose), mais également à l'augmentation de l'immunogénicité des cellules cancéreuses. Dans le cas particulier des cellules normales de colon, il a été montré que le butyrate stimulait leur prolifération et était nécessaire à leur survie (Sakata, 1987 ; Luciano et al., 1996). Le butyrate apparaît ainsi avoir une action spécifique au niveau du colon en permettant la croissance et le bon fonctionnement des cellules normales tout en inhibant les processus menant à la formation et au développement de cellules anormales.

c) Effets moléculaires du NaB

Le NaB inhibe les HDAC notamment HDAC1 *in vitro* par un mécanisme non-compétitif réversible encore mal déterminé. Il induit l'hyperacétylation des histones à des concentrations de l'ordre de 0,25 à 0,5 mM (Archer and Hodin, 1999). Cette acétylation permet de moduler de façon positive l'expression d'un certain nombre de gènes. Bien que l'effet inhibiteur du butyrate sur les HDAC doit être considéré comme le mécanisme d'action majeur de cette molécule, il est à noter que le butyrate semble être responsable d'autres modifications de la chromatine telles que la phosphorylation et la méthylation (Kruh et al., 1992 ; Boffa et al., 1981). Par ailleurs, des éléments de réponse au butyrate ont été identifiés dans certains gènes cibles tels que la gamma-globine par transfection de constructions contenant différentes séquences du promoteur de ce gène (Pace et al., 1996 ; McCaffrey et al., 1997).

Lors de l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC tels que le butyrate, la trichostatine A ou le SAHA, seuls environ 2 % des gènes trouvent leur niveau d'expression altéré, et ce malgré l'acétylation des histones observée. Ces résultats indiquent qu'une petite sous-population de gènes est contrôlée par la seule déacétylation des histones, ce qui explique les effets spécifiques des inhibiteurs de HDAC. Cette réponse d'un petit nombre de gènes peut également expliquer pourquoi les inhibiteurs de HDAC affectent préférentiellement les cellules tumorales plutôt que les cellules normales. Cette différence de réponse reflète différents modes d'activation des gènes dans les cellules normales et les cellules équivalentes transformées. De manière à comprendre la sensibilité des cellules cancéreuses lors des

traitements avec des inhibiteurs de HDAC, certains gènes impliqués dans l'inhibition de la prolifération et l'induction de la mort des cellules tumorales ont été identifiés.

Le butyrate étant un produit de fermentation de la flore intestinale, la majorité des études menées sur cette molécule ont porté jusqu'ici sur les cellules cancéreuses de colon. Des études génomiques et protéomiques ont montré que le NaB régule de manière positive l'expression de gènes impliqués : (1) dans l'inhibition du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN (p21^{waf1}, p16^{ink4A}, p19^{ink4B}, tob-1 et GADD45) ; (2) dans la réponse au stress (HSP70 et HSP27), (3) dans le métabolisme mitochondrial (cytochrome c oxydase I et III), (4) dans la transduction du signal (protéine kinase C δ), (5) et dans la transcription (facteurs de transcription myc et gata-2). Cependant, le NaB est également capable de moduler de manière négative l'expression d'un petit nombre de gènes tels que PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) participant à la régulation du cycle cellulaire, la réplication et la réparation de l'ADN ; et la Cycline D1 impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Tabuchi et al., 2002 ; Tan et al., 2002 ; Chen et al., 2002 ; Ragione et al., 2001 ; Iacomino et al., 2001 ; Souleimani and Asselin, 1993 ; Heerdt and Augenlicht, 1991).

Le NaB a été également reporté comme induisant l'expression du gène de la gamma-globine dans les érythrocytes *in vitro* et *in vivo*. En ce qui concerne les cellules cancéreuses de sein, le NaB diminue l'expression de l'activateur de plasminogène uPA, des récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone, et de gènes anti-apoptotiques tels que bcl-2 (Horwitz et al., 1982 ; DeFazio et al., 1992 ; Mandal and Kumar, 1996 ; Dong-Le Bourhis et al., 1998). Au contraire, il induit l'expression de p21^{waf1} (Davis et al., 2000) et celle de l'IGFBP-3 (Tsubaki et al., 2001).

III.C.3 Le butyrate et ses analogues : applications cliniques

De par ses effets anti-tumoraux, l'utilisation du butyrate en tant qu'agent pharmacologique a été réalisée dès les années 1980. Des études pharmacologiques et pharmacocinétiques ont été menées sur plusieurs espèces animales telles que la souris et le lapin (Brazier et al., 1985 ; Daniel et al., 1989 ; Poulliart et al., 1992) ainsi que sur les humains (Miller et al., 1987 ; Perrine and Faller, 1993). Le butyrate a été notamment administré par voie intra-veineuse, intra-péritonéale et orale. Les travaux effectués chez l'homme ont montré une élimination rapide du butyrate sous forme saline administrée par voie intra-veineuse. Ainsi l'administration continue et journalière de 500 mg/kg de NaB pendant 15 jours à des patients souffrant de leucémies myéloïdes aiguës accroît rapidement le

taux de butyrate endogène de près de 6 fois sans induire d'effets secondaires notables. Cependant, à la fin du traitement, la concentration de butyrate décroît rapidement avec une demi-vie de $6 \pm 1,4$ minutes (Miller et al., 1987). Par ailleurs, les quelques thérapies antitumorales ayant utilisé le NaB se sont soldées par des rémissions partielles de quelques semaines de l'évolution de la tumeur. Une hypothèse expliquant les résultats obtenus est que le faible temps de résidence du butyrate dans l'organisme pouvait être à l'origine des faibles effets *in vivo* puisqu'*in vitro*, où le contact entre la cellule et la molécule est prolongée, les propriétés antitumorales sont très importantes.

De manière à surmonter les problèmes dus à la rapide élimination du butyrate dans l'organisme, les recherches se sont portées sur la synthèse de dérivés plus stables du butyrate présentant une liaison covalente au lieu d'une liaison saline et restant non-toxiques pour l'organisme. Ces dérivés permettraient ainsi la délivrance de façon continue du butyrate, et ce par hydrolyse ou estérification. Plusieurs dérivés furent synthétisés notamment des dérivés covalents butyrate-glycerol voire butyrate-monosaccharides. Parmi ces nouvelles molécules on compte le phenylbutyrate, l'isobutyramide, la tributyrine.

- **Le phenylbutyrate** a été notamment approuvé par la 'Food and Drug Administration' dans le cadre de l'utilisation clinique chez des patients souffrant d'hyperammonniémie suite à des chimiothérapies, à des transplantations, ou à des désordre du cycle de l'urée. Ce composé augmente également la production d'hémoglobine fœtale chez des patients souffrant d'anémie ou de B-thalassémie. Le phenylbutyrate est actuellement testé dans des études de phase I chez des patients présentant des tumeurs malignes solides (Gilbert et al., 2001 ; Carducci et al., 2001).

- **L'isobutyramide** est un analogue oral du butyrate sur lequel une chaîne amide est branchée et dont la demie-vie est beaucoup plus longue (4 heures dans des souris athymiques). L'isobutyramide inhibe la croissance de cellules cancéreuses de prostate *in vivo* dans des souris (Gleave et al., 1998). Ce dérivé est également testé en phase II chez des patients souffrant de thalassémie, le but étant de stimuler la production d'hémoglobine foetale (Cappellini et al., 2000).

- **La tributyrine** est un triglycéride contenant trois molécules de butyrate estérifiées par une molécule de glycérol. L'administration orale de tributyrine permet d'obtenir des

concentrations plasmatiques de 0,1 à 0,45 mM de butyrate avec un pic de l'ordre de 1 mM dans l'organisme des patients et cela sans effets secondaires (Conley et al.,1998 ; Edelman et al., 2003). Ces résultats sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent d'obtenir des concentrations compatibles avec celles induisant un effet anti-tumoral *in vitro*.

Les travaux menés *in vivo* sur les dérivés du butyrate montrent que, l'obtention de concentrations de butyrate compatibles avec une activité biologique *in vitro*, peut être obtenue grâce à l'administration orale d'analogues du butyrate. La toxicité minimale de ces dérivés et les résultats encourageants obtenus notamment contre les maladies hématologiques en font d'excellents candidats pour le traitement des tumeurs solides.

OBJECTIF DU TRAVAIL DE
RECHERCHE

Le cancer du sein est le premier cancer féminin de la communauté européenne avec environ 210 000 nouveaux cas par an et 73 000 décès annuels (source : Organisation Mondiale de la Santé). Les traitements anti-cancéreux classiques tels que la radiothérapie et la chimiothérapie présentent certaines limites. La radiothérapie peut se heurter à des phénomènes de résistance soit initialement, soit en cours de traitement, et la chimiothérapie induit souvent l'apparition d'effets secondaires. Face à ces problèmes, la découverte de nouvelles molécules anti-tumorales et des approches combinant plusieurs agents anti-cancéreux font l'objet de nombreuses recherches.

Dans ce cadre, les inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) ont été proposés en tant qu'agents anti-cancéreux potentiels. Un des inhibiteurs de HDAC, le butyrate, un acide gras à chaîne courte issu de la dégradation de fibres par les bactéries de la flore intestinale, a été plus particulièrement étudié. Le butyrate inhibe la croissance et induit l'apoptose de plusieurs lignées cancéreuses telles que des carcinomes intestinaux, des gliomes et des rétinoblastomes. De manière intéressante, des études cliniques ont montré que cette molécule présente une toxicité quasi-nulle et de très faibles effets secondaires. Un autre groupe émergent d'agents anti-cancéreux concerne les ligands des récepteurs de mort tels que TNF-alpha (Tumor-Necrosis Factor alpha), TRAIL (TNF-Related Apoptosis Ligand) et Fas L. Dans la plupart des cas, l'activation des récepteurs de mort par leur ligand induit l'apoptose des cellules tumorales mais pas celle des cellules normales. De plus, le cotraitement d'agents antitumoraux et des ligands des récepteurs de mort permet de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à un seul traitement. Ces ligands potentialisent également l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques et des radiations.

Dans ce cadre, mon travail de thèse a donc consisté à :

- Etudier **les effets et les mécanismes d'action** du butyrate sur la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses de sein.

- Evaluer **l'effet d'un traitement combiné** du butyrate et des ligands des récepteurs de mort sur l'apoptose des cellules cancéreuses et normales de sein.

RESULTATS

Partie 1

*Effets et Mécanismes d'action du NaB sur les
cellules cancéreuses de sein*

Article 1

**“ Sodium butyrate induces P53-independent, Fas-mediated apoptosis in
MCF-7 human breast cancer cells ”**

**Publié dans *British Journal of Pharmacology*
(2002) 135, 79-86**

L'évaluation de l'intérêt du butyrate en tant qu'agent anticancéreux potentiel passe tout d'abord par l'étude de l'effet et du mécanisme d'action du butyrate de sodium (NaB) sur les cellules cancéreuses. Nous avons démontré que le NaB inhibe la croissance de toutes les lignées cancéreuses de sein analysées, et ce quel que soit le type de culture utilisé (monocouche, gel de collagène et agar mou). Nos résultats indiquent que le NaB inhibe la croissance dans toutes les conditions de culture. Par ailleurs, il provoque un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G1 et induit l'apoptose des lignées MCF-7, MCF-7 ras, T47-D et BT-20. Dans la lignée MDA-MB-231, le NaB induit un arrêt du cycle cellulaire dans la phase G2/M. Ainsi, le NaB peut affecter les cellules cancéreuses de sein à la fois dans des stades précoces (hormono-dépendants) et tardifs (hormono-indépendants) du développement tumoral de la glande mammaire.

L'inhibition de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose peuvent être sous le contrôle d'un certain nombre de gènes tels que le facteur de transcription P53. La transfection transitoire des cellules MCF-7 avec des plasmides contenant des séquences de p53 sens et antisens ne modifie pas l'apoptose induite par le NaB. De plus, l'utilisation de la pifithrine- α , un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de P53, ne modifie pas l'effet du NaB sur la croissance et l'apoptose des lignées MCF-7 et T47-D. Ces résultats indiquent que P53 n'est pas impliquée dans l'inhibition de la croissance induite par le NaB.

L'apoptose peut être due à la présence de récepteurs de mort capables après fixation de leur ligand de transduire un signal aboutissant à la destruction de la cellule par apoptose. Un des récepteurs de mort, Fas, est notamment impliqué dans l'induction de l'apoptose lors de l'involution de la glande mammaire (Song et al, 2000). Par ailleurs, l'expression de Fas L dans les cellules cancéreuses de sein est associée à une perte d'expression de Fas, ce qui aboutit à une résistance des cellules face à l'apoptose induite par Fas L. Nous avons montré que dans les cellules MCF-7, l'utilisation d'un anticorps anti-Fas agoniste potentialise l'apoptose induite par le NaB. En revanche, un anticorps anti-Fas antagoniste réduit l'apoptose induite par le NaB. De plus, des analyses en Western blot montrent que le NaB accroît le taux de Fas et de Fas L membranaire.

L'ensemble de ces résultats montre que le NaB inhibe la croissance des cellules cancéreuses de sein de manière P53-indépendante et induit l'apoptose par l'intermédiaire du système Fas/Fas L.

Article 2

“ P21^{WAF1/CIP1} is dispensable for G1 arrest but indispensable for apoptosis induced by sodium butyrate in MCF-7 breast cancer cells ”

Sous presse dans *Oncogene*

Nous avons observé que l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose sont associées à une induction de l'expression de P21^{waf1} dans les lignées MCF-7, MCF-7 ras, T47-D et BT-20. Ces résultats non présentés dans l'article sont reportés dans la Figure 20. De manière à évaluer l'implication exacte de P21^{waf1} dans ces phénomènes, nous avons réalisé des transfections transitoires de plasmides contenant différentes séquences de p21 dans les cellules MCF-7 : p21 sens (p21 WT), p21 antisens (p21 AS), p21 déficient pour son interaction avec la protéine PCNA (p21 PCNA-), et p21 déficient pour son interaction avec les CDK (p21 CDK-)

L'analyse en microscopie à fluorescence révèle que le NaB induit une augmentation de l'expression de P21^{waf1}, plus particulièrement au niveau du noyau. De plus, des transfections transitoires d'un plasmide p21 CDK- abrogent le blocage du cycle cellulaire induit par le NaB, et ce contrairement à la transfection d'un plasmide p21 PCNA-. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la prolifération implique l'interaction de P21^{waf1} avec les CDK. Néanmoins, P21^{waf1} n'est pas indispensable à ce blocage puisque la transfection d'un plasmide p21 AS ne modifie pas l'effet du NaB sur le cycle cellulaire.

Par ailleurs, l'apoptose induite par le NaB est abolie par la transfection des plasmides p21 AS et p21 PCNA- mais non par la transfection des plasmides p21 WT et p21 CDK-. L'analyse en Western blot montre que le NaB diminue l'expression de PCNA et augmente l'association de PCNA avec P21^{waf1}. L'ensemble de ces résultats suggère que l'apoptose induite par le NaB requiert P21 et son interaction avec PCNA.

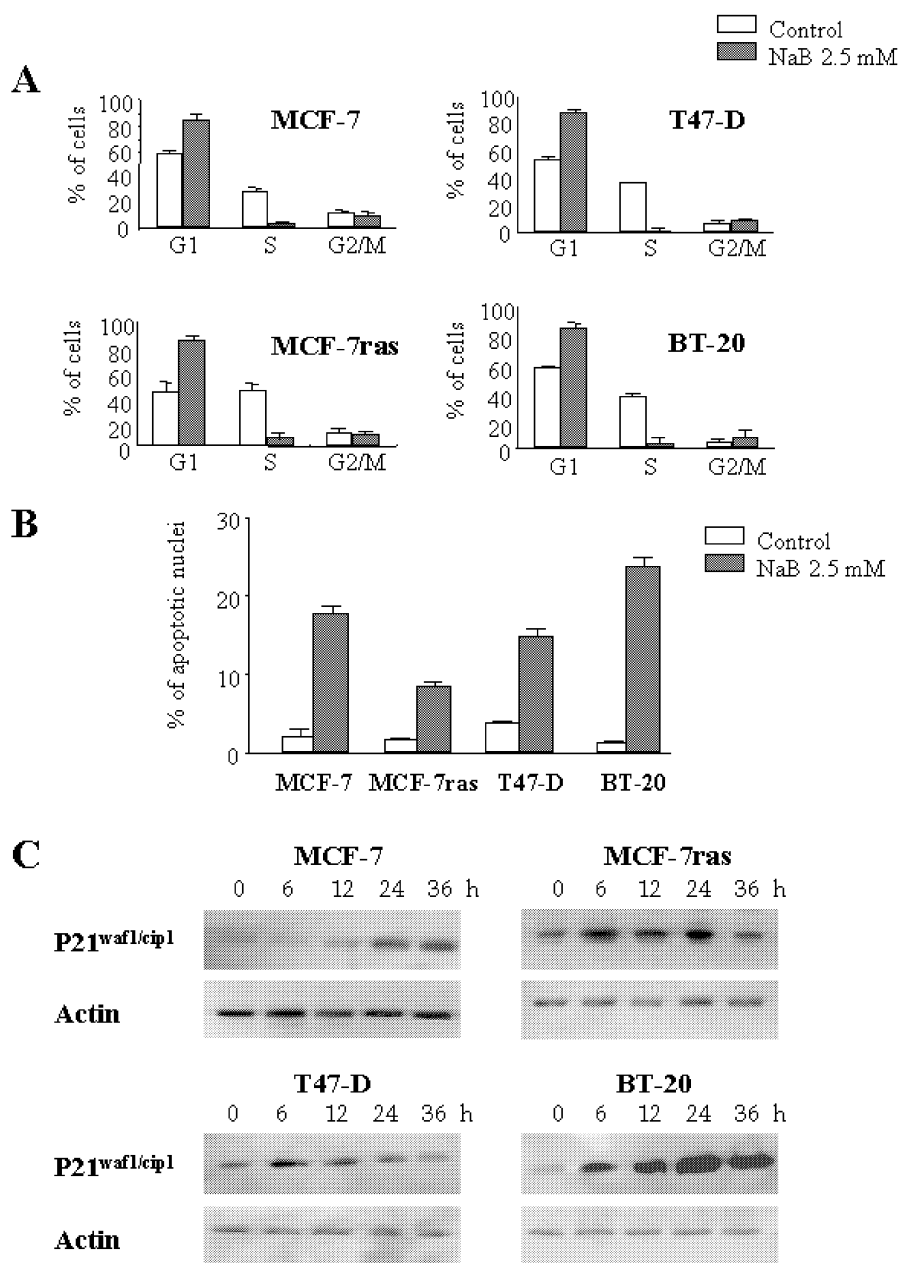


Figure 20 : Effet du NaB sur le cycle cellulaire (A), l'apoptose (B) et l'expression de P21^{waf1} (C). Les cellules cancéreuses de sein MCF-7, MCF-7ras, T47-D et BT-20 sont traitées en présence ou en absence de NaB 2,5 mM durant soit 48 h (A et B) soit différentes périodes de temps (C). L'analyse du cycle cellulaire est réalisée par cytométrie en flux après un marquage au iodure de propidium. L'apoptose est évaluée après marquage au Hoechst. Les résultats sont représentatifs de trois expériences séparées. Chaque barre représente la moyenne +/- SD dans un essai en triplicate. L'analyse en Western blots de P21^{waf1} (30 µg) est réalisée suivant le protocole décrit dans l'article 2. La charge et le transfert de quantités égales de protéines sont confirmés par l'immunodétection de l'actine.

Partie 2

*Vers une application thérapeutique potentielle du
NaB contre le cancer du sein ?*

Article 3

“ Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by cotreatment with butyrate and TNF-alpha, TRAIL or anti-Fas agonist antibody involves enhancement of death receptors’ signalling and requires P21^{waf1} ”

Soumis dans *Cell Death and Differentiation*

Les traitements actuels contre le cancer du sein sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant, cet arsenal thérapeutique classique pose un certain nombre de problèmes. Les tumeurs peuvent ne pas répondre aux traitements voire même acquérir des phénomènes de résistance ; de plus, les agents utilisés produisent bien souvent des effets secondaires. Face aux limites de ces thérapies, la recherche de nouveaux traitements combinant l'action de plusieurs agents anti-cancéreux constitue une alternative intéressante en permettant, tout en utilisant de faibles doses, d'optimiser l'action anti-tumorale et de limiter l'apparition des effets secondaires.

L'article suivant a permis d'évaluer l'effet de cotraitments par le NaB et des ligands ou agoniste des récepteurs de mort. Nos résultats montrent que TNF-alpha, TRAIL et un anticorps anti-Fas agoniste potentialisent l'inhibition de la croissance induite par le NaB, et ce par une induction synergique de l'apoptose dans les lignées MCF-7, T47-D et BT-20. Des analyses en Western blot montrent que le NaB augmente l'expression des récepteurs de TNF-alpha, de TRAIL et de Fas L dans les cellules MCF-7. De plus, le NaB, seul ou en combinaison avec TNF-alpha, TRAIL et un anticorps anti-Fas agoniste, augmente le niveau de Bid, de Bid tronqué et du cytochrome c cytosolique. Par ailleurs, la potentialisation de l'induction de l'apoptose est fortement inhibée par la transfection transitoire d'un plasmide contenant un dominant négatif de FADD et par l'utilisation d'inhibiteurs des caspases 8 et 9. De manière intéressante, la transfection transitoire d'un plasmide p21^{waf1} antisens ou déficient pour son interaction avec PCNA respectivement abolit et diminue fortement l'induction synergique de l'apoptose. Cette inhibition est associée à l'absence de relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol.

L'ensemble de ces résultats montre que le TNF-alpha, TRAIL et l'anticorps anti-Fas agoniste potentialisent induction de l'apoptose induite par le NaB. Cette induction synergique de l'apoptose est associée à une augmentation de plusieurs protéines clefs impliquées dans la voie de signalisation des récepteurs de mort, et est sous le contrôle de P21^{waf1}.

Résultats non publiés

I Identification des voies de transduction du NaB dans les cellules MCF-7

II Effet des facteurs de croissance sur l'apoptose induite par le NaB dans les cellules MCF-7

III Effets du NaB sur la croissance des cellules normales de sein

I Identification des voies de transduction du NaB dans les cellules MCF-7

De manière à préciser les mécanismes d'induction de l'apoptose dans la lignée MCF-7, les cellules sont traitées par du NaB en présence de différents inhibiteurs pendant 48 h (Figure 21). La cycloheximide, l'actinomycine D et la génistéine inhibent l'induction de l'apoptose par le NaB. Ces résultats indiquent que l'effet du NaB requiert dans une certaine mesure la synthèse de protéines, d'ARN et l'activité de protéines tyrosines kinases. En revanche, les protéines tyrosines phosphatases et la voie de la PI-3 Kinase ne semblent pas impliquées dans l'induction de l'apoptose puisque l'orthovanadate et la wortmannine n'ont pas d'influence sur l'effet du NaB. Par ailleurs, le PD 98059 (inhibant la voie des MAP Kinases) augmente d'environ 7 à 10 % l'apoptose induite par le NaB. L'utilisation de la thapsigargine (un inhibiteur de la pompe à Ca^{2+} ATPase dépendante permettant le passage du Ca^{2+} du cytosol vers le reticulum endoplasmique) et d'un milieu de culture contenant de faibles concentrations de Ca^{2+} potentialisent fortement l'effet apoptotique du NaB.

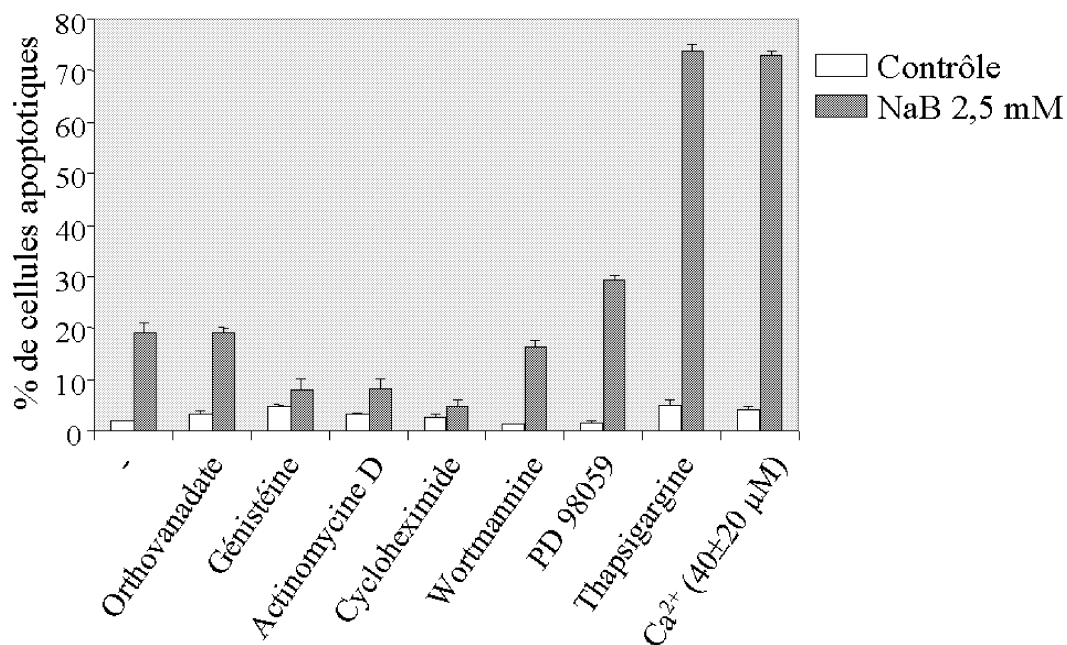


Figure 21 : Mécanismes d'action de l'apoptose induite par le NaB. Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 48 h par 2,5 mM de NaB en présence ou en absence de différents inhibiteurs (Orthovanadate 1 μM , Génistéine 10 μM , Actinomycine D 50 μM , Cycloheximide 0,5 $\mu\text{g/ml}$, Wortmannine 10 nM, PD 98059 20 μM , Thapsigargine 4 nM) ou dans un milieu de culture contenant de faibles concentrations de Ca^{2+} (40±20 μM). L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

L'induction de l'apoptose est sujette à un processus de régulation complexe et représente l'issue finale de multiples voies de transduction impliquant le Ca^{2+} intracellulaire, la PKC, l'AMPc, les protéines kinases et phosphatases. Nos résultats indiquent que seule une partie de l'effet apoptotique du NaB nécessite la synthèse de protéines et d'ARN ; la cycloheximide et l'actinomycine n'inhibant que partiellement l'induction de l'apoptose par le NaB. Ces données sont accord avec les travaux de Velazquez (Velazquez et al., 1998) et de Caelles (Caelles et al., 1994) montrant que l'apoptose pouvait se produire indépendamment de la synthèse d'ARN et de protéines. Nous avons également montré que l'induction de l'apoptose par le NaB dans les cellules MCF-7 nécessite en partie l'activation des tyrosines kinases. Ces résultats confirment les travaux menés sur d'autres types cellulaires dans lesquels le NaB induit une phosphorylation des protéines tyrosines kinases (Rivero and Adunyah, 1996). Cependant, dans notre modèle, les protéines impliquées ne sont pas les MAP Kinases MEK1 et 2 puisque l'utilisation du PD 98059 ne diminue pas l'effet anti-apoptotique du NaB, au contraire il l'augmente légèrement.

Par ailleurs, l'utilisation de la thapsigargine et d'un milieu de culture contenant de faibles concentrations de Ca^{2+} potentialisent l'effet apoptotique du NaB. Ces résultats suggèrent une implication du Ca^{2+} intracellulaire dans l'induction de l'apoptose. En effet, il a été décrit que la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique vers le cytosol induit l'activation d'enzymes dépendantes du calcium (Hajnoczky et al., 2003 ; Orrenius et al., 2003). Ces enzymes permettent soit le recrutement de la mitochondrie dans la machinerie apoptotique soit l'activation directe des caspases. Par exemple, la calpaine (une cystéine protéase dépendante du Ca^{2+}) peut cliver Bid, un membre de la famille Bcl-2 dont le produit de clivage est impliqué dans le relargage du cytochrome c. La calpaine est également capable de cliver et d'activer la caspase 12. Récemment, He a démontré que la thapsigargine induit l'apoptose *via* la surexpression de DR5 et de TRAIL. Cette surexpression est une conséquence de la déplétion des stocks de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique par la thapsigargine (He et al., 2002).

II Effet des facteurs de croissance sur l'apoptose induite par le NaB dans les cellules MCF-7

Le développement tumoral de la glande mammaire dépend de la présence d'hormones stéroïdiennes ou non-stéroïdiennes mais aussi de nombreux facteurs de croissance. Ainsi, les cellules cancéreuses de sein produisent des facteurs de croissance tels que le NGF, le FGF-2

et l'IGF pouvant moduler leur propre prolifération de façon autocrine ou paracrine. Afin d'évaluer l'effet de ces facteurs de croissance sur l'apoptose induite par le NaB, les cellules MCF-7 sont traitées pendant 48 h par 2,5 mM de NaB en présence ou en absence de NGF, FGF-2, IGF-1 et HGF (Figure 22.A).

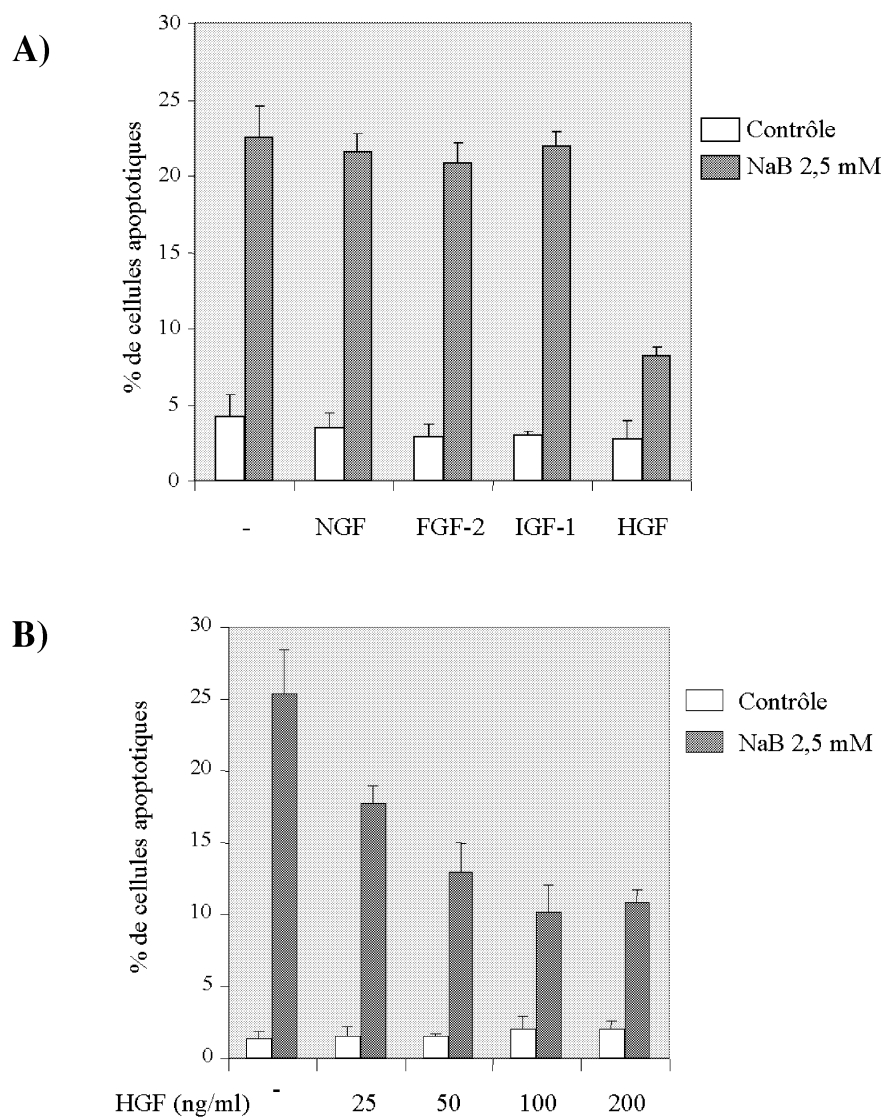


Figure 22 : Effet des facteurs de croissance sur l'apoptose des cellules MCF-7 induite par le NaB. Les cellules sont traitées pendant 48 h par 2,5 mM de NaB (A) en présence ou en absence de différents facteurs de croissance : NGF (200 ng/ml), FGF-2 (20 ng/ml), IGF-1 (10 ng/ml) et le HGF (100 ng/ml) ou (B) en présence de différentes concentrations de HGF. L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Les résultats montrent que, parmi les différents facteurs de croissance testés, seul l'HGF inhibe l'apoptose induite par le NaB. Cette inhibition est incomplète puisque l'augmentation de la concentration de l'HGF ne parvient qu'à diminuer de moitié l'apoptose

induite par le NaB (Figure 22.B). L'HGF également nommé SF (Scatter Factor) est un facteur de croissance capable d'induire de multiples réponses biologiques incluant la prolifération, l'essaimage, l'invasion, la morphogenèse de branchement et l'angiogenèse. Dans le cadre du cancer du sein, la détection de hauts niveaux de HGF dans le stroma de tumeurs mammaires a été corrélée à un pronostic défavorable (Yamashita et al., 1994).

De façon à préciser le mécanisme d'action du HGF dans cette inhibition de l'apoptose, nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques (Figure 23).

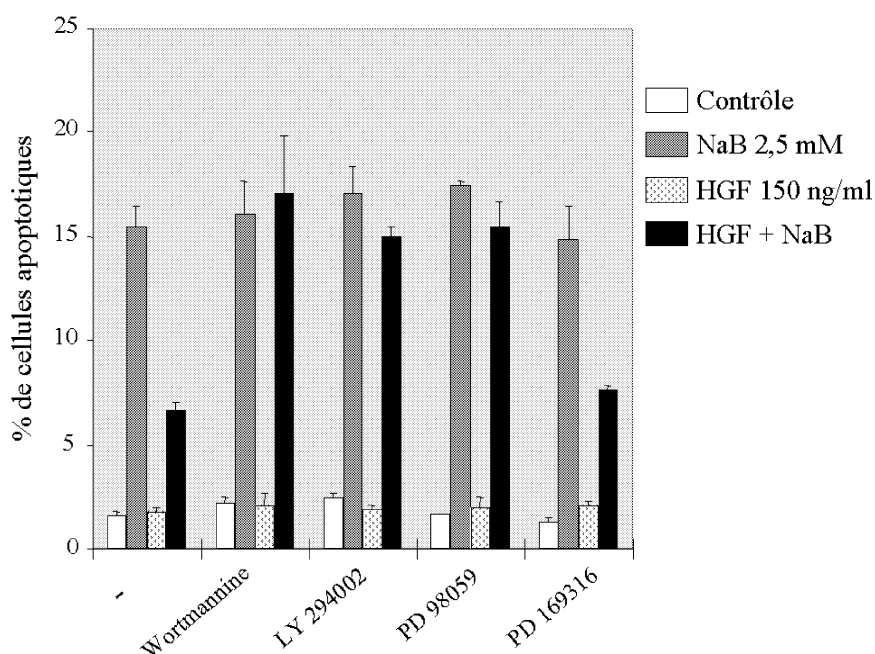


Figure 23 : Implication de la PI-3 Kinase et des MAP Kinases dans l'inhibition de l'apoptose induite par le HGF. Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 48 h par 2,5 mM de NaB et 150 ng/ml de HGF en présence ou en absence de Wortmannine (10 μ M), de LY 294002 (1,5 μ M), de PD 98059 (10 μ M) et de PD 169316 (150 nM). L'apoptose est déterminée après marquage au Hoechst. Les résultats sont issus d'une expérience réalisée en triplicate et sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

La wortmannine et le LY 294002 inhibent la PI-3 Kinase, le PD 98059 inhibe les MAPK Kinases MEK 1et 2, le PD 169316 inhibe la P38 MAP Kinase. Les résultats montrent que l'activité anti-apoptotique de l'HGF est abrogée en présence de la wortmannine, du LY 294002, et du PD 98059. En revanche, le PD 169316 n'a pas d'effet sur le traitement combiné de HGF et de NaB. Ces données indiquent que la diminution de l'apoptose induite par le HGF est en particulier due à l'activation de la PI-3 Kinase et de MEK1 et 2. Nos résultats sont en accord avec ceux de Mildner (Mildner et al., 2002) et Kitta (Kitta et al., 2001) qui montrent

que l'HGF inhibe l'apoptose induite par des UV ou un stress oxydatif *via* l'activation de la voie Akt/PI-3 Kinase et des protéines MEK.

III Effets du NaB sur la croissance des cellules normales de sein

En vue d'une application possible du NaB en thérapie, nous avons testé l'effet de cet agent sur la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN) en culture primaire (Figure 24). L'analyse en cytométrie de flux indique que le NaB provoque un blocage du cycle cellulaire en G1. De manière intéressante, il n'induit que très faiblement l'apoptose de ces cellules même après 72 h de traitement.

A) PROLIFERATION

Temps	% de CEMN	G1	S	G2/M
24 h	Contrôle	46,1 ± 2,1	30,8 ± 1,1	23,1 ± 2,1
	NaB 2,5 mM	52,1 ± 1,3	10,9 ± 0,6	37,0 ± 0,9
48 h	Contrôle	55,2 ± 1,8	26,5 ± 0,9	18,3 ± 1,5
	NaB 2,5 mM	71,1 ± 0,8	10,3 ± 1,0	16,6 ± 1,2

B) APOPTOSE

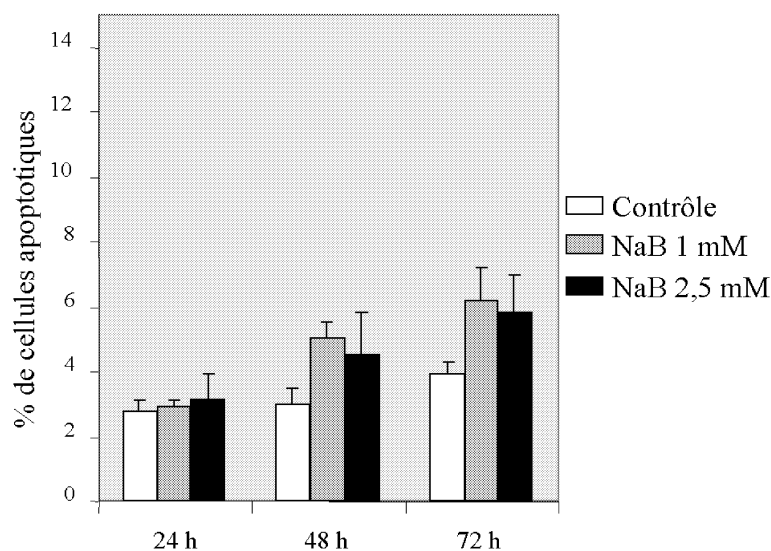


Figure 24 : Effet du NaB sur les cellules épithéliales mammaires normales (CEMN). Les cellules sont traitées par du NaB pendant différentes périodes de temps. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes effectuées sur des CEMN provenant de 3 échantillons différents. (A) La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire est estimée en % après marquage au iodure de propidium et passage en cytométrie de flux. (B) L'apoptose est déterminée après marquage des cellules au Hoechst.

Nous avons montré précédemment que les traitements combinés de NaB et de TNF-alpha, de TRAIL, et d'un anticorps anti-Fas agoniste inhibent fortement la croissance des cellules cancéreuses de sein. Nous avons alors testé la sensibilité des cellules épithéliales mammaires normales face à ces cotraitements (Figure 25).

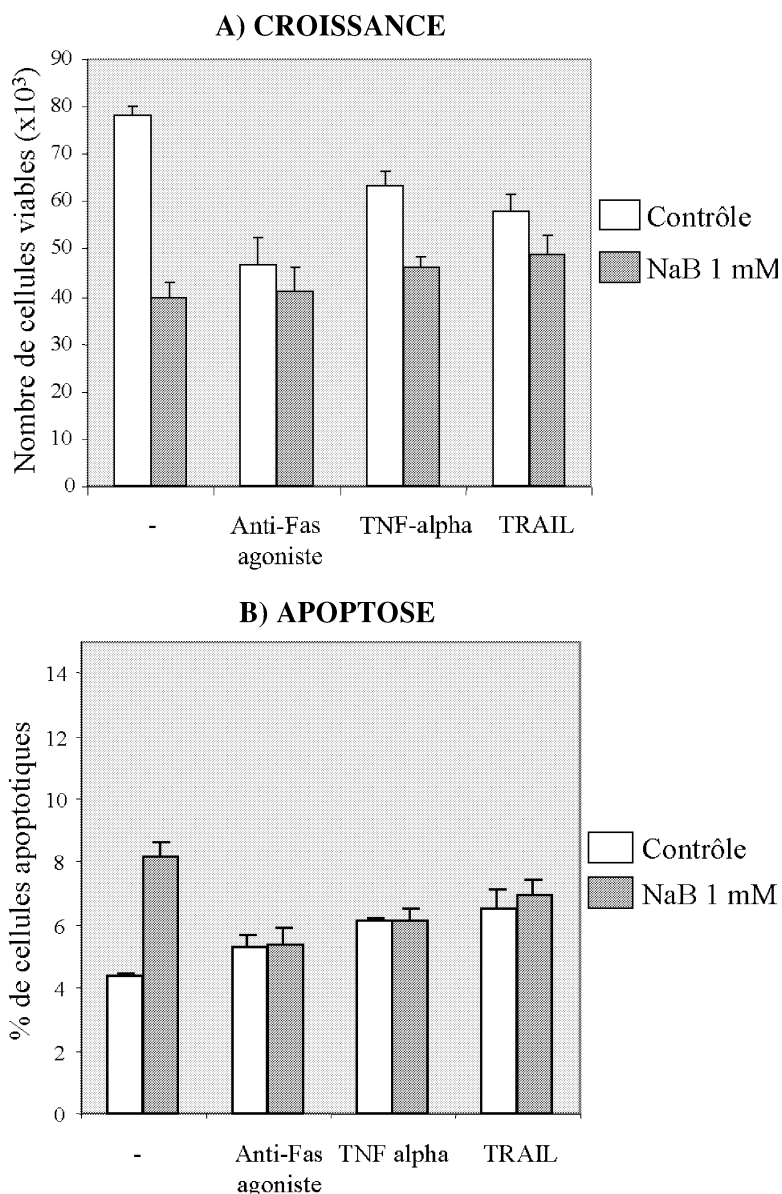


Figure 25 : Effets des cotraitements sur la croissance et l'apoptose des CEMN. Les cellules sont traitées pendant 48 h par du NaB 1 mM en présence ou en absence d'un anticorps anti-Fas agoniste (0,5 µg/ml), de TNF-alpha (0,1 ng/ml) et de TRAIL (0,1 ng/ml). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes effectuées sur des CEMN provenant de 3 échantillons différents. **(A)** La viabilité cellulaire est déterminée par comptage après coloration au bleu Trypan. **(B)** L'apoptose est évaluée après marquage au Hoechst.

Les résultats montrent que le NaB et les ligands des récepteurs de mort inhibent la croissance des CEMN. Cependant, l'inhibition induite par les traitement combinés est comparable à celle observée en présence du NaB seul. De manière intéressante, les traitements combinés de NaB et de TNF-alpha, TRAIL, et un anticorps anti-Fas agoniste n'induisent pas l'apoptose des CEMN, et ce contrairement à ce que nous avons observé dans les cellules cancéreuses de sein.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats présentés dans cette thèse montre que :

- Le NaB inhibe la croissance de toutes les lignées cancéreuses de sein testées dans différentes conditions de culture. Cette inhibition de la croissance passe par un arrêt du cycle cellulaire en G1 et une induction de l'apoptose pour les lignées MCF-7, MCF-7 ras et BT-20, ainsi que par un blocage du cycle cellulaire en G2/M pour la lignée MDA-MB-231.
- P53 n'est pas impliquée dans l'inhibition de croissance induite par le NaB dans les lignées cancéreuses de sein. En revanche, P21^{waf1} est responsable de l'apoptose induite par le NaB dans la lignée MCF-7.
- L'induction de l'apoptose par le NaB dans la lignée MCF-7 implique la voie de signalisation du récepteur de mort Fas. Par ailleurs, les cotraitements de NaB et de TNF-alpha, TRAIL ou d'un anticorps agoniste anti-Fas potentialisent l'apoptose induite par le NaB. Cette action synergique implique également P21^{waf1}.
- Les cellules épithéliales mammaires normales sont bloquées en G1 mais ne sont pas induites en apoptose ni par le NaB seul ni par un cotraitement de NaB et de TNF-alpha, TRAIL ou d'un anticorps agoniste anti-Fas.

I Inhibition de la croissance des cellules cancéreuses par le NaB

1.1 Inhibition de la prolifération et induction de l'apoptose par le NaB

Dans ce travail, nous avons tout d'abord déterminé l'effet du NaB sur la croissance des lignées cancéreuses de sein dans différentes conditions de culture : monocouche, gel de collagène et agar mou (Article 1). La culture en monocouche ne reflète pas l'environnement physiologique dans lequel se trouve normalement la cellule. De manière à tenir compte de ce paramètre, les lignées ont été testées en gel de collagène. De plus, l'utilisation de l'agar mou permet d'évaluer la capacité de croissance de la cellule en absence d'ancrage. Les résultats démontrent que le NaB inhibe la croissance des cellules cancéreuses de sein, et ce quelles que

soient les conditions de culture. Par ailleurs, ces données indiquent que le NaB inhibe la croissance des lignées hormono-sensibles (MCF-7, MCF-7ras et T47-D), tout comme celle de lignées hormono-insensibles (BT-20 et MDA-MB-231). Ainsi, le NaB pourrait agir sur des cellules cancéreuses de sein représentatives plutôt de stades précoces (hormono-sensibles) tout comme de stades tardifs (hormono-insensibles) du développement tumoral.

Le cancer du sein est caractérisé par une grande hétérogénéité des populations cellulaires, c'est pourquoi nous avons utilisé ici 5 lignées cancéreuses de sein présentant des caractéristiques différentes. Nos résultats montrent que le NaB inhibe la croissance de toutes les lignées cancéreuses de sein testées. Il provoque un arrêt du cycle en G1 et une induction de l'apoptose des lignées MCF-7, MCF-7ras, T47-D et BT-20 ; et un blocage du cycle cellulaire en G2/M dans les cellules MDA-MB-231. Ces blocages diffèrent selon les cellules, perdurent, et ne sont pas signe d'une augmentation transitoire du nombre de cellules dans une des phases du cycle. Ainsi, des résultats similaires sont observés après 72 h de traitement par le NaB (données non montrées). Nos résultats sont en accord avec d'autres travaux effectués sur les cellules cancéreuses de sein. Planchon (Planchon et al., 1991) et Guilbaud (Guilbaud et al., 1990) ont démontré que le NaB induit un arrêt en G1 dans les cellules MCF-7. De plus, dans ces cellules, l'inhibition de la prolifération par le NaB est associée à une augmentation de P21^{waf1} et une répression de l'expression de la Cycline D (Davis et al., 2000). Par ailleurs, il a été reporté que le NaB induit un blocage en G2/M dans les cellules MDA-MB-231 suite à une surexpression de P21^{waf1} et à une inhibition de l'expression des Cyclines A et B (Lallemand et al., 1999).

1.2 Les ligands des récepteurs de mort potentialisent l'apoptose induite par le NaB

Les ligands des récepteurs de mort constituent une famille comprenant le « Tumor-Necrosis Factor » (TNF), le « TNF-related apoptosis ligand » (TRAIL) et Fas L. Dans la plupart des cas, l'activation des récepteurs de mort par leur ligand induit l'apoptose des cellules tumorales mais pas des cellules normales. De plus, le cotraitement par des agents antitumoraux et des ligands des récepteurs de mort permet de sensibiliser les cellules cancéreuses résistantes à un seul traitement. Ces ligands permettent également de potentialiser l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques et des radiations (Marini and Belka, 2003 ; Morgan et al., 2002). Les cellules MCF-7 sont sensibles à l'apoptose induite par TNF-alpha, TRAIL et un anticorps anti-Fas agoniste (données non montrées). Nous avons

démontré que l'induction de l'apoptose par le NaB implique l'intervention du système Fas/FasL (Article 1). En effet, non seulement un anticorps anti-Fas neutralisant diminue très fortement l'apoptose induite par le NaB, mais encore cette apoptose est potentialisée par un anticorps anti-Fas agoniste. De plus, le NaB induit une augmentation de l'expression de Fas et de Fas L et une relocalisation de Fas du cytosol vers la membrane plasmique. Par ailleurs, l'apoptose induite par le NaB est potentialisée de manière importante par TNF-alpha, TRAIL et un anticorps anti-Fas agoniste (Article 3). Cette induction synergique de l'apoptose est obtenue en utilisant des doses de NaB (1mM) et de ligand des récepteurs de mort (TNF-alpha et TRAIL : 0,1ng/ml ; anti-Fas agoniste : 0,5 µg/ml) qui seules n'induisent que peu voire pas d'apoptose.

II Mécanismes moléculaires à l'origine des effets du NaB

II.1 P53 n'est pas impliquée dans l'inhibition de croissance induite par le NaB

La phosphoprotéine P53 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose. Suite à un traitement au NaB, P53 est augmentée dans les lignées MCF-7, MCF-7ras et T-47D. Néanmoins, des transfections transitoires de plasmides p53 sens et antisens dans les cellules MCF-7 et T47-D et l'utilisation de la pifithrine-alpha, un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de P53, ne modifient ni la croissance ni l'apoptose induite par le NaB (Article 1). Par ailleurs, les travaux de Robert-Alain TOILLON menés au sein de notre laboratoire ont permis de confirmer que les lignées MCF-7 et T47-D possèdent bien une protéine P53 fonctionnelle. P53 est notamment impliquée dans l'apoptose de cellules cancéreuses de sein induite par du milieu conditionné de cellules épithéliales mammaires normales (Toillon et al., 2002). L'ensemble de ces résultats démontre donc que P53 n'est pas impliquée dans l'inhibition de la croissance induite par le NaB. Ces données sont d'autant plus intéressantes que P53 est mutée dans 30 à 50 % des tumeurs primaires de sein (Ziyaie et al., 2000).

II.2 P21^{waf1} est responsable de l'apoptose induite par le NaB

P21^{waf1} et NaB

Le NaB est un inhibiteur d'histone déacétylase (HDAC) menant à l'hyperacétylation de protéines histones et non-histones, et à des altérations de l'expression des gènes. Néanmoins, les effets des inhibiteurs de HDAC sur l'expression des gènes sont relativement sélectifs et impliquent l'activation de la transcription de certains gènes tels que P21^{waf1} et la répression d'autres gènes. Dans les lignées MCF-7, MCF-7 ras, T47-D et BT-20, l'analyse en Western blot indique que le NaB augmente le niveau de P21^{waf1}. P21^{waf1} a été initialement découvert comme un inhibiteur de la prolifération. Il a été largement décrit que la partie N-terminale de P21^{waf1} peut interagir avec le complexe Cycline/CDK et donc induire un arrêt du cycle cellulaire lors des phases G1, G2/M voire S. Le fait que P21^{waf1} soit responsable de l'inhibition de la croissance induite par des drogues a été reporté dans de nombreux cas. Ainsi, dans des cellules de carcinomes de la peau, l'arrêt en G1 et le blocage partiel en G2/M induit par un inhibiteur de l'EGF-R, le Gefitinib (Iressa ; ZD1839), est dû à l'action de P21^{waf1} (Di Gennaro et al., 2003). De même, l'interferon-alpha a été décrit comme inhibant l'activité de la kinase CDK3 par l'intermédiaire de P21^{waf1}. Ce phénomène est alors corrélé à un accroissement du nombre de cellules de tumeurs neuroendocriniennes en phase S (Zhou et al., 2002). Enfin, l'inhibiteur de la cyclooxygénase-2 (NS-398) induit la surexpression de P21^{waf1} provoquant un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 (Toyoshima et al., 2002). Par ailleurs, il a été décrit que la partie C-terminale de P21^{waf1} peut également s'associer avec PCNA et inhiber ainsi la réplication de l'ADN (Waga and Stillman, 1998). Nous avons montré que l'inhibition de la prolifération par le NaB est principalement due à la liaison de P21^{waf1} avec le complexe Cycline/CDK et non avec PCNA (Article 2). Cependant, la transfection d'un plasmide p21 antisens n'abolit pas le blocage du cycle. Ces données suggèrent dans notre cas que P21^{waf1} n'est pas indispensable à l'inhibition de la prolifération et que le NaB serait capable de moduler d'autres inhibiteurs de CDK tels que P27^{kip1} et P16^{ink4} (comme nous l'avons détaillé dans le 2^{ème} article). Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Vaziri qui montrent que le NaB est capable d'induire un arrêt en G1 dans des fibroblastes de souris p21^{-/-} en inhibant l'expression de la Cycline D et la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Vaziri et al., 1998).

En plus de ses fonctions d'inhibition du cycle cellulaire, P21^{waf1} a été décrit comme un modulateur du processus apoptotique. Néanmoins, les propriétés pro- ou anti-apoptotiques de P21^{waf1} semblent dépendre à la fois du contexte cellulaire et de l'inducteur utilisé. La diminution de l'expression de P21^{waf1} dans des cellules de carcinomes hépatiques induit une sensibilisation à l'apoptose induite par l'interféron-gamma (Detjen et al., 2003). De plus, la suppression de P21^{waf1} par transfection ou recombinaison dans des cellules de gliomes ou de carcinomes du colon accroît l'apoptose induite par des drogues cytotoxiques ou des rayons gamma (Tian et al., 2000 ; Mahyar-Roemer and Roemer, 2001 ; Han et al., 2002). P21^{waf1} peut également se complexer à la procaspase 3 pour inhiber l'apoptose induite par Fas (Suzuki et al., 2000). Enfin, dans les cellules apoptotiques, P21^{waf1} est clivée par la caspase 3 (Zhang et al., 1999 ; Xiang et al., 2002). Dans toutes ces situations, P21^{waf1} inhibe l'apoptose.

Cependant, dans d'autres situations, P21^{waf1} a été décrit comme induisant l'apoptose dans des cellules présentant une protéine P53 non fonctionnelle. Dans ce cadre, le traitement à l'acide rétinoïque de cellules de cancers intestinaux (H1299) ou colorectaux (DLC-1) infectées par un adénovirus contenant p21^{waf1} et présentant une protéine P53 non fonctionnelle induit l'apoptose de ces cellules (Teraishi et al., 2003). De plus, l'inhibiteur du protéasome Velcade (PS-341) induit l'apoptose de cellules leucémiques dépourvues de p53, cette induction de l'apoptose est associée à une accumulation de P21^{waf1} (An et al., 2000). Par ailleurs, des adénovirus permettant de mimer une activation de p21^{waf1} dépendante ou non de p53 ont été utilisés dans des cellules cancéreuses d'ovaire (2774qw1) ou de carcinomes de l'endomètre (SPEC-2). Ces deux types de cellules présentent un gène p53 muté. Les travaux ont permis de démontrer que P21^{waf1} induit l'apoptose, et ce bien que P53 semble être un inducteur plus efficace (Wu et al., 2002 ; Ramondetta et al., 2000). Lors de l'apoptose induite par P21^{waf1}, aucune activation des gènes bax et bcl-2 n'est détectée tandis qu'une différence d'expression significative de ces gènes précède l'induction de l'apoptose par P53. Ces résultats suggèrent que P21^{waf1} induit l'apoptose par un processus différent de celui de P53.

De plus, P21^{waf1} peut également jouer un rôle pro-apoptotique dans des cellules possédant une protéine P53 fonctionnelle. Ainsi, Huo (Huo et al., 2003) montre notamment que l'induction de P21^{waf1} indépendamment de celle de P53 induit une activation des caspases dans les cellules sécrétant de l'insuline. Le traitement par la manumycine de cellules cancéreuses de la thyroïde présentant une protéine P53 fonctionnelle induit l'apoptose de manière concomitante à une augmentation de l'expression de P21^{waf1}. Les travaux d'Agrawal (Agrawal et al., 2002) ont également démontré que le 7-ketocholesterol induit l'apoptose par

l'intermédiaire de P21^{waf1} que ce soit dans des fibroblastes embryonnaires de souris p53^{+/+} ou ^{-/-}. En accord avec ces données, nous avons montré que l'induction de l'apoptose par le NaB est sous le contrôle de P21^{waf1}.

P21^{waf1} et cotraitement

Nous avons montré que le NaB induit l'apoptose en régulant de manière positive des éléments clefs impliqués à différents niveaux des voies de signalisation des récepteurs de mort. Le NaB augmente l'expression des récepteurs de mort (TNF-R1, TRAIL-R1 et R2 et Fas), de l'adaptateur FADD et de la protéine pro-apoptotique Bid. L'ensemble de ces modifications induit au niveau de la mitochondrie un relargage du cytochrome c vers le cytosol. Cependant jusqu'à présent, les données expérimentales montrent que l'induction synergique de l'apoptose par des agents anti-tumoraux et des ligands des récepteurs de mort est principalement due à une régulation positive des récepteurs de mort associée à une suractivation des caspases. Peu d'éléments sont connus au niveau de l'implication d'autres protéines régulant le processus apoptotique telles que P21^{waf1}. Il a été décrit que l'apoptose induite par un traitement combiné de NaB et de Phorbol Myristate Acetate (PMA) est médié *via* la signalisation de TNF-alpha. De plus, l'induction de l'apoptose est associée à une surexpression de P21^{waf1} (Rahmani et al., 2002). Par ailleurs, Bonotte (Bonotte et al., 1998) et Hara (Hara et al., 2000) ont montré que le NaB sensibilise des cellules cancéreuses de colon et de rein à l'apoptose induite par Fas sans pour autant expliquer le mécanisme d'action de cette potentialisation.

Nous avons démontré ici pour la première fois que le niveau d'expression de P21^{waf1} est fortement augmenté par le cotraitement et que l'induction synergique de l'apoptose est sous le contrôle de P21^{waf1}. Par ailleurs, l'analyse en microscopie confocale révèle que la transfection transitoire de p21 antisens et p21 PCNA- inhibe le relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. Ces données suggèrent que P21^{waf1} interviendrait en amont de la libération de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie. De manière générale, P21^{waf1} a été montré comme se liant avec des protéines régulant la transcription telles que E2F et c-Myc (Dotto, 2000). Une hypothèse expliquant la potentialisation de l'apoptose serait que P21^{waf1} induirait, en s'associant à des facteurs de transcription, des modifications au niveau de l'expression d'éléments impliqués dans le processus apoptotique. Par ailleurs, P21^{waf1} est également capable de s'associer à des protéines de stress telles ASK1 (MEKK5). ASK1 est

activée en réponse à des stress cytotoxiques tels que les réactifs oxygénés, TNF et Fas. Suite à ces stimuli, ASK1 active la voie JNK/p38 et induit l'apoptose (Tobiome et al., 2001). P21^{waf1} est capable de se lier à ASK1 et d'inhiber l'activité catalytique intrinsèque de cette kinase, P21^{waf1} bloque également la phosphorylation et l'activation de ASK1 par la kinase MKK4 en amont (Shim et al., 1996). Ces données suggèrent que la relocalisation de P21^{waf1} vers le noyau diminuerait la quantité de P21^{waf1} cytoplasmique, ce qui entraînerait une levée de l'inhibition de ASK1 par P21^{waf1}. ASK1 serait alors libre d'exercer son activité pro-apoptotique. Le fait que ASK1 soit également activée suite à l'activation de TNF-R et de Fas pourrait expliquer la synergie d'induction de l'apoptose observée lors du cotraitement de NaB et de ligands des récepteurs de mort (Figure 26).

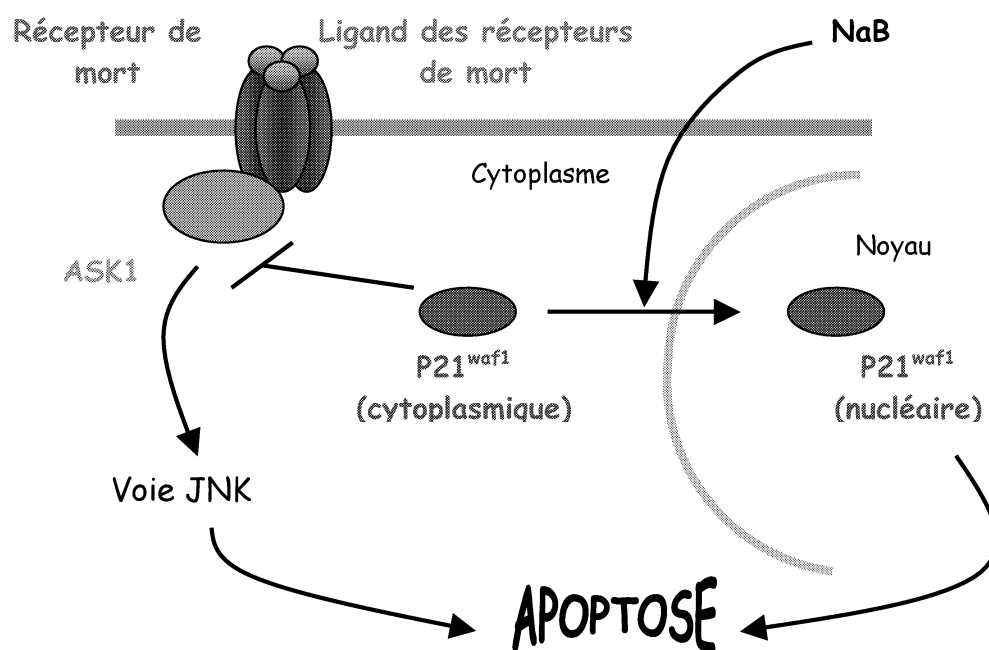


Figure 26 : Interconnexion possible entre les molécules cibles du NaB et la voie de signalisation des récepteurs de mort.

Interaction P21^{waf1}/PCNA

De manière intéressante, nos résultats montrent que l'apoptose induite par le NaB requiert non seulement la présence de P21^{waf1} mais également son interaction avec PCNA (Article 2). De même que pour le NaB seul, l'apoptose induite par le cotraitement est dépendante de l'interaction de P21^{waf1} avec PCNA (Article 3). PCNA ne présente pas d'activité enzymatique endogène mais forme une sorte de « plate-forme » favorisant

l'interaction de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, la transition G1/S, et la réplication. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer nos résultats. Tout d'abord, P21^{waf1} pourrait par l'intermédiaire de sa liaison avec PCNA réguler directement la machinerie de réparation de l'ADN. Cependant, le fait que à la fois P21^{waf1} et PCNA interagissent tout deux avec de nombreuses protéines suggère que cette association induirait une compétition au niveau de la liaison avec d'autres partenaires responsables de l'induction de l'apoptose. Ainsi, nous avons montré que le NaB augmente l'interaction de P21^{waf1} avec PCNA mais diminue l'expression de PCNA, ce qui entraîne une réduction de la proportion de PCNA « libre » (accessible à d'autres protéines) dans la cellule. Néanmoins, l'implication exacte (directe ou indirecte) de PCNA et de sa liaison à P21^{waf1} dans le processus apoptotique reste encore à élucider. Dans ce but, la détection de modifications éventuelles de la liaison de protéines à P21^{waf1} et à PCNA sous l'effet du NaB et l'identification de ces protéines constituent un point important à étudier. Pour cela, des immunoprécipitations de P21^{waf1} puis de PCNA (et inversement) sont actuellement réalisées après traitement de cellules MCF-7 par le NaB. Les complexes sont alors soumis à une électrophorèse et une coloration au bleu colloïdal. Les protéines subissant des modifications seront excisées, soumises à une digestion trypsique, puis passées en spectrométrie de masses. L'obtention d'une micro-séquence et de la masse relative des différents fragments tryptiques obtenus permettra, par comparaison à des banques de données, d'identifier la protéine. Par ailleurs, il serait également intéressant de réaliser des transfections transitoires d'un plasmide contenant PCNA afin d'évaluer l'implication directe ou non de cette protéine.

II.3 P21^{waf1} : un acteur pro- ou anti-apoptotique

Les travaux de Asada (Asada et al., 1999) ont montré que l'expression d'un P21^{waf1} ne possédant pas de signal de localisation nucléaire induit une augmentation de P21^{waf1} cytoplasmique, et ce en association avec une diminution de l'induction de l'apoptose. De même Schepers (Schepers et al., 2003) a démontré que la localisation cytoplasmique de P21^{waf1} inhibe le processus apoptotique dans des monocytes. Par ailleurs, les travaux menés dans des myoblastes indiquent que l'apoptose induite par MyoD dépendrait de P21^{waf1} et plus particulièrement de sa relocalisation au niveau du noyau (Peschiaroli et al., 2002). Nous avons montré que, dans les cellules cancéreuses de sein MCF-7, le NaB augmente l'expression de P21^{waf1} nucléaire et induit une augmentation de l'interaction de P21^{waf1} avec PCNA. L'ensemble de ces données suggère que la localisation de P21^{waf1} au sein de la cellule joue un

rôle primordial en vue de l'orientation vers un processus pro- ou anti-apoptotique. Ainsi, P21^{waf1} au niveau du cytoplasme présenterait un rôle plutôt anti-apoptotique tandis que, au niveau du noyau, il jouerait un rôle plutôt pro-apoptotique. Par ailleurs, ces résultats suggèrent qu'à travers des mécanismes communs, P21^{waf1} présente une action pro- ou anti-apoptotique dépendante également du contexte cellulaire. Ainsi, des travaux récents indiquent que l'apoptose des cellules tumorales est affectée différemment par la déficience de P21^{waf1} dans des souris transgéniques surexprimant ras ou myc (Bearss et al., 2002). Les tumeurs p21^{-/-}MMTV-ras sont caractérisées par une augmentation significative de l'apoptose comparée aux tumeurs MMTV-ras. A l'inverse, l'absence de p21^{waf1} n'affecte pas l'apoptose des tumeurs MMTV-myc. L'expression de différents oncogènes influencerait donc les effets de P21^{waf1} sur l'induction de l'apoptose. Des microarrays d'ADN complémentaires ont révélé que P21^{waf1} active des gènes pro- et anti-apoptotiques (Chang et al., 2000). Ainsi, P21^{waf1} présente un double rôle dans la tumorigénèse en agissant à la fois en tant qu'oncogène ou en tant que gène suppresseur de tumeurs selon le contexte génétique spécifique de chaque cellule (Figure 27).

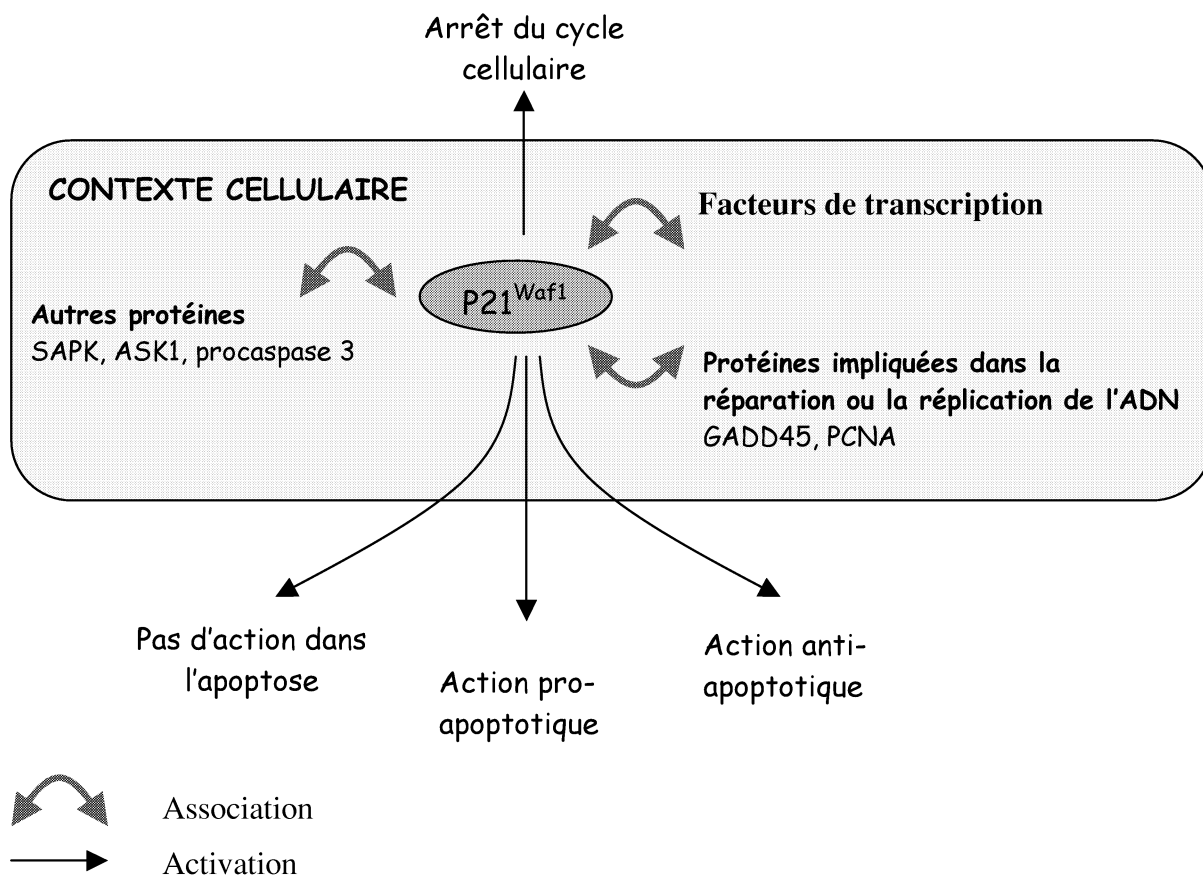


Figure 27 : Différents rôles de P21^{waf1}. P21^{waf1} est un régulateur négatif du cycle cellulaire. P21^{waf1} est également capable de réguler l'apoptose en fonction du type de cellule et du contexte cellulaire.

II.4 Vers une utilisation de P21^{waf1} en thérapie ?

Récemment, l'expression et la signification pronostique de P21^{waf1} associée à celle de P53 a été évaluée dans des cas de cancers du sein invasifs (Pellikainen et al., 2003). Les données montrent que les tumeurs P21^{waf1}-positives sont également le plus souvent p53-positives. Par ailleurs, chez des patientes post-ménopausées présentant des métastases ganglionnaires et des tumeurs exprimant les récepteurs aux oestrogènes et à la progestérone, de hauts taux d'expression de P21^{waf1} sont associés à une réponse favorable au traitement adjuvant hormonal (anti-oestrogènes). Néanmoins, l'expression de P21^{waf1} n'a pas présenté jusqu'ici de valeur pronostique face à la survie ou la possibilité de rechute dans les cancers du sein, que ce soit chez des patients présentant ou non des atteintes ganglionnaires. Le rôle de P21^{waf1} dans les cellules cancéreuses apparaît ainsi complexe. Cependant, il devient de plus en plus clair que l'altération de l'expression de P21^{waf1} en réponse à des agents thérapeutiques présente un intérêt certain dans le domaine de la lutte contre le cancer. L'inhibition du processus tumoral par une augmentation ou une répression de l'expression de p21^{waf1} sera donc fonction du type de cellule. Dans ce but, il est possible d'espérer développer des molécules ciblant P21^{waf1} ou d'utiliser des techniques de transfert de gènes de manière à inhiber le processus tumoral dans des conditions bien définies (Carnero, 2002).

III Intérêt du NaB en vue d'une application thérapeutique potentielle

Depuis quelques années, la découverte et l'étude des événements moléculaires impliqués dans l'apparition et le développement tumoral permet de mettre en place des thérapies efficaces dans la lutte contre le cancer. Ainsi les altérations présentes dans des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur contribuent au processus de cancérisation. Des travaux récents ont également démontré l'importance des enzymes responsables de l'acétylation de la chromatine dans l'initiation et la progression tumorale. Les histones acetyltransférases (HAT) et les histones déacetylases (HDAC) sont connues comme étant impliquées dans de multiples processus physiologiques tels que la transcription, la régulation du cycle cellulaire, la différenciation, la réplication de l'ADN, la réponse aux stress génotoxiques mais également dans la tumorigénèse. Dans ce cadre, les inhibiteurs d'HDAC notamment le NaB présentent un réel potentiel. Au niveau physiologique, le NaB permet à la fois d'induire l'apoptose dans des cellules tumorales tout en présentant une faible toxicité

dans l'organisme *in vivo*. Par ailleurs, le NaB et surtout ses dérivés plus stables tels que la tributyrine sont actuellement testés dans des études cliniques (Edelman et al., 2003). Les premiers résultats montrent que cette molécule est bien tolérée et des concentrations similaires à celles nécessaires à l'activité *in vitro* (0,1 mM) sont obtenues par trois prises orales par jour (200 mg/kg).

Nous avons montré que le NaB seul ou en cotraitement avec des ligands des récepteurs de mort inhibe la croissance et induit de manière importante l'apoptose des différentes lignées de cellules cancéreuses de sein. Ces données sont d'autant plus intéressantes que le NaB seul ou en cotraitement avec TNF-alpha, TRAIL et un anticorps anti-Fas agoniste n'induit pas l'apoptose des cellules épithéliales mammaires normales (CEMN). Dans le but de vérifier si la synergie importante observée dans les cellules cancéreuses de sein *in vitro* peut contribuer à freiner le développement tumoral *in vivo*, nous étudions actuellement plus particulièrement l'effet combiné de la tributyrine et de TRAIL chez la souris nude. TRAIL est une cytokine ayant déjà été testée dans des modèles murins et primates sans présenter de cytotoxicité pour l'organisme. Ce travail consiste à injecter des cellules MCF-7 par voie sous-cutanée et à étudier l'évolution de la taille des tumeurs dans des souris, soumises ou non à un traitement oral de tributyrine, avec ou sans injection de TRAIL.

En conclusion, nous avons montré que l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses de sein par le NaB, seul ou en combinaison avec des ligands des récepteurs de mort, est sous le contrôle P21^{waf1}. Cependant, une meilleure compréhension au niveau moléculaire du mécanisme d'action du NaB et le test *in vivo* de l'efficacité des cotraitements de NaB et de TRAIL dans l'inhibition du développement tumoral devraient contribuer à ouvrir de nouvelles perspectives de traitement dans la lutte contre le cancer du sein.

BIBLIOGRAPHIE

Agrawal S, Agarwal ML, Chatterjee-Kishore M, Stark GR and Chisolm GM. Stat1-dependent, p53-independent expression of p21(waf1) modulates oxysterol-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 1981-92.

Ambrosini G, Addida C and Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature Med* 1997 ; 3 : 917-21.

An WG, Hwang SG, Trepel JB and Blagosklonny MV. Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition. *Leukemia* 2000 ; 14 : 1276-83.

Antonsson B and Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000 ; 256 : 50-7.

Archer SY and Hodin RA. Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 1999 ; 9 : 171-4.

Asada M, Yamada T, Ichijo H, Delia D, Miyazono K, Fukumuro K and Mizutani S. Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *EMBO J* 1999 ; 18 : 1223-34.

Asgari K, Sesterhenn IA, McLeod DG, Cowan K, Moul JW, Seth P and Srivastava S. Inhibition of the growth of pre-established subcutaneous tumor nodules of human prostate cancer cells by single injection of the recombinant adenovirus p53 expression vector. *Int J Cancer* 1997 ; 71 : 377-82.

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokh Z and Schwall RH. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest* 1999 ; 104 : 155-62.

Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature* 2002 ; 2 : 420-30.

Bachmann F, Buechner SA, Wernli M, Strebel S and Erb P. Ultraviolet light downregulates CD95 ligand and TRAIL receptor expression facilitating actinic keratosis and squamous cell carcinoma formation. *J Invest Dermatol* 2001; 117 : 59-66.

Barnhart BC, Alappat EC and Peter ME. The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 2003 ; 15 : 185-93.

Barnhart BC and Peter ME. The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell* 2003 ; 114 : 148-50.

Basu S and Kolesnick R. Stress signal for apoptosis : ceramide and c-jun kinase. *Oncogene* 1998 ; 17 : 3277-85.

Bearss DJ, Lee RJ, Troyer DA, Pestell RG and Windle JJ. Differential effects of p21(WAF1/CIP1) deficiency on MMTV-ras and MMTV-myc mammary tumor properties. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 2077-84.

Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R and Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998 ; 282 : 290-3.

Boffa LC, Gruss RJ and Allfrey VG. Manifold effects of sodium butyrate on nuclear function. Selective and reversible inhibition of phosphorylation of histone H1 and H2A and impaired methylation of lysine and arginine residues in nuclear protein fractions. *J Biol Chem* 1981 ; 256 : 9612-21.

Boffa LC, Lupton JR, Mariani MR, Ceppi M, Newmark HL, Scalmati A and Lipkin M. Modulation of colonic epithelial cell proliferation, histone acetylation, and luminal short fatty acids by variation of dietary fiber (wheat bran) in rats. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 5906-12.

Bonnotte B, Favre N, Reveneau S, Micheau O, Droin N, Garrido C, Fontana A, Chauffert B, Solary E and Martin F. Cancer cell sensitization to fas-mediated apoptosis by sodium butyrate. *Cell Death Differ* 1998 ; 5 : 480-7.

Brazier M, Desmet G, Pieri F and Daniel P. A rapid, simple and sensitive gas chromatographic micromethod for the quantitation of butyric acid and other short-chain fatty acids in serum. *Clin Chim Acta* 1985 ; 148 : 261-5.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X and Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cel Biol* 1999 ; 15 : 269-90.

Butler LM, Hewett PJ, Butler WJ and Cowled PA. Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement. *Br J Cancer* 1998 ; 77 : 1454-9.

Caelles C, Helmberg A and Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-targeted genes. *Nature* 1994 ; 370 : 220-3.

Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*. 1994 ; 370 : 220-3.

Candé C, Cohen I, Daugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N and Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF) : a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 2002 ; 84 : 215-22.

Cappellini DM, Graziadei G, Ciceri L, Comino A, Bianchi P, Porcella A and Fiorelli G. Oral isobutyramide therapy in patients with thalassemia intermedia : results of a phase II open study. *Bloods Cells Mol Dis* 2000 ; 26 : 105-11.

Carducci MA, Gilbert J, Bowling MK, Noe D, Eisenberger MA, Sinibaldi V, Zabelina Y, Chen TI, Grochow LB and Donehower RC. A phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 3047-55.

Carnero A. Targeting the cell cycle for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002 ; 87 : 129-33.

Carter BZ, Milella M, Tsao T, McQueen T, Schober WD, Hu W, Dean NM, Steelman L, McCubrey JA and Andreeff M. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2003 ; 17 : 2081-9.

Chan FKM, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL and Leonardo MJ. A domain in TNF receptors that is mediates ligand-independant receptor assembly and signaling. *Science* 2000 ; 288 : 2351-4.

Chang HY, Nishitoh H, Yang X, Ichijo H and Baltimore D. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 1998 ; 281 : 1860-3.

Chang BD, Watanabe K, Broude EV, Fang J, Poole JC, Kalinichenko TV and Roninson IB. Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97 : 4291-6.

Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME and Yang X. c-FLIP_L is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD-95 mediated apoptosis. *Embo J* 2002 ; 21 : 3704-14.

Chen G and Goeddel DV. TNF-R1 signaling : a beautiful pathway. *Science* 2002 ; 296 : 1634-35.

Chen Z, Clark S, Birkeland M, Sung CM, Lago A, Liu R, Kirkpatrick R, Johanson K, Winkler JD and Hu E. Induction and superinduction of growth arrest and DNA damage gene 45 (GADD45) α and β messenger RNAs by histone deacetylase inhibitors trichostatin A (TSA) and butyrate in SW620 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2002 ; 188 : 127-40.

Chiang CW, Harris G, Ellig C, Masters SC, Subramanian R, Shenolikar S, Wadzinski BE, Yang E. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 2001 ; 97 : 1289-97

Chuntharapai A, Dodge K, Grimmer K, Schroeder K, Marsters SA, Koeppen H, Ashkenazi A and Kim KJ. Isotype-dependent inhibition of tumor growth in vivo by monoclonal antibodies to death receptor 4. *J Immunol* 2001 ; 166 : 4891-8.

Cohen GM, Sun XM, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown DG, Snowden RT and Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 1994 ; 153 : 507-16.

Conley BA, Egorin MJ, Tait N, Rosen DM, Sausville EA, Dover G, Fram RJ and Van Echo DA. Phase I study of the orally administered butyrate prodrug tributyrin, in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 1998 ; 4 : 629-34.

Couzinet A, Hérines Z and Hueber AO. Régulation de la mort programmée : vers une conception dynamique. *Médecine et Sciences* 2002 ; 18 : 841-52.

Dai Y, Rahmani M and Grant S. An Intact NF-kappaB Pathway is Required for Histone Deacetylase Inhibitor-Induced G1 Arrest and Maturation in U937 Human Myeloid Leukemia Cells. *Cell Cycle* 2003 ; 2 : 467-72.

Daniel DC. Highlight: BRCA1 and BRCA2 proteins in breast cancer. *Microsc Res Tech* 2002 ; 59 : 68-83.

Daniel P, Brazier M, Cerutti I, Pieri F, Tardi-Vel I, Desmet G, Baillet J and Chany C. Pharmacokinetic study of butyric acid administered in vivo as sodium and arginine butyrate salts. *Clin Chim Acta* 1989 ; 181 : 255-63.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y and Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997 ; 91 : 231-41.

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB and Greenberg ME. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000 ; 6 : 41-51.

Davis T, Kennedy C, Chiew YE, Clarke CL and DeFazio A. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation and modulate cell cycle expression in normal mammary epithelial cells. *Clin Canc Res* 2000 ; 6 : 4334-42.

Davis T, Kennedy C, Chiew YE, Clarke CL and deFazio A. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation and modulate cell cycle gene expression in normal mammary epithelial cells. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 :4334-42.

Deak JC, Cross JV, Lewis M, Qian Y, Parrott LA, Distelhorst CW and Templeton DJ. Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ; 95 :5595-600.

De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippo MR and Testi R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95-and ceramide-induced apoptosis. *Science* 1997 ; 277 : 1652-5.

DeFazio A, Chiew YE, Donoghue C, Lee CSL and Sutherland RL. Effect of sodium butyrate on oestrogen receptor and epidermal growth factor receptor gene expression in human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 18008-12.

Detjen KM, Murphy D, Welzel M, Farwig K, Wiedenmann B and Rosewicz S. Downregulation of p21(waf/cip-1) mediates apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in response to interferon-gamma. *Exp Cell Res* 2003 ; 282 : 78-89.

Devin A, Cook A, Lin Y, Rodriguez Y, Kelliher M and Liu Z. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* 2000 ; 12 : 419-29.

Di Gennaro E, Barbarino M, Bruzzese F, De Lorenzo S, Caraglia M, Abbruzzese A, Avallone A, Comella P, Caponigro F, Pepe S and Budillon A. Critical role of both p27KIP1 and p21CIP1/WAF1 in the antiproliferative effect of ZD1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in head and neck squamous carcinoma cells. *J Cell Physiol* 2003 ; 195 : 139-50.

Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova-Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H and Marynen P. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21)p6 associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999 ; 93 : 3601-9.

Dong-Le Bourhis X, Lambrecht V and Boilly B. Transforming growth factor β 1 and sodium butyrate differentially modulates urokinase plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in human breast normal and cancer cells. *Br J Cancer* 1998 ; 77 : 396-403.

Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000 ; 1471 : M43-56.

Droin N, Bichat F, Rebe C, Wotawa A, Sordet O, Hammann A, Bertrand R and Solary E. Involvement of caspase-2 long isoform in Fas-mediated cell death of human leukemic cells. *Blood* 2001 ; 97 : 1835-44.

Edelman MJ, Bauer K, Khanwani S, Tait N, Trepel J, Karp J, Nemieboka, Chung EJ and Van Echo DA. Clinical and pharmacological study of tributyrin : an oral butyrate prodrug. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003 ; 51 : 439-44.

El Yazidi I, Renaud F, Laurent M, Courtois Y and Boilly-Marer Y. Production and oestrogen regulation of FGF1 in normal and cancer breast cells. *Biochim Biophys Acta* 1998 ; 22: 127-40.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A and Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitors ICAD. *Nature* 1998 ; 391 : 43-50.

Espie E and Gorins A. Le sein. 1995. Eds Eska, Paris.

Fajkus J, Borsky M, Kunicka Z, Kovarikova M, Dvorakova D, Hofmanova J and Kozubik A. Changes in telomerase activity, expression and splicing in response to differentiation of normal and carcinoma colon cells. *Anticancer Res* 2003 ; 23 : 1605-12.

French LE and Tschopp J. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Diff* 2003 ; 10 : 117-23.

Galfi P, Neogrady Z and Csordas A. Apoptosis sensitivity is not correlated with sensitivity to proliferation inhibition by the histone deacetylase inhibitors butyrate and TSA. *Cancer Lett* 2002 ; 188 : 141-52.

Gasco M, Shami S and Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2002 ; 4 : 70-6.

Gilbert J, Baker SD, Bowlind MK, Grochow L, Figg WD, Zabelina Y, Donehower RC and Carducci MA. A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenulbutyrate in patients with refractory solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 2292-300.

Gleave ME, Sato N, Sadar M, Yago V, Bruchofsky N and Sullivan L. Butyrate analogue, isobutyramide, inhibits tumor growth and time to androgen-independent progression in the human prostate LNCaP tumor model. *J Cell Biochem* 1998 ; 69 : 271-81.

Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2001 a ; 276 : 20589-96.

Grassme H, Schwarz H, Gulbins E. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 b ; 284 : 1016-30.

Guilbaud NF, Gas N, Dupont MA and Valette A. Effects of differentiation-inducing agents on maturation of human MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol* 1990 ; 145 : 162-72.

Hajnoczky G, Davies E and Madesh M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 304 : 445-54.

Han Z, Wei W, Dunaway S, Darnowski JW, Calabresi P, Sedivy J, Hendrickson EA, Balan KV, Pantazis P and Wyche JH. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 17154-60.

Hansen RK and Bissell MJ. Tissue architecture and breast cancer : the role of extracellular matrix and steroid hormones. *Endocrine-Related Cancer* 2001 ; 7 : 95-113.

Hara I, Miyake H, Hara S, Arakawa S and Kamidono S. Sodium butyrate induces apoptosis in human renal cell carcinoma cells and synergistically enhances their sensitivity to anti-Fas-mediated cytotoxicity. *Int J Oncol* 2000 ; 17 : 1213-8.

Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K, Timmons CF, Tomlinson GE, Mastrangelo D, Hay RJ, Chaudhary PM and Gazdar AF. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 5897-901.

Harig JM, Ng EK, Dudeja PK, Brasitus TA and Ranaswamy K. Transport of n-butyrate into human colonic luminal membran vesicles. *Ann J Physiol* 1996 ; 271 : G415-22.

Hatano E and Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001 ; 281 : G1357-68

He Q, Lee DI, Rong R, Yu M, Luo X, Klein M, El-Deiry WS, Huang Y, Hussain A and Sheikh MS. Endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis is coupled with activation of the death receptor 5 pathway. *Oncogene* 2002 ; 21 : 2623-33.

Heerdt BG and Augenlicht LH. Effects of fatty acids on expression of genes encoding subunits of cytochrome c oxidase and cytochrome c oxidase activity in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *J Biol Chem* 1991 ; 266 : 19120-26.

Hill KA and Sommer SS. p53 as a mutagen test in breast cancer. *Environ Mol Mutagen* 2002 ; 39 : 216-27.

Hofer-Warbinek R, Schmid JA, Stehlik C, Binder BR, Lipp J and 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 : 22064-8.

Holcik M, Gibson H and Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001 ; 6 : 253-61.

Horwitz KB, Mockus MB and Lessey BA. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell* 1982 ; 28 : 633-42.

Hu WH, Johnson H and Shu HB. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-KB, JNK activation through distinct pathways. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 30603-10.

Huo JX, Metz SA and Li GD. p53-independent induction of p21(waf1/cip1) contributes to the activation of caspases in GTP-depletion-induced apoptosis of insulin-secreting cells. *Cell Death Differ* 2003 Sep 12 [Epub ahead of print].

Gagnon V, St-Germain ME, Parent S and Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 2003 ; 23 : 803-10.

Iacomino G, Tecce MF, Grimaldi C, Tosto M and Russo GL. Transcriptional response of a human colon adenocarcinoma cell line to sodium butyrate. *BBRC* 2001 ; 285 : 1280-89.

Ichikawa K, Liu W, Zhao L, Wang Z, Liu D, Ohtsuka T, Zhang H, Mountz JD, Koopman WJ, Kimberly RP and Zhou T. Tumoricidal activity of a novel anti-human DR5 monoclonal antibody without hepatocyte cytotoxicity. *Nat Med* 2001 ; 7 : 954-60.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2002 ; 2 : 277-88.

Ingvarsson S, Sigbjornsdottir BI, Huiping C, Hafsteinsdottir SH, Ragnarsson G, Barkardottir RB, Arason A, Egilsson V and Bergthorsson JT. Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers. *Breast Cancer Res* 2002 ; 4 : R4.

Ito N, Sawa H, Nagane M, Noguchi A, Hara M and Saito I. Inhibitory effects of sodium butyrate on proliferation and invasiveness of human glioma cells. *Neurosurgery* 2001 ; 49 : 430-7.

Jansen B, Schlagbauer-Wadl H, Brown BD, Bryan RN, van Elsas A, Muller M, Wolff K, Eichler HG and Pehamberger H. bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med.* 1998 ; 4 : 232-4.

Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K and Pehamberger H. Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 2000 ; 356 : 1728-33.

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

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH and Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated protein form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995 ; 14 : 5579-88.

Kischkel FC, Lawrence DA, Chuntharapai A, Schow P, Kim KJ and Ashkenazi A. APO2/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* 2000 ; 12 : 611-20.

Kitta K, Day RM, Ikeda T and Suzuki YJ. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001 ; 31 : 902-10.

Krajewski S, Blomqvist C, Franssila K, Krajewska M, Wasenius VM, Niskanen E, Nordling S and Reed JC. Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995 ; 55 : 4471-8.

Krämer OH, Göttlicher M and Heinzl T. Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab* 2001 ; 12 : 294-300.

Krueger A, Baumann S, Krammer PH and Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins : regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 8247-54.

Kruh J, Defer N and Tichonicky L. Molecular and cellular action of butyrate. *C R Seances Soc Biol Fil* 1992 ; 186 : 105-13.

Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* 1982 ; 42 : 65-82.

Lallemant F, Courilleau D, Buquet-Fagot C, Atfi A, Montagne MN and Mester J. Sodium butyrate induces G2 arrest in the human breast cancer cells MDA-MB-231 and renders them competent for DNA rereplication. *Exp Cell Res* 1999 ; 247 : 432-40.

Leist M and Jaattela M. Four death and a funeral : from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 589-98.

Longy M. Cowden disease and the PTEN gene: a successfully clinical and biological combined approach. *Bull Cancer* 2001 ; 88 : 1153-8.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE and Jacks T. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994 ; 266 : 807-10.

Lu A, Gupta A, Li C, Ahlborn TE, Ma Y, Shi EY and Liu J. Molecular mechanisms for aberrant expression of the human breast cancer specific gene 1 in breast cancer cells: control of transcription by DNA methylation and intronic sequences. *Oncogene* 2001 ; 20 : 5173-85.

Lucchi-Angellier E. Hormonothérapies et cancers du sein : mise au point. *Rev Med Interne* 2001 ; 22 : 1213-24.

Luciano L, Hass R, Busche R, Engelhardt W and Reale E. Withdrawal of butyrate from the colonic mucosa triggers « mass apoptosis » primarily in G0/G1 phase of the cell cycle. *Cell Tissue Res* 1996 ; 286 : 81-92.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998 ; 94 : 481-90.

MacFarlane M, Cohen GM and Dickens M. JNK (c-Jun N-terminale kinase) and p38 activation in receptor-mediated and chemically-induced apoptosis of T cells : differential requirements for caspase activation. *Biochem J* 2000 ; 348 : 93-101.

MacFarlane M. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology Letters* 2003 ; 139 : 89-97.

Macleod K. Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2000 ; 10 : 81-93.

Mahyar-Roemer M and Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 2001 ; 20 : 3387-98.

Malisan F and Testi R. Lipid signaling in CD95-mediated apoptosis. *FEBS Lett* 1999 ; 452 : 100-03.

Mandal M and Kumar R. Bcl-2 expression regulates sodium butyrate-induced apoptosis in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Growth Differ* 1996 ; 7 : 311-8.

Mannel DN and Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000 ; 74 : 141-61.

Marini P and Belka C. Death receptor ligands: new strategies for combined treatment with ionizing radiation. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2003 ; 3 : 334-42.

Martin SJ and Green DR. Protease activation during apoptosis : death by thousands cuts ? *Cell* 1995 ; 82 : 349-52.

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, Laface DM and Green DR. Early redistribution of phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus : inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995 ; 182 : 1545-56.

Marusawa H, Hijikata M, Watashi K, Chiba T and Shimotohno K. Regulation of Fas-mediated apoptosis by NF-kappaB activity in human hepatocyte derived cell lines. *Microbiol Immunol* 2001; 45 : 483-9.

May FEB and Westley BR. Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells. *Biomed Pharmacother* 1995 ; 49 : 400-14.

McCaffrey PG, Newsome DA, Fibach E, Yoshida M and Su MSS. Induction of γ -globin by histone deacetylase inhibitors. *Blood* 1997 ; 5 : 2075-83.

Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW and Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 981-90.

Micheau O and Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003 ; 114 : 181-90;

Mildner M, Eckhart L, Lengauer B and Tschachler E. Hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits UVB-induced apoptosis of human keratinocytes but not of keratinocyte-derived cell lines via the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 14146-52.

Miller AA, Kurschel E, Osieka R and Schmidt CG. Clinical pharmacology of sodium butyrate in patients with acute leukemia. *Eur J Cancer Clin Onco.* 1987 ; 23 : 1283-7.

Mitsiades CS, Treon SP, Mitsiades N, Shima Y, Richardson P, Schlossman R, Hideshima T and Anderson KC. TRAIL/Apo2L ligand selectively induces apoptosis and

overcome drug resistance in multiple myeloma : therapeutic applications. *Blood* 2001 ; 98 : 795-804.

Morgan M, Williams BA, Blay J and Hoskin DW. Chemosensitization of T-47D breast carcinoma cells to TRAIL and Fas receptor-induced killing. *Anticancer Res* 2002 ; 22 : 673-6.

Mueller CM and Scott DW. Distinct molecular mechanisms of Fas resistance in murine B lymphoma cells. *J Immunol* 2000 ; 165 : 1854-62.

Muschen M, Rajewsky K, Kronke M and Kuppers R. The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma. *Trends Immunol* 2002 ; 23 : 75-80.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T and Nagata S. Lethal effect of the anti-fas antibody in mice. *Nature* 1993 ; 364 : 806-9.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 ; 4 : 552-65.

Pace BS, Li Q and Stamatoyannopoulos G. In vivo search for butyrate responsive sequences using transgenic mice carrying γ gene promoter mutants. *Blood* 1996 ; 88 : 1079-83.

Paez J and Sellers WR. PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling. *Cancer Treat Res* 2003 ; 115 : 145-67.

Pellikainen MJ, Pekola TT, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ and Kosma VM. p21WAF1 expression in invasive breast cancer and its association with p53, AP-2, cell proliferation, and prognosis. *J Clin Pathol* 2003 ; 56 : 214-20.

Perrin P, Cassagnau E, Burg C, Patry Y, Vavasseur F, Harb J, Le Pendu J, Douillard JY, Galmiche JP, Bornet F and Meflah K. An interleukin sodium butyrate combination as immunotherapy for rat colon cancer peritoneal carcinomatosis. *Gastroenterology* 1994 ; 107 : 1697-708.

Perrine SP and Faller DV. Butyrate-induced reactivation of the fetal globin genes : a molecular treatment for the beta-hemoglobinopathies. *Experienta* 1993 ; 49 : 133-7.

Peschiaroli A, Figliola R, Coltella L, Strom A, Valentini A, D'Agnano I and Maione R. MyoD induces apoptosis in the absence of RB function through a p21(WAF1)-dependent re-localization of cyclin/cdk complexes to the nucleus. *Oncogene* 2002 ; 21 : 8114-27.

Pettus BJ, Chalfant CE and Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *BBA* 2002 ; 1585 : 114-25.

Planchon P, Raux H, Magnien V, Ronco G, Villa P, Crepin M and Brouty-Boye D. New stable butyrate derivatives alter proliferation and differentiation in human mammary cells. *Int J Cancer* 1991; 48 : 443-9.

Pollack IF, Erff M and Ashkenazi A. Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin Cancer Res* 2001 ; 7 : 1362-9.

Pouillart P, Cerutti I, Ronco G, Villa P and Chany C. Enhancement by stable butyrate derivatives of antitumor and antiviral actions of interferon. *Int J Cancer* 1992 ; 51 : 596-601.

Ragione FD, Criniti V, Pietra VD, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T and Zappia V. Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS* 2001 ; 499 : 199-204.

Rahmani M, Dai Y and Grant S. The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate interacts synergistically with phorbol myristate acetate (PMA) to induce mitochondrial damage and apoptosis in human myeloid leukemia cells through a tumor necrosis factor-alpha-mediated process. *Exp Cell Res* 2002 ; 277 : 31-47.

Ramondetta L, Mills GB, Burke TW and Wolf JK. Adenovirus-mediated expression of p53 or p21 in a papillary serous endometrial carcinoma cell line (SPEC-2) results in both growth inhibition and apoptotic cell death: potential application of gene therapy to endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 278-84.

Rensing-Ehl A, Frei K, Flury R, Matiba B, Mariani SM, Weller M, Aebischer P, Krammer PH and Fontana A. Local Fas/APO-1(CD95) ligand-mediated tumor cell killing in vivo. *Eur J Immunol* 1995 ; 25 : 2253-8.

Richter BW and Duckett CS. The IAP proteins: caspase inhibitors and beyond. *Sci STKE* 2000 ; 8 : PE1.

Rivero JA and Adunyah SE. Sodium butyrate induces tyrosine phosphorylation and activation of MAP kinase (ERK-1) in human K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 ; 224 : 796-801.

Rochefort H, Chalbos D, Cunat S, Lucas A, Platet N and Garcia M. Estrogen regulated proteases and metalloproteases in ovarian and breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001 ; 76 : 199-24.

Roediger WEW. The role of the anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut* 1980 ; 21 : 793-8.

Rosen EM, Fan S, Pestell RG and Goldberg ID. BRCA1 gene in breast cancer. *J Cell Physiol* 2003 ; 196 : 19-41.

Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bahr M, Ohgaki H, Ashkenazi A and Weller M. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 2759-65.

Ruppin H, Bar-Meirs S, Soergel KH, Wood CM and Schmitt MG. Absorption of short-chain fatty acids by the colon. *Gastroenterology* 1980 ; 78 : 1500-7.

Russo MP, Bennett BL, Manning AM, Brenner DA and Jobin C. Differential requirement for NF-kappaB-inducing kinase in the induction of NF-kappaB by IL-1beta, TNF-alpha, and Fas. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 ; 283 : C347-57.

Ryan KM, Philips AC and Vousden KH. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 2001 ; 13 : 332-7.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Manjeri MD and Venkatachalam MA. Apoptosis :definition,mechanisms and relevance to disease. *American J Med* 1999 ; 107 : 489-506.

Sakata T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine : a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. *Br J Nutr* 1987 ; 58 : 95-103.

Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiant G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T and Lu X. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 2001 ; 8 : 781-94.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH and Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998 ; 17 : 1675-87.

Schepers H, Geugien M, Eggen BJ and Vellenga E. Constitutive cytoplasmic localization of p21(Waf1/Cip1) affects the apoptotic process in monocytic leukaemia. *Leukemia* 2003 ; 14.

Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A d Tschopp J. Conversion of membrane-bound fas (CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med* 1998 ; 187 : 1203-13.

Schneider P, Thome M, Burns K, Bodmer JL, Hofmann K, Kataoka T, Holler N and Tschopp J. TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB. *Immunity* 1997 ; 7 : 831-6.

Shim J, Lee H, Park J, Kim H and Choi EJ. A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature* 1996 ; 381 : 804-6.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev* 2002 ; 2 : 210-19.

Siegel RM, Frederiksen JK, Zacharias DA, Chan FKM, Johnson M, Lynch D, Tsien RY and Leonardo MJ. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 2000 ; 288 : 2354-7.

Simpson L and Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001 ; 264 : 29-41.

Slee EA and Lu X. The ASPP family: deciding between life and death after DNA damage. *Toxicol Lett* 2003 ; 139 : 81-7.

Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW and Lowe SW. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 1999 ; 284 : 156-59.

Soengas MS, Capodici P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C and Lowe SW. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001 ; 409 : 207-11.

Souleimani A and Asselin C. Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. *FEBS Lett* 1993 ; 326 : 45-50.

Stevens A and Lowe J. Histologie. 1992. Eds Pradel/Edisem.

Suzuki A, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y and Akahane K. Procaspase 3/p21 complex formation to resist fas-mediated cell death is initiated as a result of the phosphorylation of p21 by protein kinase A. *Cell Death Differ* 2000 ; 7 :721-8.

Tabuchi Y, Arai Y, Kondo T, Takeguchi N and Asano S. Identification of genes responsive to sodium butyrate in colonic epithelial cells. *BBRC* 2002 ; 293 : 1287-94.

Takayuki U, Masakazu T and Takeshi T. Circulating soluble Fas concentration in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 3529-33.

Tan S, Seow TK, Liang RCMY, Koh S, Lee CPC, Chung MCM and Hooi SC. Proteome analysis of butyrate-treated human colon cancer cells (HT-29). *Int J Cancer* 2002 ; 98 : 523-31.

Teraishi F, Kadowaki Y, Tango Y, Kawashima T, Umeoka T, Kagawa S, Tanaka N and Fujiwara T. Ectopic p21^{sdi1} gene transfer induces retinoic acid receptor beta expression and sensitizes human cancer cells to retinoid treatment. *Int J Cancer* 2003 ; 103 : 833-9.

Terao Y, Nishida J, Horiuchi S, Rong F, Ueoka Y, Matsuda T, Kato H, Furugen Y, Yoshida K, Kato K and Wake N. Sodium butyrate induces growth arrest and senescence-like phenotypes in gynecologic cancer cells. *Int J Cancer* 2001 ; 94 : 257-67.

Thornberry NA and Lazbenik Y. Caspases : enemies within. *Science* 1998 ; 281 : 1312-6.

Tian H, Wittmack EK and Jorgensen TJ. p21^{WAF1/CIP1} antisense therapy radiosensitizes human colon cancer by converting growth arrest to apoptosis. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 679-84.

Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T and Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001 ; 2 : 222-8.

Toillon RA, Chopin V, Jouy N, Fauquette W, Boilly B and Le Bourhis X. Normal breast epithelial cells induce p53-dependent apoptosis and p53-independent cell cycle arrest of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2002 ; 71 : 269-80.

Toyoshima T, Kamijo R, Takizawa K, Sumitani K, Ito D and Nagumo M. Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br J Cancer* 2002 ; 86 : 1150-6.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM and Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989 ; 245 : 301-5.

Tsihlias J, Kapusta L and Slingerland J. The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* 1999 ; 50 : 401-23.

Tsubaki J, Choi WK, Ingermann AR, Twigg SM, Kim HS, Rosenfeld RG and Oh Y. Effects of sodium butyrate on expression of members of the IGF-binding protein superfamily in human mammary epithelial cells. *J Endocrinol* 2001 ; 169 : 97-110.

Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E and Croce CM. Involvement of the BCL-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985 ; 228 : 1440-43.

Van Loo G, Saelens X, van Gurp M, MacFarlane M, Martin SJ and Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 2002 ; 9 : 1031-42.

Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003 ; 21 : 313-20.

Vaziri C, Stice L and Faller DV. Butyrate-induced G1 arrest results from p21-independent disruption of retinoblastoma protein-mediated signals. *Cell Growth Differ* 1998 ; 9 : 465-74.

Velazquez M, Maldonado V and Melendez-Zajgla J. Cisplatin-induced apoptosis of HeLa cells. Effect of RNA and protein synthesis inhibitors, Ca²⁺ chelators and zinc. *J Exp Clin Cancer Res* 1998 ; 17 : 277-84.

Villunger A, Huang DC, Holler N, Tschopp J and Strasser A. Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, and Fas-mediated cell death does not involve DAXX, RIP, or RAIDD. *J Immunol* 2000 ; 165 : 1337-43.

Vogt C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Solothurn* 1842.

Waga S and Stillman B. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol Cell Biol* 1998 ; 18 : 4177-87.

Wargovich MJ and Levin B. Grist for the mill : role of cereal fiber and calcium in prevention of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996 ; 88 : 67-9.

Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F and Cotter FE. Phase I clinical and pharmacokinetic study of BCL-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2000 ; 18 : 1812-23.

Widschwendter M and Jones PA. DNA methylation and breast carcinogenesis. *Oncogene* 2002 ; 21 : 5462-82.

Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C and Smith CA. Identification and characterisation of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995 ; 3 : 673-82.

Wu Q, Kirschmeier P, Hockenberry T, Yang TY, Brassard DL, Wang L, McClanahan T, Black S, Rizzi G, Musco ML, Mirza A and Liu S. Transcriptional regulation during p21WAF1/CIP1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 36329-37.

Wyllie AH and Golstein P. More than one way to go. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 11-3.

Xiang H, Fox JA, Totpal K, Aikawa M, Dupree K, Sinicropi D, Lowe J and Escandon E. Enhanced tumor killing by Apo2L/TRAIL and CPT-11 co-treatment is associated with p21 cleavage and differential regulation of Apo2L/TRAIL ligand and its receptors. *Oncogene* 2002 ; 21 : 3611-9.

Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T and Shin S. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994 ; 54 : 1630-3.

Yang HL, Pan JX, Sun L and Yeung SC. p21 Waf-1 (Cip-1) enhances apoptosis induced by manumycin and paclitaxel in anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88 : 763-72.

Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY and Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* 1997 ; 89 : 1067-76.

Yang YL and Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* 2000 ; 10 : 169-77.

Zangemeister-Wittke U, Leech SH, Olie RA, Simoes-Wust AP, Gautschi O, Luedke GH, Natt F, Haner R, Martin P, Hall J, Nalin CM and Stahel RA. A novel bispecific antisense oligonucleotide inhibiting both bcl-2 and bcl-XL expression efficiently induces apoptosis in tumor cells. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 2547-55.

Zhang Y, Fujita N and Tsuruo T. p21Waf1/Cip1 acts in synergy with bcl-2 to confer multidrug resistance in a camptothecin-selected human lung-cancer cell line. *Int J Cancer* 1999 ; 83 : 790-7.

Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, Guo A, Ruggero D and Pandolfi PP. Promyelocytic leukemia (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 2000 ; 191 : 631-40.

Zhou Y, Wang S, Yue BG, Gobl A and Oberg K. Effects of interferon alpha on the expression of p21cip1/waf1 and cell cycle distribution in carcinoid tumors. *Cancer Invest* 2002 ; 20 : 348-56.

Zimmermann CK, Bonzon C and Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharm Therap* 2001 ; 92 : 57-70.

Ziyaie D, Hupp TR and Thompson AM. P53 and breast cancer. *Breast* 2000 ; 9 : 239-49.

Zou H, Li Y, Liu X and Wang X. An apaf-1 cytochrome c complex is a functional apoptosome that activate procaspase-9. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 11549-56.

ANNEXE

LIGNEES MAMMAIRES HUMAINES UTILISEES

Plusieurs lignées épithéliales présentant des caractéristiques différentes ont été utilisées :

- **la lignée MCF-7** établie à partir d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire chez une patiente de 69 ans. Ces cellules sont bien différenciées et possèdent des récepteurs aux hormones stéroïdiennes telles que les oestrogènes, la progestérone et les glucocorticoïdes. Elles sont faiblement invasives et présentent une protéine P53 sauvage.

- **la lignée MCF-7ras** résultant de la transfection stable de la lignée MCF-7 par un vecteur contenant le gène H-ras codant une protéine G connue pour être impliquée dans la voie des MAP Kinases (Mitogen Activated Protein Kinases). Ces cellules sont hormono-dépendantes, plus invasives que les MCF-7 et possèdent une protéine P53 sauvage.

- **la lignée T47-D** issue d'une effusion pleurale obtenue chez une patiente de 54 ans présentant un carcinome ductal infiltré du sein. Ces cellules sont hormono-dépendantes et ont conservé certaines caractéristiques d'un épithélium mammaire différencié. Elle possède un statut P53 particulier avec une protéine mutante mais fonctionnelle.

- **la lignée HBL-100** provenant du lait d'une mère allaitante. Bien que la donneuse ne présente ni de lésion du sein ni d'antécédents familiaux de cancer du sein, le caryotype des cellules est anormal dès le septième passage. Avant le 35^{ème} passage, la lignée n'est pas tumorigène dans la souris nude mais est capable de former des colonies en agar mou. Après le 35^{ème} passage, les cellules deviennent tumorigènes dans la souris nude et leur tumorigénicité augmente avec le nombre de passages. Dans notre étude, les cellules présentent un nombre de passages supérieur à 35. Ces cellules sont hormono-dépendantes, peu invasives et ont une protéine P53 sauvage.

- **la lignée MDA-MB-231** établie à partir d'une effusion pleurale d'un adénocarcinome mammaire chez une patiente de 51 ans. Ces cellules sont faiblement différenciées et sont caractérisées par un phénotype fibroblastoïde. Elles n'expriment pas les récepteurs aux

oestrogènes et la progestérone. Elles sont tumorigènes, forment des métastases chez la souris nude, et possèdent ainsi un haut pouvoir invasif. Cette lignée présente une protéine P53 mutante non fonctionnelle.

- **la lignée BT-20** issue d'un carcinome mammaire chez une patiente de 74 ans. Cette lignée a été établie en isolant les cellules sortant de la tumeur après qu'elle ait été coupée en fines lamelles. Ces cellules sont hormono-indépendantes, faiblement invasives et possèdent une protéine P53 mutante non fonctionnelle.

- **les cellules épithéliales mammaires normales** issues de mammoplasties réalisées chez des patientes saines âgées de 18 à 30 ans dans le département de chirurgie plastique et reconstructrice du Pr. Pellerin (Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, France).

ABBREVIATIONS

AIF (Apoptosis-Inducing Factor)

Akt (également appelée PKB pour Protein Kinase B),

ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1).

aSMase (SphingoMyélinase acide)

ASPP (Apoptosis Stimulating Protein of P53)

Bcl-2 (B Cell Lymphoma)

BH (Bcl-2 Homology domain)

BIR (Baculovirus IAP Repeats)

CAD (Caspase dependent DNase)

CARD (Caspase Recruitment Domain)

CDK (Cyclin Dependent Kinase)

CEMN (Cellules Epithéliales Mammaires Normales)

CHK2 (CHekpoint Kinase 2)

DcR (Decoy Receptor)

DD (Death Domain)

DED (Death Effector Domain)

DFF40 (DNA Fragmentation Factor 40)

DIABLO (Direct IAP Binding protein with Low Pi)

DISC (Death-Inducing Signaling Complex)

DR-3 (Death Receptor 3)

EDA-R (syntenic EctoDysplasin A Receptor)

EGF (Epidermal Growth Factor)

Endo G (Endonucléase G)

FADD (Fas-Associated Death Domain MORT1)

FAK (Focal Adhesion Kinase)

Fas L (Fas Ligand)

FGF (Fibroblaste Growth Factor)

FLIP (FADD-Like ICE Inhibitory Protein)

FSH (Follicule Stimulating Hormone)

HAT (Histones AcétylTransférases)

HDAC (Histones DéACétylases)

HGF (Hepatocyte Growth Factor)

HSP (Heat Schok Protein)

HtrA2/Omi (High Temperature Requirement A 2)

IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins)

ICAD (Inhibitor of CAD)

IGF (Insulin-like Growth Factor)

IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins)

IKB (Inhibitor of NF Kappa B)

IKK2 (I Kappa B Kinase)

JNK (c-Jun N-terminal Kinase)

LH-RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone)

MDGF-1 (Mammary Derived Growth Factor-1)

MEKK1 (MAPK/ERK Kinase Kinase 1)

MMTV (Mouse Mammary Tumour Virus)

NaB (Sodium Butyrate)

NF Kappa B (Nuclear Factor of Kappa B)

NGF (Nerve Growth Factor)

nSMase (SphingoMyélinase neutre)

OPG (OsteoProteGerine)

PAK-2 (P21-Activated protein Kinase 2)

PARP (Poly ADP Ribose Polymerase)

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

PI-3 Kinase (Phosphatidylinositol-3 Kinase)

PLAD (PreLigand Assembly Domain)

PLC (Phospholipase C)

PMA (Phorbol Myristate Acetate)

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Protein)

PTPC (Permeability Transition Pore Complex)

RAIDD (RIP Associated ICH1/CED3 homologous protein with a Death Domain)

RIP (Receptor Interacting Protein)

SAPK (Stress Activated Protein Kinase)

SD (Standard Deviation)

SF (Scatter Factor)

SIMP (Soluble Inter-membrane Mitochondrial Proteins)

Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases)

SODD (Silencer Of Death Domain)

TGF (Transforming Growth Factor)

TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor alpha)

TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor Receptor)

TRADD (TNF-R Associated Death Domain).

TRAF-2 (TNF-R-Associated Factor 2).

TRAIL (TNF-alpha Related Apoptosis Inducing Ligand)

TRAIL-R (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor)

TSA (Trichostatin A)

XIAF1 (Xiap-Associated Factor 1)

XIAP (X-linked Inhibitors of Apoptosis Proteins)

RESUME

Le cancer du sein est le premier cancer féminin de la communauté européenne avec près de 210 000 nouveaux cas par an. Face aux limites des thérapies classiques, la découverte de nouvelles molécules anti-tumorales et des approches combinant plusieurs agents anti-cancéreux font l'objet de nombreuses recherches. Dans ce cadre, le butyrate de sodium (NaB) a été proposé en tant qu'agent anticancéreux potentiel.

Nos résultats montrent que le NaB inhibe la croissance des cellules cancéreuses de sein. Cette inhibition est due à un blocage du cycle cellulaire et à une induction de l'apoptose. Ces deux phénomènes dépendent de l'inhibiteur de CDK (Cyclin Dependent Kinase) P21^{waf1} et non du suppresseur de tumeurs P53. De plus, l'induction de l'apoptose par le NaB impliquerait l'interaction de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) avec P21^{waf1} tandis que l'inhibition de la prolifération serait le résultat de l'inhibition des CDKs. Par ailleurs, des ligands de la superfamille du récepteur du TNF-alpha (Tumor Necrosis Factor alpha) tels que TNF-alpha, TRAIL (TNF-alpha Related Apoptosis Inducing Ligand) et Fas L potentialisent l'apoptose induite par le NaB. Ce phénomène est observé à la fois sur des lignées cancéreuses de sein hormono-sensibles (MCF-7, T47-D) et des lignées hormono-résistantes (BT-20). Cette induction synergique de l'apoptose est associée à une augmentation de plusieurs protéines clefs impliquées dans la voie de signalisation des récepteurs de mort telles que les récepteurs de mort, l'adaptateur FADD, les caspases 8 et 9, Bid le membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2, et le cytochrome c cytosolique. La transfection transitoire d'un plasmide p21^{waf1} antisens ou déficient pour son interaction avec PCNA diminue fortement l'induction synergique de l'apoptose. Cette inhibition est associée à l'absence de relargage du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol. De manière intéressante, les cellules épithéliales mammaires normales ne sont pas induites en apoptose par les cotraitements.

L'ensemble de ces travaux montrent que le NaB, seul ou en combinaison avec des ligands des récepteurs de mort, induit l'apoptose des cellules cancéreuses de sein. Cette apoptose est sous le contrôle P21^{waf1} et non de P53. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que 30 à 50% des tumeurs mammaires présentent des mutations de P53. Cependant, une meilleure compréhension du mécanisme d'action du NaB, ainsi que le test *in vivo* de l'efficacité des cotraitements dans l'inhibition du développement tumoral devraient contribuer à ouvrir de nouvelles perspectives dans la lutte contre le cancer du sein.