



Etude de la résistance à l'anoïkis des cellules de mélanome B16F10 cultivées sur revêtements anti-adhésifs.

O. Goundiam

► To cite this version:

O. Goundiam. Etude de la résistance à l'anoïkis des cellules de mélanome B16F10 cultivées sur revêtements anti-adhésifs.. Sciences de l'ingénieur [physics]. Université de Technologie de Compiègne, 2009. Français. NNT : . tel-00455003

HAL Id: tel-00455003

<https://theses.hal.science/tel-00455003>

Submitted on 9 Feb 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Par Oumou GOUNDIAM

ETUDE DE LA RESISTANCE A L'ANOÏKIS DES CELLULES DE MELANOME B16F10 CULTIVEES SUR REVETEMENTS ANTI-ADHESIFS

Laboratoire UMR CNRS 6600 Biomécanique et Bioingénierie.

Thèse présentée le 28 Octobre 2009 pour l'obtention
Du grade de Docteur de l'UTC

Devant le jury composé de :

Dominique LAURENT-MAQUIN - Rapporteur

Michel CREPIN - Rapporteur

Franck CARREIRAS - Examineur

Daniel THOMAS - Examineur

Muriel VAYSSADE - Co-directeur de Recherche

Marie-Danielle NAGEL - Directeur de Recherche

Frédéric COLLAND - Accompagnateur entreprise (I-Doc)

A mon grand père,
Mes parents,

« Je ne cherche pas à avoir les réponses, je cherche à comprendre les questions » *Confucius*.

Remerciements

Je profite de ces quelques lignes pour remercier toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin au cours de ces trois années de thèse.

Tout d'abord je tiens à témoigner ma sincère reconnaissance au Professeur Marie-Danielle Nagel pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour avoir co-dirigé mes travaux de recherche. Je tiens à adresser mes sincères remerciements au Docteur Muriel Vayssade pour son encadrement, sa disponibilité, son implication totale au déroulement de ma thèse. Merci à vous toutes pour m'avoir initiée au monde de la recherche. Ces trois années à vos côtés ont été riches en enseignement.

Mes plus sincères remerciements aux membres du jury, pour avoir accepté d'y participer. Je remercie les Professeurs Dominique Laurent-Maquin et Michel Crépin pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier le Docteur Franck Carreiras et le Professeur Daniel Thomas pour leurs participations en tant qu'examinateurs. Mes vifs remerciements au Docteur Frédéric Colland pour avoir accepté de siéger au jury.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements aux membres du laboratoire, notamment Jean-Luc Duval, Pascale Vigneron et Vanessa Bleicher pour leur bonne humeur et leur humour. J'ai passé trois années agréables à vos côtés. Merci pour vos conseils et votre disponibilité. Je remercie également Chantal Guilbert et Murielle Dufresne. Je tiens à remercier particulièrement Nijez Aloulou pour son amitié, son écoute et ses conseils. J'espère de tout cœur que tu trouveras la voie que tu souhaites dans le monde de la recherche.

Merci aux étudiants que j'ai eu à rencontrer au cours de ses trois années : Marie-Charlotte avec qui je suis heureuse de partager pendant encore une année le même bureau. Merci à Elodie et Sylvia. Je remercie également Marlène qui a partagé un an mon bureau en tant que post-Doc, pour nos fous rires.

Merci à mes parents, ma sœur pour leur soutien au quotidien malgré la distance, j'en ai eu bien besoin pendant les moments de frustration. Merci à Amadou, pour tous les jours.

Table des matières

Glossaire.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	10
Introduction générale.....	11
Revue bibliographique.....	14
1 Les intégrines.....	15
1.1 Structure des intégrines.....	15
1.2 Interconnexion des intégrines avec les protéines intracellulaires.....	17
1.3 Interaction intégrines-ligands (Figure 3).....	18
Un ligand des intégrines : la Fn.....	19
1.4 La régulation du cytosquelette par les intégrines.....	21
1.4.1 Généralités.....	21
1.4.2 Les Rho-GTPases et l'adhésion cellulaire.....	22
2 Les modèles de culture <i>in vitro</i>.....	23
2.1 Généralités.....	23
2.2 Les systèmes de culture en 3D.....	25
2.2.1 Les systèmes de culture favorables à l'adhésion cellulaire.....	25
2.2.2 Systèmes de culture défavorables à l'adhésion cellulaire.....	25
3 Les interactions cellule-MEC.....	27
4 L'anoïkis.....	29
4.1 La voie intrinsèque ou mitochondriale.....	30
4.2 La voie extrinsèque de l'apoptose ou des récepteurs dits «à domaine de mort».....	31
4.3 Les caspases.....	33
4.3.1 Activation des caspases.....	34
4.3.2 Substrats des caspases.....	34
4.3.3 La régulation des caspases.....	36
5 Une dérégulation de l'apoptose : la cellule cancéreuse.....	36
5.1 Un type de cancer : le mélanome.....	37
5.2 Métastases et résistance à l'anoïkis.....	39
5.3 Les voies de signalisation intracellulaire de l'adhésion, de la prolifération et de la survie.....	41

5.3.1 FAK	41
5.3.2 La voie de survie PI3K/AKT	44
5.3.3 La voie des MAP Kinases	49
5.4 Récapitulatifs des mécanismes de régulation de la survie, l'anoïkis et la résistance à l'anoïkis	52
6 La pectine Okra	53
Objectifs	57
Matériels et Méthodes	57
1 Culture cellulaire.....	58
2 Les revêtements de culture utilisés	59
2.1 Revêtements anti-adhésifs (3D)	59
2.2 Revêtement adhésif (2D).....	60
2.3 Méthodes de récolte des cellules selon les différents supports	60
3 Etude de la morphologie.....	60
3.1 Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine.....	60
3.2 Etat d'activation de la protéine RhoA	61
4 Etude de la prolifération cellulaire et cycle cellulaire.....	63
4.1 Test d'exclusion au Bleu Trypan	63
4.2 Mesure de l'activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) cytoplasmique.....	63
4.3 Analyse du cycle cellulaire.....	64
4.4 Observation des cellules en mitose : marquage de l'histone H3 phosphorylée	65
5 Etude de l'apoptose	66
5.1 Mesure d'activité des Caspases 3, 8 et 9	66
5.2 Test annexine-V	67
5.3 T.U.N.E.L (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method)	68
5.4 Test APOSTAIN	69
5.5 Marquage à l'Acridine Orange.....	70
6 Etude de l'expression des protéines.....	70
6.1 Western Blot.....	70
6.2 Immunomarquage de la Fn.....	72
7 Analyse par RT-PCR de l'expression du gène de la Fn	73
8 Inhibition de l'expression des protéines par ARN interférentiels ou siRNA (small interfering RNA).....	75

9 Traitement avec la pectine Okra	76
10 Analyses statistiques.....	77
Résultats.....	78
1 Aspects morphologiques des cellules cultivées sur substratum anti-adhésif.....	79
1.1 Les cellules adoptent une morphologie ronde et agrégée.....	79
1.2 Le cytosquelette n'est pas structuré en fibres de stress	79
1.3 L'activation de la protéine RhoA est modulée suivant le type cellulaire.....	80
2 Etudes portant sur la prolifération et la survie (résistance à l'anoïkis) des cellules cultivées sur substratum anti-adhésif	81
2.1 La prolifération est plus ou moins inhibée suivant le type cellulaire	81
2.1.1 Evaluation par des numérations associées au test d'exclusion au bleu Trypan.	82
2.1.2 Evaluation par la mesure de l'activité intracellulaire de la LDH.....	83
2.2 La sensibilité ou la résistance à l'anoïkis dépend du type cellulaire	85
2.2.1 Etat d'activation des caspases 3 et 9	85
2.2.2 Evaluation de l'apoptose par marquage à l'annexine-V	87
2.2.3 Evaluation de l'apoptose par la méthode T.U.N.E.L	89
2.3 Les cellules apoptotiques et nécrotiques ne sont pas regroupées au centre des agrégats.....	90
3 Analyse des voies de signalisation dans les cellules cultivées sur substratum anti-adhésif.....	91
3.1 Les voies de survie PI3K/AKT et MAPK sont différemment activées suivant le type cellulaire.....	91
3.2 La voie de survie PI3K/AKT est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'activation d'AKT	93
3.2.1 L'inhibition de PI3K affecte la prolifération des cellules de mélanome cultivées en 3D, et l'activation d'AKT	93
3.2.2 L'inhibition de la kinase AKT par siRNA affecte la prolifération des cellules B16F10 cultivées en 3D	94
4 Etude du rôle de la fibronectine dans la résistance ou la sensibilité à l'anoïkis	95
4.1 L'expression de la fibronectine néosynthétisée par les agrégats est observée dans les trois types cellulaires	95
4.2 L'expression du gène fibronectine diffère suivant le type cellulaire	96

4.3 L'inhibition de l'expression de la fibronectine par siRNA n'influence ni la prolifération cellulaire ni l'apoptose	97
4.3.1 Evaluation par des numérations associées au test d'exclusion au bleu Trypan	98
4.3.2 Analyse de l'apoptose dans les cellules transfectées puis cultivées sur polyHEMA	99
4.3.3 Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire	99
4.3.4 Observation de la mitose après inhibition de l'expression de la Fn	100
5 Etude de l'activité anti-tumorigénique de la pectine Okra	101
5.1 La morphologie cellulaire est affectée par la pectine Okra	101
5.2 La prolifération et le cycle cellulaire sont modifiés par la pectine Okra	102
5.3 L'apoptose est induite par la pectine Okra	104
Discussion.....	107
1 La morphologie des cellules en 3D	108
2 La prolifération et la survie des cellules en 3D	108
3 L'implication des voies de signalisation dans la résistance à l'anoïkis des cellules.....	111
3.1 L'implication de la voie PI3K/AKT dans la résistance à l'anoïkis	113
3.2 Implication de la voie des MAPK dans la résistance à l'anoïkis	117
4 Le rôle de la fibronectine dans la survie cellulaire.....	117
5 Okra : une pectine anti-tumorale	119
Conclusions et perspectives	121
Références bibliographiques.....	124
Publications et Communications	137
Résumé.....	139

Glossaire

AO	Acridine Orange
BSA	Bovine Serum Albumine
CEL	Boîtes de Pétri revêtues d'une double-couche de HPMC-CMC
CMC	Carboxy-Méthyl-Cellulose
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DMSO	DiMéthylSulfOxyde
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine (" Fluorescein IsoThioCyanate ")
Fn	Fibronectine
HPMC	Hydroxy-Propyl-Méthyl-Cellulose
IP	Iodure de Propidium
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
ns	non significatif
Okra	Pectine issue du fruit <i>Abelmoschus esculentus</i>
PAF	Paraformaldéhyde
PI3K	Phospho inositol-3-Kinase
PolyHEMA	Poly (2-Hydroxy-Ethyl MethAcrylate)
PSt	Polystyrène traité pour la culture cellulaire
siRNA	small interfering RNA
T.U.N.E.L	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling

Liste des figures

Figure 1 : Structure d'une intégrine.....	17
Figure 2 : Le complexe d'adhérence focale.	18
Figure 3 : Représentation de la famille des intégrines ainsi que leurs ligands.	18
Figure 4 : Structure schématisée d'un monomère de Fn.	20
Figure 5 : Cycle d'activation des Rho-GTPases.....	22
Figure 6 : Première phase de l'adhésion.....	23
Figure 7 : Deuxième phase de l'adhésion.....	23
Figure 8 : Morphologie de fibroblastes humains selon qu'ils soient en 2D ou 3D.	25
Figure 9 : Etapes au cours du temps de l'adhésion cellules-MEC et les différences entre la situation in vitro en 2D et in vivo en 3D lors de la formation de MEC par des cellules NIH3T3.....	28
Figure 10 : Représentation schématique de la voie intrinsèque de l'apoptose.....	30
Figure 11 : Formation de l'apoptosome au cours de l'apoptose.....	31
Figure 12 : Voie extrinsèque de l'apoptose.	32
Figure 13 : Signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.	32
Figure 14 : Structure et classification des caspases.	33
Figure 15 : Activation des caspases.....	34
Figure 16 : Caractéristiques du cancer.	37
Figure 17 : Développement du mélanome malin.	38
Figure 18 : Modification de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire durant le développement du mélanome.	39
Figure 19 : Les étapes de la métastase cancéreuse.	40
Figure 20 : Structure de FAK.	42
Figure 21 : Réactions catalysées par PI3K et les substrats générés.....	44
Figure 22 : Structure des trois isoformes d'AKT.....	46
Figure 23 : Quelques voies de signalisation d'AKT.....	47
Figure 24 : Cascade des MAP Kinases.....	49
Figure 25 : Les différentes voies de régulation.....	52
Figure 26 : Structure d'une pectine.	53
Figure 27 : Morphologie des cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 après 48 heures de culture en 2D et 3D... 79	
Figure 28 : Organisation du cytosquelette dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées en 2D et 3D.	80
Figure 29 : Analyse de l'activation de RhoA dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées en 2D et 3D.....	81
Figure 30 : Evolution des indices N/N0 sur polyHEMA.	83
Figure 31 : Evolution de l'activité LDH dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3.....	84
Figure 32 : Analyse de l'état d'activation de la caspase 3 dans les cellules cultivées sur polyHEMA.	86
Figure 33 : Analyse de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules cultivées sur polyHEMA.....	87
Figure 34 : Quantification de l'apoptose par le marquage à l'annexine-V.....	88

Figure 35 : Évaluation de l'apoptose par la méthode T.U.N.E.L dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées en 2D et 3D.	89
Figure 36 : Localisation des cellules nécrotiques et apoptotiques dans les agrégats.	90
Figure 37 : Analyse par western blot des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK dans les cellules cultivées en 3D.	92
Figure 38 : Analyse par western blot de l'expression des protéines ILK1, survivine et Bcl-2 dans les cellules cultivées en 3D.	93
Figure 39 : Analyse par western blot de l'expression de la forme totale d'AKT dans les cellules B16F10 transfectées par des siRNA ciblant AKT1 et cultivées sur polyHEMA pendant 48 heures.	94
Figure 40 : Analyse immunocytochimique de l'expression de la fibronectine dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées sur revêtement anti-adhésif.	96
Figure 41 : Analyse de l'expression du gène fibronectine dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées en 3D.	97
Figure 42 : Analyse de l'expression du gène fibronectine dans les cellules B16F10 transfectées avec des siRNA Fn puis ensemencées sur polyHEMA.	98
Figure 43 : Evaluation des indices N/N0 pour les cellules transfectées (siRNA fibronectine) en comparaison au contrôle négatif.	99
Figure 44 : Répartition dans le cycle cellulaire des cellules de mélanome B16F10 transfectées puis ensemencées sur polyHEMA pendant 72 heures.	100
Figure 45 : Analyse des cellules B16F10 en mitose à l'aide du marquage de l'Histone H3 phosphorylée (vert).	101
Figure 46 : Morphologie des cellules B16F10 sur PSt et polyHEMA après 48 heures de traitement avec la pectine Okra.	102
Figure 47 : Prolifération des cellules B16F10 après 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, en présence ou non (contrôle) de la pectine Okra.	103
Figure 48 : Répartition des cellules B16F10 dans le cycle cellulaire après 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, sans (contrôle, A et B) ou en présence (B, D) de la pectine Okra.	104
Figure 49 : Voies de signalisation étudiées.	112
Figure 50 : Mécanisme de régulation impliquant RhoB.	114
Figure 51 : Rôle de la survivine dans le blocage de l'apoptose mitochondriale.	116
Figure 52 : Hypothèse d'une voie de régulation de la Fn dans les fibroblastes.	119

Liste des tableaux

Tableau 1 : Etapes du test enzymatique.	67
Tableau 2 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blot.	72
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel.	75
Tableau 4 : Séquences des siRNA utilisés.	76
Tableau 5 : Composition en sucres d'Okra (en pourcentage molaire), expression du rapport rhamnose/acide galacturonique et composition totale en sucre (en pourcentage massique).	77
Tableau 6 : Synthèse des résultats obtenus dans les trois lignées cellulaires cultivées en 3D.	106

Introduction générale

Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre du projet Biomatériaux et cancer subventionné par la Ligue Contre le Cancer, comité de l'Oise. L'équipe Biomatériaux-Biocompatibilité (Génie Biologique UMR CNRS 6600) étudie depuis plusieurs années les activations biochimiques précoces de cellules adhérentes cultivées au contact de biomatériaux. Ces derniers, déterminants pour l'orientation fonctionnelle des cellules, sont couramment utilisés comme supports de culture *in vitro* afin de reproduire l'environnement natif des cellules. Dans les conditions physiologiques, les cellules interagissent entre elles et avec les composants de la matrice extracellulaire (MEC) via des molécules d'adhérence. Une interruption de ces interactions conduit à une forme de mort cellulaire programmée (apoptose) appelée anoïkis.

Le cancer est une pathologie qui découle, au moins pour partie, du dysfonctionnement de l'anoïkis. En effet, la résistance à l'anoïkis est une étape importante dans la progression tumorale et la transformation métastatique. Les revêtements anti-adhésifs défavorables à l'attachement cellulaire et donc aux interactions cellules-MEC constituent alors des modèles de culture intéressants pour comprendre les dérégulations de cellules tumorales. Au cours de cette thèse, un matériau cellulosique développé dans le laboratoire (CEL), ainsi que le poly(2-hydroxy-éthyl méthacrylate) (polyHEMA) sont utilisés comme supports anti-adhésifs. Les cellules au contact de ces substrats, adoptent une architecture en 3D qui est proche de la situation *in vivo*. Le polystyrène (PSt) sur lequel les cellules s'étalent (2D) et prolifèrent est utilisé comme support de référence pour les études morphologiques et la quantification de l'apoptose. Le comportement de la lignée de mélanome murin utilisée est comparé à celui de deux autres lignées murines identifiées sensibles à l'anoïkis : les fibroblastes Swiss 3T3 et les pré-ostéoblastes MC3T3.

Dans le cadre de ce projet nous tentons de comprendre les mécanismes de résistance à l'anoïkis des cellules du mélanome hautement métastatique B16F10. En effet, la capacité de ces cellules tumorales à survivre sous forme d'agrégats observée au cours de travaux antérieurs, est liée à un contrôle anormal de la mort programmée en faveur de l'activation continue des voies de survie intracellulaires. Nous nous intéressons particulièrement aux voies de survie PI3K/AKT et MAP Kinases fortement dérégulées dans de nombreux cancers, ainsi qu'à leurs régulateurs clés. Cependant, les mécanismes moléculaires du développement

métastatique ne sont pas pleinement identifiés dans la pathologie humaine du mélanome malin, ce qui constitue une difficulté pour trouver des traitements satisfaisants à l'encontre de ce cancer très agressif présentant un fort potentiel métastasiant. La recherche continue à explorer de nouvelles molécules qui pourraient agir sur les voies de signalisation et affecter la prolifération, la survie et l'invasion des cellules de mélanome. Le support de culture anti-adhésif a été appliqué à l'étude du potentiel anti-tumorigénique de la pectine Okra, initialement préparée par le laboratoire Food Chemistry de l'Université de Wageningen, NL, dans le cadre du projet européen PectiCoat (STREP NMP4, 2005-2008).

Après une présentation de l'état de l'art, puis de la méthodologie employée pour les différentes études, les résultats seront décrits et discutés. Une conclusion générale permettant de développer des perspectives sera proposée en dernière partie de ce mémoire.

Revue bibliographique

Dans leur environnement, les cellules sont en contact avec un réseau complexe de macromolécules constituant la matrice extracellulaire (MEC). Elles détectent leur environnement extracellulaire à travers des interactions faisant intervenir une large variété de molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour Cell Adhesion Molecules). En effet, la liaison à la MEC est médiée par des récepteurs localisés à la surface des cellules qui permettent des liaisons structurales et fonctionnelles entre la matrice et les microfilaments d'actine, les microtubules, et les filaments intermédiaires du cytosquelette. Les récepteurs cellulaires sont principalement :

- les intégrines et les molécules syndécan qui interviennent dans l'interaction avec la MEC.
- les cadhérines, les sélectines et les protéines de la famille des Ig-CAM qui régulent les interactions avec les cellules adjacentes (Aplin et al., 1998; Aplin et al., 1999)

L'adhésion des cellules régule de nombreux processus cellulaires et l'intégration de ces différents signaux (cellule-MEC ou cellule-cellule) permet la morphogenèse des tissus, la croissance cellulaire, la survie, la différenciation, le mouvement, l'expression des gènes et la mort cellulaire programmée ou apoptose (Aplin et al., 1998; Aplin et al., 1999; Howe et al., 1998).

1 Les intégrines

La plus grande famille des récepteurs cellulaires impliqués dans la liaison aux protéines de la MEC sont les intégrines (Heino & Kapyla, 2009). Elles peuvent être classées selon les propriétés de leur ligand ou selon la composition de leurs sous-unités (Barczyk et al., 2009). Les intégrines s'assemblent en amas pour leur interaction avec la MEC, et constituent ainsi le point focal d'adhérence.

1.1 Structure des intégrines

Elles sont composées de deux sous-unités transmembranaires α et β associées de façon non covalente (Figure 1).

La sous-unité α détermine la spécificité du ligand. Elle est composée d'une structure en hélice β qui interagit avec le ligand au niveau de sa partie supérieure et possède des séquences d'acides aminés répétées qui se lient à des cations divalents (Ca^{2+}) au niveau de sa partie inférieure. Ces derniers régulent la conformation de la structure. Par ailleurs certaines sous-unités α possèdent un domaine A (appelé αA) mobile et inséré par une charnière sur la surface de l'hélice. αA contient un sillon qui lie le ligand par l'intermédiaire d'un ion Mg^{2+} . Ce sillon constitue le motif MIDAS (Metal-Ion-Dependent Adhesion Site). Par ailleurs la sous-unité α possède d'autres domaines comme Calf (mollet) 1 et 2, Thigh (cuisse).

La sous-unité β des intégrines permet, au niveau intracellulaire, la connexion au cytosquelette et affecte les voies de signalisation, en particulier l'activation de la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase). Elle est constituée d'un domaine PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin), d'un domaine appelé Hybride, d'un domaine βA et quatre séquences répétées riches en cystéine de la famille des facteurs de croissance EGF (Epidermal Growth Factor). Le domaine βA comprend une séquence MIDAS (liaison avec Mg^{2+}) et possède une région adjacente à cette dernière appelée ADMIDAS qui est régulée négativement par le Ca^{2+} . La liaison du site ADMIDAS avec un ion Mn^{2+} entraîne des changements conformationnels et l'activation de l'intégrine (Barczyk et al., 2009; Humphries et al., 2003; Hynes, 2002; Lee et al., 1995; Mould et al., 2003).

Lorsque le domaine αA est absent, la liaison avec le ligand est totalement assurée par le domaine βA (Bouaouina, 2006).

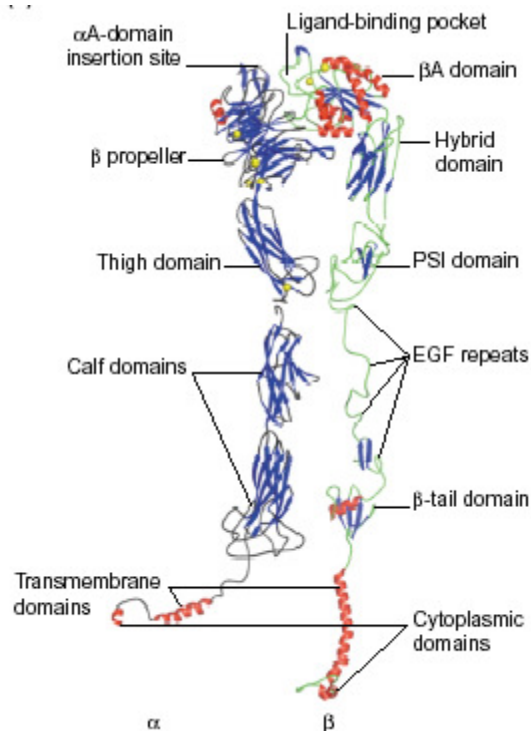


Figure 1 : Structure d'une intégrine.

Les sous unités α (gauche) et β (droite) sont représentées, ainsi que les portions intracellulaires, transmembranaires et extracellulaires. La chaîne α comprend, entre autres, l'hélice β et le domaine αA . La chaîne β comporte, entre autres, les quatre domaines similaires à l'EGF, le domaine PSI et le domaine βA (Humphries et al., 2003).

1.2 Interconnexion des intégrines avec les protéines intracellulaires

L'engagement des sous unités intégrines influence la morphologie cellulaire, l'architecture intracellulaire et la motilité (Aplin et al., 1998; Howe et al., 1998). En effet, au niveau intracellulaire, plusieurs molécules sont recrutées et/ou activées à proximité des intégrines afin de relayer les signaux transmis. L'ensemble de ces molécules constitue le complexe d'adhérence focale qui forme de larges structures sous-membranaires. Parmi elles, on peut citer FAK, les protéines du cytosquelette (actine, paxilline, taline, vinculine) et celles participant au remaniement de ce dernier (p130Cas, PI3K...) (Cornillon et al., 2003), (Figure 2).

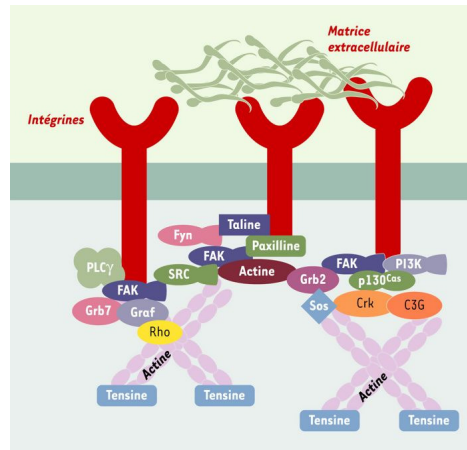


Figure 2 : Le complexe d'adhérence focale.

Large structure composée de protéines liées entre elles, dont FAK est l'un des points centraux (Cornillon et al., 2003).

1.3 Interaction intégrines-ligands (Figure 3)

Les ligands des intégrines comprennent les protéines structurales de la MEC comme le collagène, la fibronectine (Fn) et la laminine, ainsi que les protéines provisionnelles de la MEC déposées lors du remodelage et les événements thrombotiques comme la fibrine, la vitronectine, la tenascine et l'ostéopontine (Stupack, 2005).

Les intégrines reconnaissent des séquences spécifiques portées par leurs ligands comme le motif RGD (arg-gly-asp) identifié à l'origine sur la Fn, un des composants majoritaires de la MEC, et par la suite sur d'autres protéines d'adhésion.

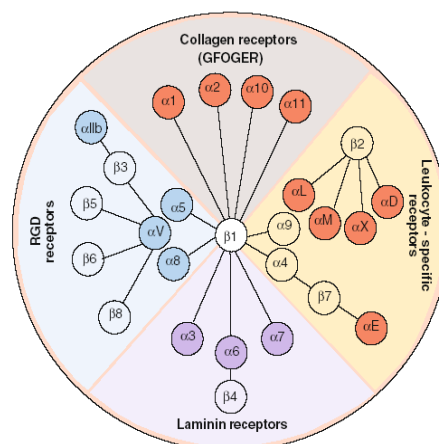


Figure 3 : Représentation de la famille des intégrines ainsi que leurs ligands.

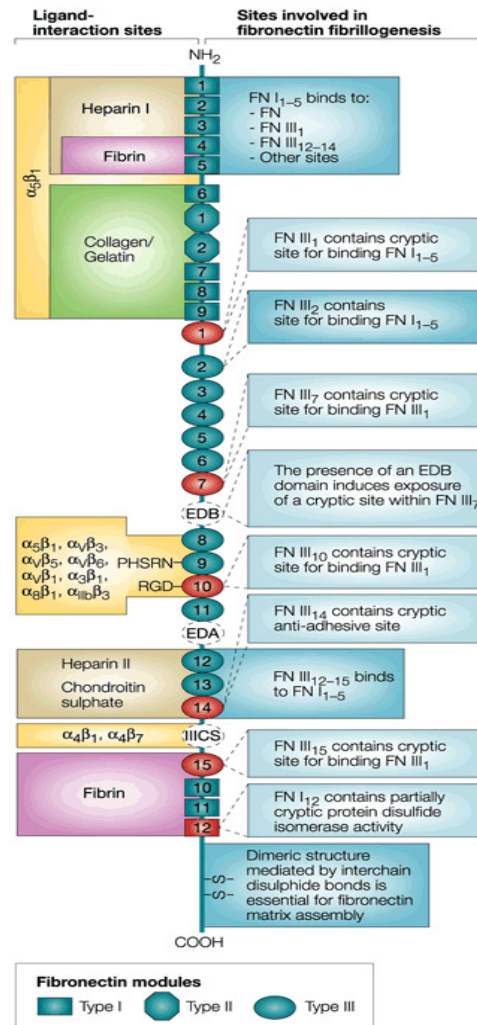
Les 18 sous-unités α et 8 sous-unités β forment au moins 24 récepteurs hétérodimériques α/β (Barczyk et al., 2009).

Un ligand des intégrines : la Fn

La Fn est présente sous forme soluble dans le plasma et sous forme insoluble dans la MEC. C'est une glycoprotéine abondante et ubiquitaire sécrétée par les cellules sous forme de dimères globulaires solubles de 230-280 kDa qui sont ensuite assemblés sous forme de réseau fibrillaire insoluble à la surface cellulaire (Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer, 2003). Les deux monomères d'environ 230 kDa sont reliés par des ponts disulfures au niveau de leurs régions C-terminales. Chaque monomère est constitué d'une répétition de 3 sous-unités différentes appelées modules (Figure 4) :

- F1 : le module de type I (45 acides aminés au niveau des extrémités N et C-terminale)
- F2 : le module de type II (60 acides aminés, répété deux fois),
- F3 : le module de type III (90 acides aminés, répété 15 à 17 fois)

Les modules forment 5-6 domaines de liaison à la fibrine, le collagène, la Fn elle-même, l'héparine et les cellules. Le domaine de liaison aux cellules comprend le motif RGD (situé au niveau FIII-10) reconnu par les intégrines, ainsi qu'une séquence de type III répétée, appelé PHSRN ou séquence synergique.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figure 4 : Structure schématisée d'un monomère de Fn.

Les différents domaines sont indiqués à droite et les sites de liaison à d'autres molécules (comme les intégrines) à gauche.

La Fn est codée par un seul gène, cependant l'épissage alternatif des pré-ARNm ainsi que les modifications post-transcriptionnelles conduisent à la formation de multiples isoformes, avec plus de 20 variantes chez l'homme (Kaspar et al., 2006). La Fn peut donc varier selon les tissus, et cette situation suggère des propriétés fonctionnelles de la protéine, caractéristiques d'un tissu donné (Lerat et al., 1993).

L'épissage concerne 3 régions du gène : deux exons au centre de la molécule, appelées extra-domaines A et B (EDA et EDB) et la troisième au niveau du C-terminal, appelée région variable V (IIIICS). EDA et EDB peuvent être inclus ou totalement délétés.

La Fn a pour rôle l'organisation de la MEC, elle est impliquée dans l'embryogenèse, l'adhésion cellulaire, la morphologie, la motilité, la migration, la prolifération et la différenciation (Kaspar et al., 2006; Lerat et al., 1993). Garcia et al., (1999) ont montré que la conformation de la Fn sur un matériau pouvait influencer le comportement cellulaire. La Fn joue par ailleurs un rôle important au cours de la progression tumorale (Kulasekara et al., 2009).

1.4 La régulation du cytosquelette par les intégrines

L'adhésion cellulaire médiée par les intégrines régule l'activation des Rho-GTPases (Huveneers & Danen, 2009).

1.4.1 Généralités

La famille des Rho-GTPases est un sous ensemble de la super famille des petites protéines G appelée Ras-like comprenant Ras, Rab, Arf et Ran.

La famille des Rho-GTPases est divisée en 6 sous familles (Buongiorno & Bapat, 2005; Dransart et al., 2005; Gomez del Pulgar et al., 2005; Ho et al., 2008) :

- Rac1 (Rac1, Rac1b, Rac2, Rac3 et RhoG)
- Cdc42 (Cdc42, G25 K, TC10, TCL, Wrch1)
- Rnd (Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE)
- RhoBTB (RhoBTB1 et RhoBTB2)
- Miro (Miro-1 et Mori-2)
- Rho (RhoA, RhoB, RhoC)

Les Rho-GTPases sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires comme l'organisation du cytosquelette (filaments d'actine et microtubules), la division cellulaire, l'adhésion, la motilité, la polarité et la migration (Karlsson et al., 2009; Vega & Ridley, 2008). Leur régulation se fait par cycle d'activation/inactivation (Figure 5). La forme inactive Rho-GDP passe à la forme active Rho-GTP (ou inversement) sous l'action de 3 familles d'effecteurs : les protéines GDIs (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors), GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) et GAPs (GTPases Activating Proteins).

Dans le cytoplasme, Rho-GDP est inhibée par association à la protéine GDI qui se fixe au niveau de son domaine C-terminal. La dissociation de GDI entraîne la migration de Rho-GDP vers la membrane plasmique, où elle peut alors être activée en Rho-GTP sous l'action des protéines GEFs. La régulation des Rho-GTPases fait également intervenir les protéines GAPs qui hydrolysent GTP en GDP, entraînant l'inactivation des protéines G (Figure 5).

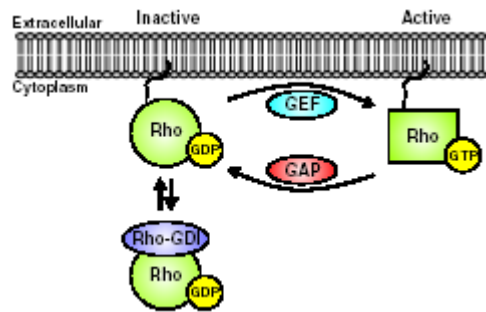


Figure 5 : Cycle d'activation des Rho-GTPases.

Les protéines G passent de la forme inactive à la forme active sous l'influence de différents effecteurs. (Huveneers & Danen, 2009).

1.4.2 Les Rho-GTPases et l'adhésion cellulaire

L'adhésion à la MEC via les intégrines est caractérisée par deux phases (Arthur & Burridge, 2001; Arthur et al., 2002; DeMali et al., 2003; Huveneers & Danen, 2009) :

- Dans un premier temps, l'activation de Rac et Cdc42 conduit à la formation de filopodes et de lamellipodes (extensions cytoplasmiques ou membranaires nécessaires au déplacement). Par ailleurs la protéine p190RhoGAP inhibe RhoA et empêche la formation de fibres de stress d'actine (Figure 6).
- Lors de la deuxième phase, l'engagement des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ avec la Fn conduit à l'activation de RhoA via la régulation de Src et FAK. Cela entraîne la formation de fibres de stress d'actine (Figure 7).

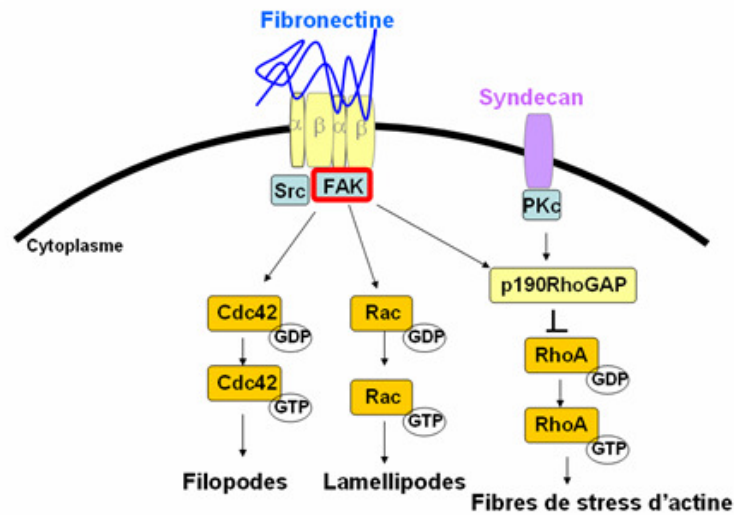


Figure 6 : Première phase de l'adhésion.
Modifié d'après Huveneers & Danen, 2009.

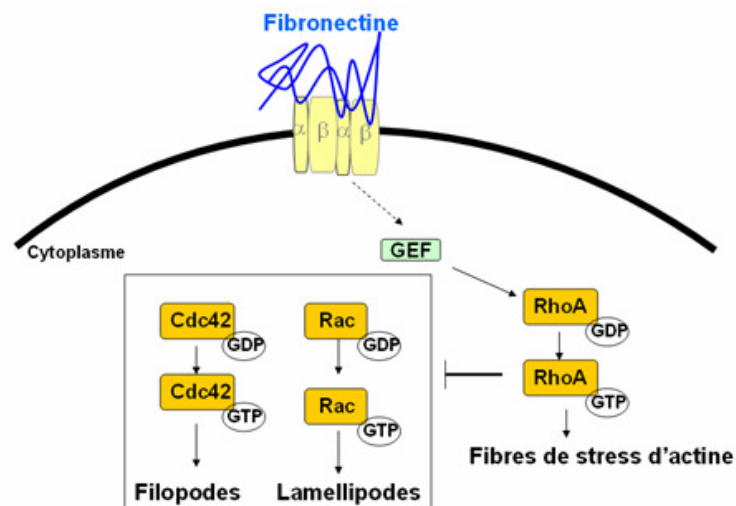


Figure 7 : Deuxième phase de l'adhésion
Modifié d'après Huveneers & Danen, 2009.

2 Les modèles de culture *in vitro*

2.1 Généralités

Dans le but de comprendre la physiologie cellulaire et tissulaire, ainsi que la pathophysiologie *in vitro*, les cellules sont cultivées sur différents matériaux, comme le polystyrène traité pour culture cellulaire (PSt), sur lequel elles peuvent adhérer et proliférer. L'adhésion dépend de la capacité du matériau à adsorber les protéines

adhésives (en majorité la Fn et la vitronectine) contenues soit dans le milieu de culture enrichi en sérum, soit synthétisées par les cellules elles même (Steele et al., 1993a; Steele et al., 1995; Steele et al., 1993b). L'adsorption des protéines dépend des propriétés de surface du support de culture (Gronowicz & McCarthy, 1996; Schneider & Burridge, 1994). Ainsi, des supports de culture initialement défavorables peuvent permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire lorsqu'ils sont recouverts de protéines matricielles (Garcia et al., 1999; McClary et al., 2000) qui se sont adsorbées sur leur surface, favorisant de ce fait les interactions cellule-MEC *in vitro* (DeMali et al., 2003).

Cependant, en raison de la complexité de la situation *in vivo*, des systèmes de cultures en trois-dimensions (3D) sont développés afin de mieux reproduire et comprendre les détails mécanistiques des différentes interactions (Boisvert-Adamo et al., 2009). En effet, différentes études ont montré l'insuffisance de la culture en 2D (PSt) pour reproduire l'environnement natif des cellules, plus complexe, dans lequel elles adhèrent, prolifèrent, migrent et se différencient, entourées de la MEC (Dutta & Dutta, 2009). La culture en 2D polarise les cellules de telle sorte que seulement une partie de la membrane cellulaire peut interagir avec la MEC et les cellules voisines, le reste de la cellule étant exposé au milieu de culture. Les caractéristiques morphologiques et migratoires, l'organisation de la Fn, des intégrines et du cytosquelette sont différentes selon que des fibroblastes soient en 3D ou en 2D (Figure 8) (Larsen et al., 2006; Yamada & Cukierman, 2007), et de façon générale, les cellules cultivées en 2D perdent leurs marqueurs de différenciation. En outre, il a été montré que l'environnement 3D induisait une polarité proche de la situation *in vivo* des cellules épithéliales ainsi que leur différenciation (Roskelley & Bissell, 1995).

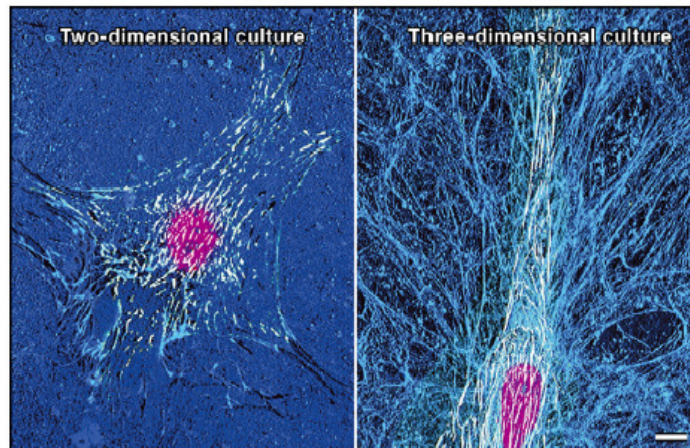


Figure 8 : Morphologie de fibroblastes humains selon qu'ils soient en 2D ou 3D.
On peut observer des différences morphologiques, l'organisation de la matrice de Fn (en bleu) et l'architecture des intégrines $\alpha 5$ (en blanc) (Yamada & Cukierman, 2007).

2.2 Les systèmes de culture en 3D

2.2.1 Les systèmes de culture favorables à l'adhésion cellulaire

Il s'agit notamment de systèmes en hydrogel d'origine naturelle ou synthétique. Les gels naturels sont formés de protéines matricielles comme le collagène, la fibrine, l'acide hyaluronique, ou le matrigel (mélange de protéines matricielles). Les cellules sont cultivées dans le gel, elles s'attachent rapidement à la MEC, prolifèrent et peuvent migrer en 3D (Tibbitt & Anseth, 2009).

D'autres matériaux sont également utilisés, ils peuvent être d'origine biologique comme le chitosan, les fibrilles de soie (Tibbitt & Anseth, 2009) ou synthétiques comme le poly-éthylène-glycol, le poly-vinyl-alcool, l'acide polyglycolique, l'acide polylactique. Ces polymères sont utilisés sous formes de fibres ou d'éponges poreuses dans lesquelles les cellules vont interagir en 3D (Kim & Mooney, 1998). L'adhésion peut être optimisée par ajout de collagène ou autres molécules portant des séquences nécessaires à l'adhésion comme le RGD.

2.2.2 Systèmes de culture défavorables à l'adhésion cellulaire

Il s'agit de revêtements anti-adhésifs sur lesquels les cellules ne peuvent adhérer. Ces surfaces n'adsorbent pas les protéines matricielles, les cellules sont

alors dans l'incapacité de s'attacher, adoptent une morphologie arrondie et s'agrègent.

2.2.2.1 Travaux antérieurs du laboratoire : la culture en agrégats

Des études précédentes dans le laboratoire ont montré que les revêtements anti-adhésifs étaient des modèles intéressants pour étudier les interactions cellules-cellules et cellules-MEC. Il a été observé que le cuprophane (Fauchoux & Nagel, 2002; Gekas et al., 2004), auparavant utilisé comme membrane d'hémodialyse, entraînait l'agrégation des cellules, de même que le polyHEMA ou la double couche de CMC-HPMC appelée CEL (Hindie et al., 2005; Hindie et al., 2006; Velzenberger et al., 2008) qui a été développée dans le laboratoire en collaboration avec le Centre de Transfert de Technologie du Mans. Le polyHEMA est un polymère biocompatible qui empêche l'attachement cellulaire. Il est utilisé pour différentes applications comme les lentilles de contact, les implants orthopédiques et dentaires, ou encore comme substrat pour la culture de cellules non adhérentes (Lombello et al., 2000). Ce revêtement permettant d'obtenir une architecture 3D a été largement utilisé au cours de ces travaux de thèse.

2.2.2.2 Autre système défavorable à l'adhésion cellulaire : la culture en sphéroïdes

Sur du PSt recouvert d'agarose, les cellules forment des agrégats sphériques et symétriques appelés sphéroïdes. Selon les lignées cellulaires, ce type de culture augmente la sécrétion de la MEC dans laquelle les cellules interagissent. Dans ces systèmes qui tentent de reproduire l'hétérogénéité des tumeurs, les cellules au centre du sphéroïde sont nécrotiques contrairement à la couche superficielle où elles prolifèrent et à la couche intermédiaire dans laquelle elles sont hors cycle (Desoize et al., 1998a; Desoize et al., 1998b; Gallardo-Perez et al., 2009).

Les sphéroïdes peuvent être également obtenus en cultivant les cellules sous agitation constante, ce qui inhibe l'adhésion. Pour cela, des systèmes agités en rotation (rollers), ou à balancement (rockers) ou encore des spinners sont utilisés. Il peut aussi s'agir de bioréacteurs contrôlant différents paramètres comme la

température, le volume du milieu de culture et l'agrégation (Feder-Mengus et al., 2008).

Par ailleurs, il existe des surfaces commercialisées à faible pouvoir d'attachement, par exemple ULA (Ultra Low Attachment, Corning®) qui correspond au PSt recouvert d'un hydrogel adsorbant très peu les protéines matricielles, ou encore HydroCell™ Surface (Nunc™) utilisant le même principe.

3 Les interactions cellule-MEC

Les interactions entre la cellule et la MEC sont basées sur les complexes focaux, les adhésions focales et les adhésions fibrillaires. Les complexes focaux correspondent aux adhésions transitoires de la périphérie cellulaire qui impliquent les protéines Rac et Cdc42. Ces structures deviennent plus larges et stables sous l'influence de l'activité de RhoA, elles sont alors appelées adhésions focales. Les adhésions focales sont organisées à partir de la structure des intégrines. Elles permettent la transmission bidirectionnelle de signaux entre les molécules de la MEC et le cytoplasme. Les adhésions fibrillaires, elles, impliquent les fibrilles de Fn, les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et les protéines des adhésions focales (DeMali et al., 2003; Zamir & Geiger, 2001).

Les deux types d'adhésion diffèrent suivant la conformation 2D ou 3D (Figure 9). En effet, en 2D, les adhésions focales impliquent les intégrines $\alpha v \beta 3$, ainsi que la plaque de protéines contenant la paxilline, la vinculine et FAK, tandis que les adhésions fibrillaires impliquent en particulier les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et la tensine. En 3D, il est observé une triple co-localisation paxilline-intégrines $\alpha 5$ -Fn. L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti- $\alpha 5$ inhibe de 90% la réponse cellulaire en 3D, celle de la Fn empêche l'attachement cellulaire à la MEC en 3D de 76%, et de 95% en 2D (Yamada & Cukierman, 2007). Ainsi les structures en 3D sont fortement dépendantes des intégrines $\alpha 5 \beta 1$. L'adhésion en matrice 3D ressemble aux adhésions fibrillaires d'une part en raison de la présence des intégrines $\alpha 5 \beta 1$, et d'autre part par leur dimension.

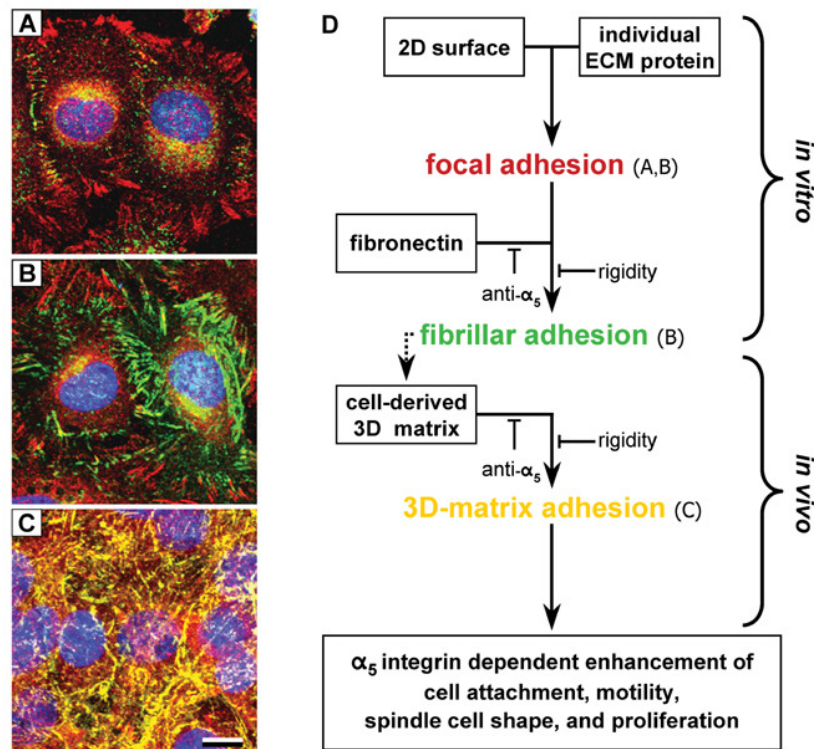


Figure 9 : Etapes au cours du temps de l'adhésion cellules-MEC et les différences entre la situation *in vitro* en 2D et *in vivo* en 3D lors de la formation de MEC par des cellules NIH3T3.

Différents marquages ont été effectués : les intégrines α_5 (vert), la paxilline (rouge) et les noyaux (bleu). Après 40 minutes (A), les adhésions focales sont visibles (paxilline en rouge). A 4 heures (B), on peut voir les adhésions focales (rouge) et les adhésions fibrillaires (intégrines en vert liées à la Fn sécrétée qui commence à s'organiser en fibrilles). Ces deux étapes correspondent à l'adhésion en 2D *in vitro*. Par la suite, la matrice synthétisée s'organise autour des cellules comme c'est le cas *in vivo* en 3D (C : coloration jaune correspondant à la triple co-localisation α_5 -paxilline-Fn). En (D) le récapitulatif des événements (Yamada & Cukierman, 2007).

Dans tous les types de culture (2D ou 3D) les cellules ont besoin d'interagir avec leur environnement. En effet, leur survie dépend de leur capacité à interagir avec la matrice ou avec d'autres cellules (Frisch & Francis, 1994). Meredith et al., (1993) ont montré que sans engagement des intégrines, un processus de mort cellulaire programmée était déclenché dans les cellules endothéliales (HUVECS), mais qu'il pouvait être évité lorsque les cellules se liaient à la Fn via les intégrines $\alpha_5\beta_1$. La liaison entre les cellules, elle, fait en majorité intervenir les cadhérines. Ces dernières sont des glycoprotéines de la super famille des immunoglobulines. L'interruption de la liaison cellule-cellule par l'inhibition des cadhérines conduit à la mort programmée des cellules murines épithéliales de l'intestin, du rein et des glandes mammaires (Grossmann, 2002).

4 L'anoïkis

L'anoïkis est une forme d'apoptose qui résulte de la perte d'interaction ou d'une interaction inappropriée entre la cellule et la MEC, et/ou les autres cellules environnantes (Frisch & Screaton, 2001; Frisch et al., 1996; Meredith et al., 1993; Fouquet et al., 2004; Gilmore, 2005; Kroemer et al., 2005). Meredith et al. (1993) ont observé qu'une connexion à la MEC était nécessaire pour la survie des HUVECS lorsqu'elles étaient cultivées sur agarose. Frisch & Francis (1994) confirmèrent ces résultats avec des cellules épithéliales de rein (MDCK) cultivées sur polyHEMA. Le phénomène a été désigné « anoïkis ». von Herbay & Rudi (2000) ont également montré que lorsque les cellules épithéliales de l'estomac cultivées en 3D étaient détachées de la MEC, elles mouraient rapidement.

Différentes études ont décrit l'implication de l'anoïkis dans de nombreux systèmes physiologiques et pathologiques. L'anoïkis, *in vivo*, régule des événements clés au cours de l'embryogenèse (Grossmann, 2002), et permet le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi, les cellules épithéliales de l'intestin et les kératinocytes entrent en anoïkis afin de permettre le renouvellement des tissus (Fouquet et al., 2004).

Les revêtements anti-adhésifs défavorables à l'attachement cellulaire comme l'agarose, le polyHEMA ou les surfaces cellulosiques constituent ainsi des modèles de culture intéressants *in vitro* pour comprendre les mécanismes de l'anoïkis.

La régulation de l'anoïkis, qui reste un processus apoptotique, se fait par deux voies : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque (Gilmore, 2005). L'apoptose définie en premier lieu par Kerr et al. (1972), est caractérisée par la diminution du volume cellulaire, le bourgeonnement de la membrane plasmique, le maintien de l'intégrité des organelles, la condensation et la fragmentation de l'ADN, puis par une phagocytose qui permet l'élimination des corpuscules de cellules mortes (Segal-Bendirdjian et al., 2005).

4.1 La voie intrinsèque ou mitochondriale

La mitochondrie est au centre de cette voie de l'apoptose car de nombreuses protéines sont relarguées de son espace intermembranaire vers le cytoplasme sous l'influence des signaux apoptotiques (Figure 10). Ces protéines sont le cytochrome c, SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases)/DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Binding protein with Low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), HTRA2 (High-Temperature-Requirement protein A2) et EndoG (Endonuclease G) et OMI/HTRA2 (High-Temperature-Requirement protein A2).

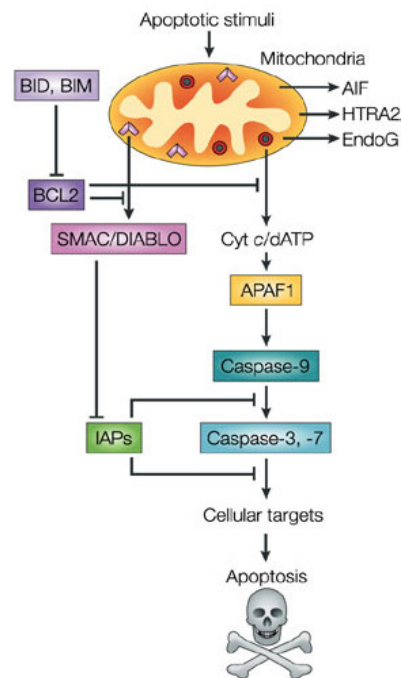


Figure 10 : Représentation schématique de la voie intrinsèque de l'apoptose.

Les signaux apoptotiques entraînent la libération de facteurs apoptogènes et la cascade d'activation des caspases (Riedl & Shi, 2004).

Le cytochrome c libéré se lie au facteur Apaf-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) et l'active dans le cytoplasme. Ce dernier change alors de conformation et peut se lier à l'ATP pour former un complexe appelé apoptosome (Figure 11). Le complexe formé va déclencher une cascade d'activation des Cysteines-dépendent aspartate-spécifique protéase (Caspases) en commençant par la caspase 9, puis les caspases 3 et 7. La libération depuis la mitochondrie des facteurs apoptogènes est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (Segal-Bendirdjian et al., 2005), les membres anti-apoptotiques (tels que Bcl-2, BclxL, Mcl1) l'inhibent, alors que les membres pro-apoptotiques (tels que Bax, Bad, Bid, Bak) le stimulent.

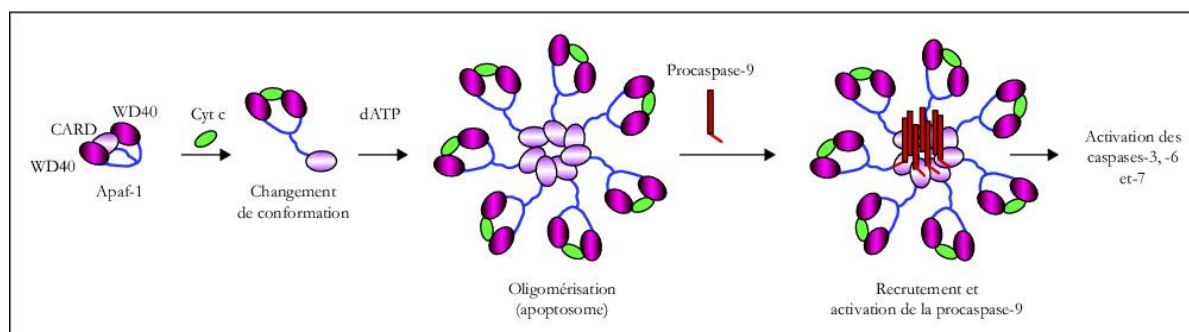


Figure 11 : Formation de l'apoptosome au cours de l'apoptose.

Le cytochrome c va se fixer sur la région carboxy-terminale d'Apaf-1, portant les domaines WD40.

Cette fixation induit un changement de conformation de cette protéine qui, en présence d'ATP, s'oligomérisse en une structure heptamérique appelée apoptosome. Les sept sous-unités d'Apaf-1 recrutent par leur domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) plusieurs procaspases 9 qui vont alors être activées. D'après Ségal-Bendirdjian et al., 2005.

4.2 La voie extrinsèque de l'apoptose ou des récepteurs dits «à domaine de mort»

Elle est initiée par la liaison d'un ligand extracellulaire de la famille du TNF (FasL, TNF, TRAIL) à son récepteur à la surface cellulaire. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires glycosylées qui comportent une partie extracellulaire constituée de deux à six domaines riches en cystéine et d'une partie intracellulaire contenant un domaine appelé « domaine de mort » (DD : Death Domain) (Segal-Bendirdjian et al., 2005) (Figure 12).

La fixation du ligand spécifique conduit au regroupement des récepteurs à la surface cellulaire et permet l'amplification du signal apoptotique. En effet, cela induit un changement de conformation du récepteur au niveau intracellulaire, expose les domaines DD et DED (Death Effector Domain) pour former un complexe appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Les caspases initiateuses 8 se fixent à DISC par l'intermédiaire des protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated Death Domain protein) avec lesquelles elles interagissent *via* les domaines DED, entraînant ainsi leur auto-activation. Après une cascade d'évènements biochimiques, la signalisation aboutit aux caspases effectrices qui vont finalement cliver des protéines cellulaires bien définies, conduisant aux caractéristiques typiques et morphologiques de l'apoptose.

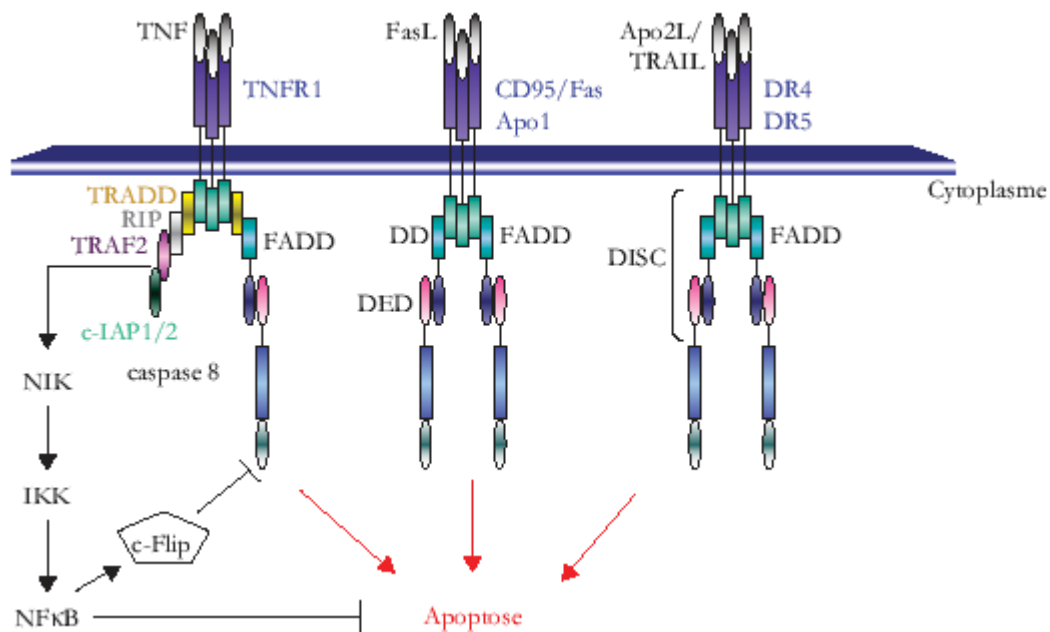


Figure 12 : Voie extrinsèque de l'apoptose.

Trimérisation des récepteurs à « domaine de mort » Fas, TNFR1 ou DR5, DR4/TRAIL permettant le recrutement de différentes protéines adaptatrices qui vont activer la signalisation apoptotique via l'activation de la caspase 8. On peut observer une voie de survie initiée par le TNF qui empêche le recrutement de la caspase 8 (Ségal-Bendirdjian et al, 2005).

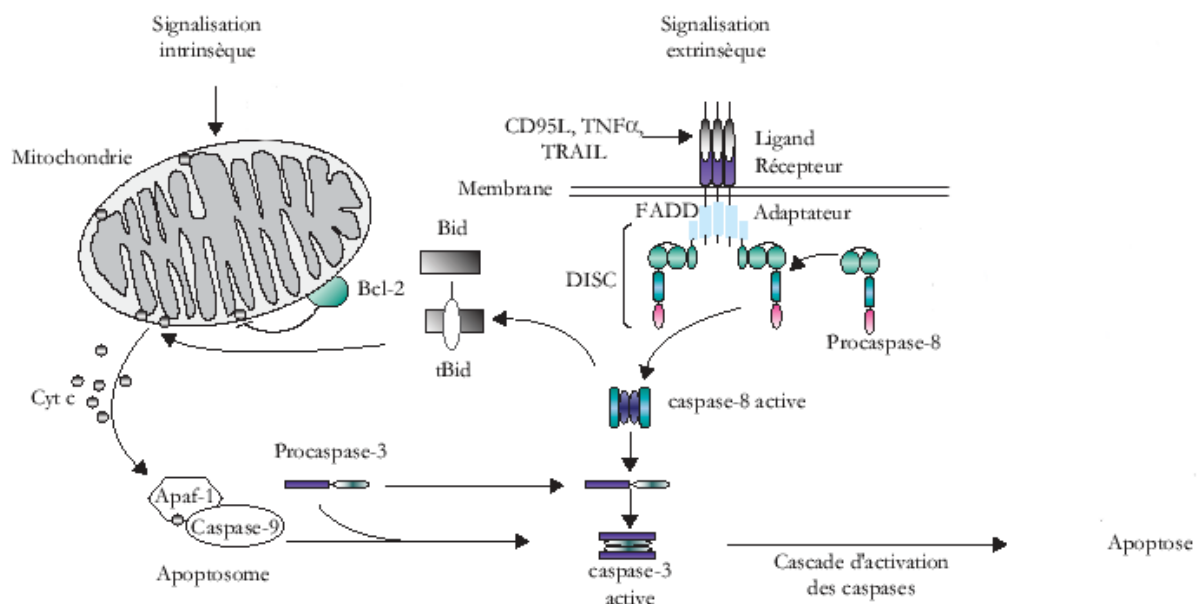


Figure 13 : Signalisation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Malgré la différence dans le mode d'initiation, les deux voies majeures de l'apoptose convergent vers l'activation des caspases. Modifié d'après Ségal-Bendirdjian et al., 2005.

4.3 Les caspases

Les caspases, protéines centrales de la réponse apoptotique, constituent une famille de 14 enzymes conservées. Toutes les caspases sont produites comme des zymogènes catalytiquement inactifs appelés procaspases qui doivent être activés durant l'apoptose. La procaspase est constituée :

- d'un prodomaine de taille variable au niveau de l'extrémité N-terminale (Jin & El-Deiry, 2005; Thornberry & Lazebnik, 1998). Il joue un rôle dans les interactions protéines-protéines.
- d'une grande sous-unité p20 (~20 kDa) dans laquelle se trouve le site actif de l'enzyme contenant la cystéine (au sein du motif QACXG).
- d'une petite sous-unité p10.

Les caspases sont divisées en 3 groupes (Figure 14) :

- les caspases initiateuses comprenant les caspases 2, 8, 9 et 10. Ces enzymes possèdent un long prodomaine contenant un domaine DED et un domaine CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain).
- les caspases effectrices correspondant aux caspases 3, 6, et 7. Ces enzymes sont activées par les caspases initiateuses et le granzyme B.
- les caspases inflammatoires incluant les caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13.

La caspase 14 est localisée dans la peau et exprimée lors de la différenciation des kératinocytes.

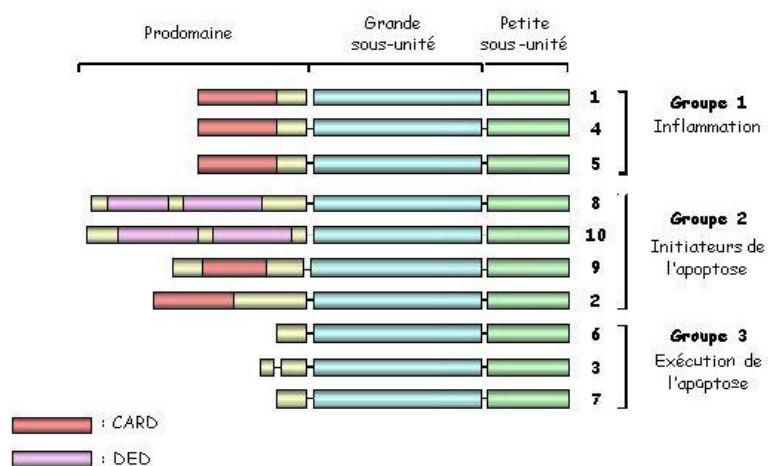


Figure 14 : Structure et classification des caspases.
D'après Thornberry & Lazebnik., 1998.

4.3.1 Activation des caspases

Lors de son activation, la caspase va perdre le prodomaine après le clivage des deux sous-unités au niveau du résidu Asp (Figure 15), puis s'assembler en hétérodimères. Deux hétérodimères vont ensuite s'associer pour former la caspase active, composée de deux grandes sous-unités et deux petites. Puis la caspase va s'auto-activer et/ou être activée par d'autres caspases. Ainsi, les caspases effectrices encore à l'état de zymogène, comme la caspase 3, sont activées par les caspases initiatrices, comme la caspase 9. Les caspases initiatrices, elles, s'auto-activent soit par un rapprochement des procaspases (Algeciras-Schimmich et al., 2002; Muzio et al., 1998), ce qui est le cas des caspases 2, 8 et 10, soit via l'intervention de différents complexes, comme l'apoptosome qui facilite l'activation de la procaspase 9, le clivage protéolytique n'étant pas suffisant. Les caspases effectrices peuvent par ailleurs activer d'autres caspases de façon rétroactive (Van de Craen et al., 1999).

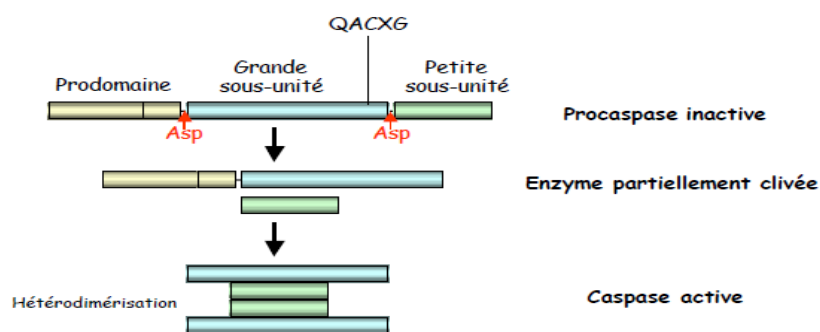


Figure 15 : Activation des caspases.
D'après Thornberry & Lazebnik., 1998.

4.3.2 Substrats des caspases

Les caspases ont une spécificité de clivage de leurs substrats. Elles reconnaissent une séquence de quatre acides aminés se terminant par l'aspartate et clivent après ce dernier résidu. Les caspases sont classées en 3 groupes selon le site de reconnaissance du substrat (Figure 14).

Il existe plus de 60 substrats qui peuvent être répartis en différents groupes (Chang & Yan, 2000) selon leurs fonctions :

- Mort cellulaire

Bcl-2, Bcl-xL, Bid, CrmA, IAP, p28 Bap31, p35, procaspases...

- Régulation du cycle cellulaire

Cdc27, Cycline A, MDM2, p21 (Cip1/Waf1), p27 (Kip1), PITSLRE kinases, pRb, Wee1, phosphatase...

- Cytosquelette

Actine, β -Caténine, Gelsoline, Keratine-18 et -19, Lamines...

- Précurseurs de cytokines

Pro-IL-1b, Pro-IL-16, Pro-IL-18 (IGIF)...

- Métabolisme de l'ADN

DNA-dependent protein kinase (DNA-PK), DNA replication complexe C (DSEB/RFC140), ICAD, PARP, Topoisomérase 1...

- Métabolisme de l'ARN

Eukaryotic initiation factor 2a, Protéines ribonucléaires C1 et C2...

- Transduction du signal

Akt/PkB, Calmodulin-dependent kinase IV, c-Raf, Fyn tyrosine kinase, FAK, MEKK1, PAK-2/hPAK65, Proteine kinase C delta, Proteine kinase C theta, Protein kinase C-related kinase 2, Phosphatase 2A, Ras GTPase activating proteine...

- Facteurs de transcription

Heat shock factor, I κ B-a, NF-kB (p50, p65), STAT1...

- Autres

Hsp90, Phospholipase A2, Transglutaminase...

Les caspases régulent ainsi, entre autres, les protéines pro ou anti-apoptotiques (famille Bcl-2), les modifications morphologiques comme la condensation de l'ADN (protéines du cycle cellulaire), le rétrécissement, le détachement de la MEC et la perte de contact avec les cellules voisines (protéines du cytosquelette), l'inhibition des voies de survie (FAK, AKT...).

4.3.3 La régulation des caspases

Les caspases peuvent être régulées par différents processus (Cance et al., 2000; Jin & El-Deiry, 2005) :

- régulation transcriptionnelle : régulation de l'expression des gènes des caspases par dérégulation des facteurs de transcription
- régulation post-traductionnelle : nitrosylation, ubiquitination, oxydation et phosphorylation (par AKT ou ERK)
- les inhibiteurs naturels comme p35 et CmA, FLIP, IAPs (les plus importants sont XIAP, IAP1, IAP2 et la survivine)
- les protéines de la superfamille Bcl-2 (empêchent la libération du cytochrome c ou la formation de l'apoptosome)

Bien que les caspases soient associées souvent à l'apoptose il est à noter que des mécanismes de mort cellulaire ne faisant pas intervenir ces enzymes existent. Par ailleurs, les caspases sont associées à d'autres processus comme la différenciation du muscle squelettique ou des kératinocytes (Hail et al., 2006; Segal-Bendirdjian et al., 2005).

5 Une dérégulation de l'apoptose : la cellule cancéreuse

L'apoptose est indispensable pour le fonctionnement normal des organismes multicellulaires. En effet, elle joue un rôle essentiel dans le développement, le maintien et le renouvellement tissulaire (développement embryonnaire, régulation du système immunitaire, morphogenèse) et la destruction des cellules potentiellement dangereuses (Hail et al., 2006; Segal-Bendirdjian et al., 2005; Vachon, 2006). Toute dérégulation de ce processus conduit à de nombreux désordres pathologiques comme les maladies neurodégénératives (excès de mort cellulaire) ou le cancer (défaut de mort cellulaire) (Michel, 2003).

Il existe plus de 100 types de cancers et des sous types de tumeurs retrouvés dans des organes spécifiques (Hanahan & Weinberg, 2000). Six altérations essentielles dans les cellules conduisent de façon collective à la croissance tumorale (Figure 16) : l'autosuffisance en facteurs de croissance, l'insensibilité aux signaux

anti-prolifératifs, le potentiel illimité de réplication, l'angiogenèse, l'échappement à l'apoptose et la capacité d'invasion et de métastase.

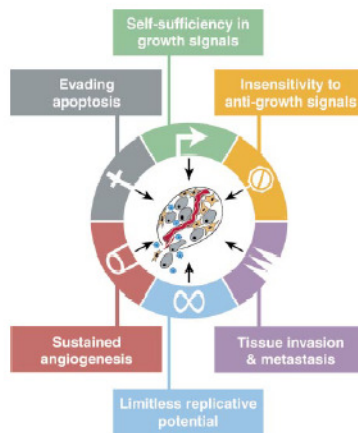


Figure 16 : Caractéristiques du cancer.
D'après Hanahan & Weinberg, 2000.

5.1 Un type de cancer : le mélanome

Le mélanome est probablement le cancer le plus agressif des cancers de la peau et de tous les cancers en général (Gaggioli et al., 2007; Lomas et al., 2008) avec un fort potentiel métastasant.

En France, le mélanome représente 2.6% des cancers incidents (Institut National du Cancer, rapport 2007). Il se situe au 13ème rang des cancers chez l'homme et au 7^{ème} rang chez la femme. Son incidence double tous les dix ans. Entre 1978 et 2000 (en France), le taux annuel moyen de l'évolution de l'incidence est de + 5.93% chez l'homme et + 4.33% chez la femme. Dans le même temps, la mortalité augmente régulièrement, tant chez l'homme (+ 2.86%) que chez la femme (+ 2.19%). Dans le monde, 2 à 3 millions de cancers cutanés, et au moins 132 000 cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année, avec une forte augmentation de ces cancers depuis les années 70 (données OMS). Le mélanome malin est de bon pronostic lorsqu'il est détecté tôt, et à stade égal, il est meilleur chez la femme.

Le mélanome est dû à une transformation tumorale des mélanocytes de l'épiderme qui produisent un pigment cellulaire : la mélanine. Cependant, les mélanocytes non cutanés comme ceux de l'iris (mélanocytes uvéaux) ou de la membrane interne des muqueuses peuvent conduire respectivement à des mélanomes oculaires appelés mélanomes uvéaux ou mélanome des muqueuses

(Lomas et al., 2008). A l'origine de la pathologie, on peut noter une forte exposition aux rayons solaires, particulièrement aux UVA (320-400nm) et aux UVB (290-320nm). Le risque de ce cancer cutané est également lié au phototype de l'individu : il est particulièrement élevé chez les personnes à peau claire, cheveux blonds ou roux. Les autres facteurs de risque tiennent à l'âge (pic entre 30 et 50 ans) et au sexe, des cas de mélanomes familiaux existent cependant.

Les lésions primaires progressent vers la malignité tumorale en plusieurs étapes (Lomas et al., 2008) (Figure 17) :

- la formation de naevi acquis ou congénitaux non dysplasiques appelés naevi bénins. Cette étape n'est pas systématique car certains mélanomes se développent directement sur la peau. Un naevus est un ensemble de mélanocytes transformés (précancéreux) qui ne se divisent pas, ne meurent pas et peuvent devenir malins.
- les naevi dysplasiques.
- la phase de croissance radiale qui correspond au développement du mélanome sur le naevus, mais la tumeur reste confinée dans l'épiderme.
- la phase de croissance invasive verticale correspondant à l'extension du mélanome vers le derme. A cette étape les cellules acquièrent la capacité de résistance à l'anoïkis et donc le pouvoir de métastaser.
- le mélanome métastatique.

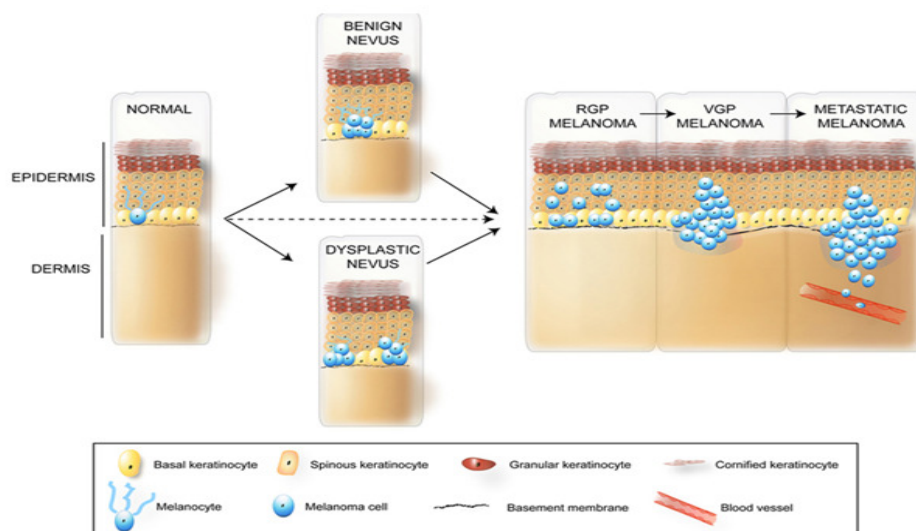


Figure 17 : Développement du mélanome malin.

Les différents stades de développement du mélanome métastatique à partir de naevi. RGP correspond à la phase de croissance radiale et VGP à la phase de croissance verticale (Lomas et al, 2008).

Les différentes étapes de développement du mélanome sont accompagnées d'altérations génétiques des voies de signalisation régulant la croissance ainsi que des changements moléculaires dans les interactions cellules-cellules et cellule-MEC (Bogenrieder & Herlyn, 2002; Li et al., 2002; Li et al., 2001) (Figure 18).

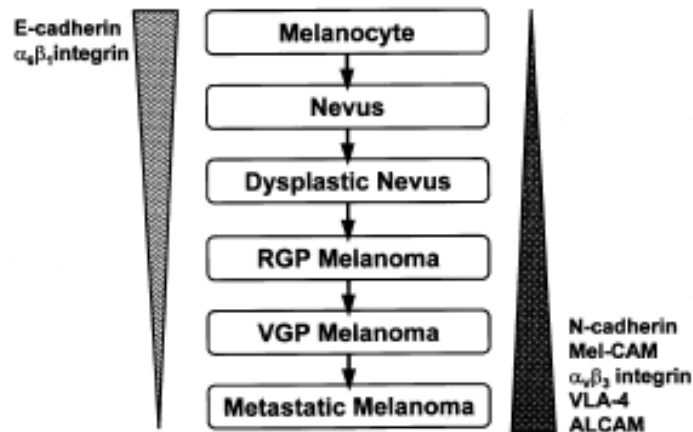


Figure 18 : Modification de l'expression des protéines d'adhésion cellulaire durant le développement du mélanome.

L'expression des intégrines $\alpha\beta 1$ et des cadhérines E disparaît au fur et à mesure du développement métastatique. Ces molécules sont remplacées par les cadhérines N, les intégrines $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) et les molécules d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines Mel-CAM et ALCAM. Ces transformations confèrent aux cellules tumorales de nouvelles propriétés d'adhésion nécessaires à la progression tumorale (Li et al, 2002).

Même si la tumeur primaire peut être retirée chirurgicalement avec succès, il n'existe pas, à ce jour, de traitement pleinement satisfaisant pour le mélanome malin (Gaggioli et al., 2007; Houghton & Polsky, 2002) car les mécanismes moléculaires du développement métastatique ne sont pas entièrement identifiés. Cependant les voies de survie des MAPKinas (Ras/Raf/MEK/ERK) et de PI3K/AKT semblent jouer un rôle critique du fait de leur activation anormale durant le processus (Smalley, 2009; Smalley et al., 2006).

5.2 Métastases et résistance à l'anoïkis

Pour métastaser, les cellules cancéreuses se détachent de leur site primaire, migrent dans les systèmes lymphatique et circulatoire, s'implantent dans un autre site et initient la croissance tumorale (Figure 19). Dans un contexte normal, les cellules ayant perdu le contact avec la MEC ou avec les cellules voisines sont induites en anoïkis. La cellule tumorale qui acquiert le potentiel métastatique

développe donc des mécanismes de résistance à l'anoïkis pour survivre après le détachement du foyer primaire (Simpson et al., 2008; Swan et al., 2003). La résistance à l'anoïkis est, de ce fait, une des caractéristiques de la transformation tumorale car elle favorise la migration et le ré-attachement et donc la colonisation de sites secondaires. Cette résistance a été décrite dans plusieurs types de cancers (Chiarugi & Giannoni, 2008; Diaz-Montero et al., 2006).

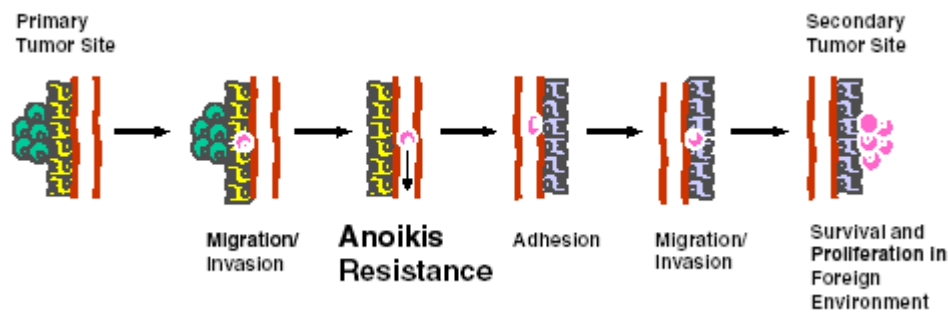


Figure 19 : Les étapes de la métastase cancéreuse.

La résistance à l'anoïkis permet la migration des cellules cancéreuses du site primaire, leur survie en absence d'adhésion et leur croissance dans un autre environnement (Simpson et al, 2008).

Les cellules résistantes à l'anoïkis présentent une altération structurale et numérique des chromosomes. De même, elles montrent de nombreux dysfonctionnements dans les mécanismes moléculaires régulant l'adhésion médiée par les intégrines, par exemple la voie de signalisation de PI3K/AKT.

In vitro, la prolifération des cellules tumorales même sur des supports défavorables à l'attachement cellulaire, reste l'une des principales caractéristiques de la transformation maligne qui mime assez bien les conditions *in vivo* (Rak et al., 1999). En effet, la capacité des cellules tumorales à se multiplier en suspension ou sous forme d'agrégats (sur de l'agarose ou le polyHEMA) est liée à un contrôle anormal des processus physiologiques de la mort programmée en faveur de l'activation continue des voies de survie. De nombreuses études ont montré une corrélation entre la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses *in vitro* et leur capacité à former des tumeurs *in vivo* (Rak et al., 1999). A l'inverse, il a été montré que les cellules normales dont on empêchait l'adhésion et l'étalement s'arrondissaient, s'agrégeaient et cette morphologie régulait négativement leur survie. Ces cellules s'orientaient ainsi vers l'anoïkis (Garcia et al., 1999). Par exemple, Nelson & Chen (2002) ont démontré que la prolifération des cellules endothéliales était inhibée lorsque les cellules demeuraient arrondies sur des surfaces auto assemblées. Les travaux du laboratoire ont également montré que des

pré-ostéoblastes MC3T3, ainsi que les fibroblastes Swiss 3T3 s'orientaient vers l'apoptose lorsqu'ils étaient cultivés en 3D sur CEL ou polyHEMA (Velzenberger et al., 2008), contrairement aux cellules de mélanome hautement métastatique B16F10.

Kupferman et al. (2007) ont observé qu'il y avait une différence dans l'expression des gènes pour des cellules résistantes et sensibles à l'anoïkis selon qu'elles soient en 2D ou 3D. La culture en 3D correspondrait effectivement à des conditions mieux contrôlées et proches de la situation *in vivo* (Feder-Mengus et al., 2008; Mueller-Klieser, 1997). Les cellules cancéreuses cultivées en 3D présentent de nombreuses différences par rapport à la culture en 2D. Il est observé, entre autres, un changement des profils métaboliques (augmentation de la glycolyse conduisant à une production importante d'acide lactique), la capacité d'invasion (perte de la polarité et changement morphologique associés à la progression tumorale *in vivo*), la sensibilité à différents traitements (faible réponse à la radiothérapie et la chimiothérapie), l'expression différente des gènes (augmentation de *VEGF* impliqué dans l'angiogenèse) (Feder-Mengus et al., 2008). Depuis, les méthodes de culture défavorables à l'adhésion cellulaire sont utilisées afin d'analyser la transformation maligne et la progression tumorale (Feder-Mengus et al., 2008).

5.3 Les voies de signalisation intracellulaire de l'adhésion, de la prolifération et de la survie

5.3.1 FAK

5.3.1.1 Structure et activation

FAK est une protéine importante dans la transmission du signal relayé par les intégrines. Elle est localisée préférentiellement près de ces dernières, au niveau du complexe d'adhérence et est impliquée dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires comme la migration et la survie (Cornillon et al., 2003; Golubovskaya et al., 2002). FAK appartient à la famille des kinases de l'adhérence focale correspondant à des protéines tyrosines kinases (PTK) cytoplasmiques riches en proline, dépourvues de récepteur membranaire. FAK est une protéine de 125kDa, elle est divisée en trois domaines (Figure 20) :

- un domaine amino-terminal qui contient le domaine FERM (4.1 Ezrine Radixine Moésine) impliqué dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires. Ce domaine lie FAK à la sous-unité β des intégrines, cependant, cette liaison n'est pas indispensable à l'activation de FAK par les intégrines.
- un domaine carboxy-terminal qui contient la région FAT (Focal Adhesion Targeting) nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence et au niveau duquel se lient la taline et la paxilline. La taline est le médiateur de l'activation de FAK, il permet son interaction avec les filaments d'actine.
- un domaine central portant l'activité catalytique.

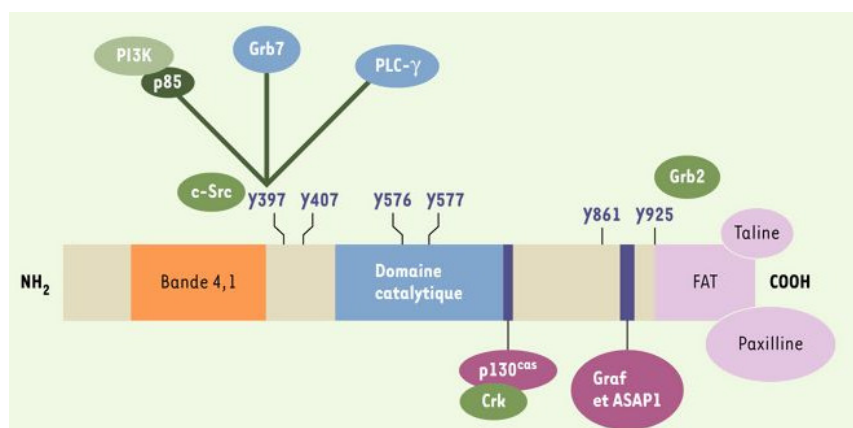


Figure 20 : Structure de FAK.

On peut observer les trois domaines de la kinase, les résidus tyrosines qui vont être phosphorylés au cours de son activation et les points d'interactions avec différentes protéines. D'après Cornillon, 2003.

Pour son activation, FAK s'autophosphoryle au niveau du résidu tyrosine 397, ce qui libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un domaine SH2 comme Src. Ces protéines vont ensuite phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique (Y407, Y576, Y577) ainsi que dans la région carboxy-terminale (Y861, Y925). La phosphorylation de Y576, Y577 augmente l'activité enzymatique de FAK. Cette dernière, une fois activée, va mettre en route une cascade d'activation des voies régulatrices intracellulaires comme ERK/MAPK, PI3K et les réarrangements du cytosquelette.

5.3.1.2 Les fonctions de FAK dans la survie cellulaire, l'adhésion, l'étalement et l'invasion tumorale

FAK est impliquée dans la régulation de l'étalement et la motilité cellulaire via son action sur les protéines RhoGTPases (Figures 6 et 7). Les fibroblastes portant une inhibition du gène de la kinase présentent un dysfonctionnement dans l'étalement et la migration intégrines-dépendante.

L'une des principales fonctions de FAK est la protection contre l'apoptose. Frisch et al. (1996) ont montré qu'un mutant constitutivement activé de FAK protégeait les cellules MDCK de l'anoïkis. Dans le même contexte, Zhang et al. (2004) ont montré une augmentation de l'expression de FAK dans les agrégats de cellules cancéreuses cultivées sur polyHEMA, à l'inverse des cellules isolées qui entraient en anoïkis et dans lesquelles l'expression de la protéine diminuait. L'inhibition par des siRNA de FAK empêche l'adhésion cellulaire, la migration et la prolifération des cellules cancéreuses (Tsutsumi et al., 2008). L'activation de la kinase est corrélée à l'augmentation de l'adhésion cellulaire. (Hess et al., 2005) ont mis en évidence l'implication de FAK dans le développement du mélanome agressif car elle favoriserait l'invasion et la migration. En effet, FAK est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs et ce phénomène surviendrait lors des premières étapes du développement tumoral (Cance et al., 2000; Golubovskaya et al., 2002). Il a été observé un taux important d'ARNm de FAK dans des cancers invasifs et métastatiques (Park et al., 2001). De plus, Golubovskaya et al. (2005) ont montré une interaction directe entre le domaine N-terminal de FAK et le gène suppresseur de tumeur p53, qui supprimerait l'apoptose médiée par p53 et inhiberait son activité transcriptionnelle.

FAK, une fois activée, recrute et active différentes protéines à domaine SH2 comme la sous-unité p85 de la kinase PI3K (Phosphatidylinositol 3' kinase) dont l'activation conduit à celle de la kinase AKT. Une autre protéine à domaine SH2 est Grb2 dont la liaison avec FAK conduit à l'activation des MAP Kinases.

5.3.2 La voie de survie PI3K/AKT

5.3.2.1 PI3K

Cette kinase appartient à la famille des phospho-inositide-kinases (PtdIns-kinases) comprenant en plus les PI4Ks et les PI5Ks. Les PI3K sont divisées en 3 classes (I, II et III) selon leur structure primaire, leur mode de régulation et leur spécificité de substrat. Seules les molécules de la classe I seront abordées dans ce rapport. Les PI3Ks phosphorylent les phosphatidylinositols des membranes au niveau de l'hydroxyle en position 3 du groupe inositol PtdIns, PtdIns 4P (ou PI4P), PtdIns(4,5)P₂ (ou PIP₂) conduisant à la formation de PtdIns 3P, PtdIns 3,4P₂ (ou PI3,4-P₂) et de 3,4,5P₃ (ou PIP₃), (Hawkins et al., 2006) (Figure 21).

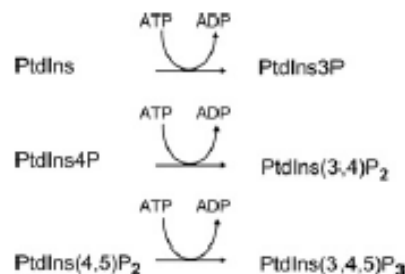


Figure 21 : Réactions catalysées par PI3K et les substrats générés.

D'après Hawkins et al, 2006.

PI3K forme un complexe hétérodimérique composé d'une sous unité catalytique de 110 kDa (isoformes p110 α , p110 β ou p110 δ) recrutée au niveau de la membrane plasmique par la seconde sous unité qui est régulatrice/adaptatrice et a une taille de 85 kDa (p85 α , p85 β ou leurs isoformes tronquées p55 α , p55 γ , p50 α). Cette dernière contient un domaine SH3, deux domaines SH2 et des motifs riches en résidus proline. Les domaines SH2 permettent les interactions avec des protéines portant des tyrosines phosphorylées (comme FAK) au niveau d'une séquence consensus pY-X-XM.

Les PIP₃ entraînent l'activation et la phosphorylation de différentes protéines par liaison directe à leur domaine PH, c'est le cas pour la sérine thréonine kinase AKT.

L'implication des PI3Kinases a été montrée dans la régulation de la survie cellulaire, l'expression de gènes, le métabolisme et le réarrangement du

cytosquelette, la transformation tumorale et l'invasion (Lomas et al., 2008). PTEN (suppresseur de tumeur) est une phosphatase spécifique qui régule négativement l'activité de PI3K car elle génère PIP2 en déphosphorylant PIP3. La perte ou l'inactivation de PTEN conduit à l'activation constitutive de PI3K. La kinase est par ailleurs activée par l'oncogène Ras. Une mutation de PTEN (10%) et Ras est cependant observée dans les mélanomes.

5.3.2.2 La kinase AKT

La sérine-thréonine kinase AKT (ou PKB) appartient à la famille des protéines kinases AGC. Cette famille, qui comprend environ 75 protéines kinases, est nommée ainsi car elle inclut les protéines kinases dépendantes du cAMP, cGMP et PKC (Manning et al., 2002). Le gène *AKT* a été initialement défini comme étant l'homologue cellulaire de l'oncogène *v-AKT* issu d'un rétrovirus transformé (AKT8) de lymphome de cellules T murines. Ce gène a été cloné par différentes équipes qui recherchaient des protéines homologues de PKC et PKA, d'où les dénominations AKT/PKB.

Il existe trois isoformes d'AKT : AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) et AKT3 (PKB γ) codées par 3 gènes différents (dans les cellules de mammifère) qui ont 85% d'homologie au niveau de leur séquence. Leurs produits protéiques ont la même organisation structurale (Bellacosa et al., 2005; Bellacosa et al., 2004; Bellacosa et al., 1991).

a Structure et activation d'AKT

AKT possède différents domaines (Figure 22) :

- Un domaine PH en position C-terminale qui peut interagir avec les PIP3 membranaires produits par la PI3K et d'autres protéines kinases.
- Le domaine catalytique (entre les acides aminés 148 et 411) qui porte la boucle d'activation contenant les résidus Thr308, 309 ou 305 respectivement pour AKT1, AKT2 ou AKT3.
- Une extension en position C-terminale d'environ 40 acides aminés qui comprend le motif hydrophobe HM (FXXF/YS/TY/F, X étant un acide aminé

quelconque). Ce dernier contient les résidus conservés Ser473, 474 ou 472 respectivement pour AKT1, AKT2 et AKT3. La phosphorylation au niveau du résidu Ser dans le motif HM (de même que Thr du domaine kinase) est nécessaire à l'activation complète de la kinase. Le motif HM sert de modulateur allostérique de la catalyse enzymatique car il stabilise la conformation de la forme active d'AKT (Woodgett, 2005).

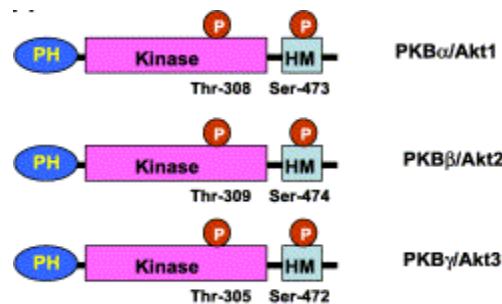


Figure 22 : Structure des trois isoformes d'AKT.

PH = domaine d'homologie à la pleckstrine, Kinase = domaine catalytique, HM = motif hydrophobe situé au niveau C-terminal. Les sites de phosphorylation dans la boucle d'activation au niveau des domaines kinases et HM sont indiqués (Hanada et al., 2004).

L'activation complète d'AKT fait intervenir plusieurs protéines et implique sa translocation à la membrane puis sa phosphorylation (Hanada et al., 2004). Sous l'influence de différents stimuli tels que les facteurs de croissance (EGF, PDGF, bFGF, IGF-1), les cytokines, l'insuline ou les interactions cellules-MEC via les intégrines, PI3K est recrutée au niveau de la membrane plasmique (Bellacosa et al., 2004). Cette dernière va générer des PI-3,4,5-P3 et des PI-3,4-P2 ayant une forte affinité pour le domaine PH d'AKT et permettant sa translocation du cytoplasme vers la membrane plasmique. Une fois localisée à la membrane, AKT est doublement phosphorylée, ce qui constitue son activation complète :

- au niveau du résidu Thr (situé dans la boucle d'activation) par une autre kinase AGC possédant un domaine PH : PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase). PDK1 est également activée par les lipides PIP3, ce qui par l'intermédiaire d'un changement de conformation de la kinase, favorise la seconde phosphorylation.
- AKT est ensuite phosphorylée au niveau de la Ser (située dans le domaine HM) par PDK2 (Bellacosa et al., 2004), une protéine très controversée, car différentes autres protéines ont été identifiées pour le même rôle, comme ILK1

(Hanada et al., 2004). Contrairement aux autres AGC kinases, la phosphorylation du résidu Ser473 n'est pas nécessaire pour la phosphorylation de la Thr308 par PDK1, cependant, elle permet d'accélérer l'interaction avec PDK1.

b Les fonctions d'AKT

Les isoformes d'AKT sont impliquées dans de nombreuses réponses cellulaires incluant la croissance, la survie, la transcription, le cycle cellulaire, l'angiogenèse, la migration, l'apoptose et le métabolisme (Bellacosa et al., 2004; Datta et al., 1999; Hanada et al., 2004) (Figure 23). Toutes ces fonctions s'expliquent par le grand nombre de substrats (plus de 50) existant ainsi que par leur spécificité (Figure 23). En effet, AKT catalyse la phosphorylation de résidus sérine ou thréonine au niveau des séquences consensus RXRXXS/T (X étant un acide aminé quelconque et S/T le site de phosphorylation) des protéines cibles.

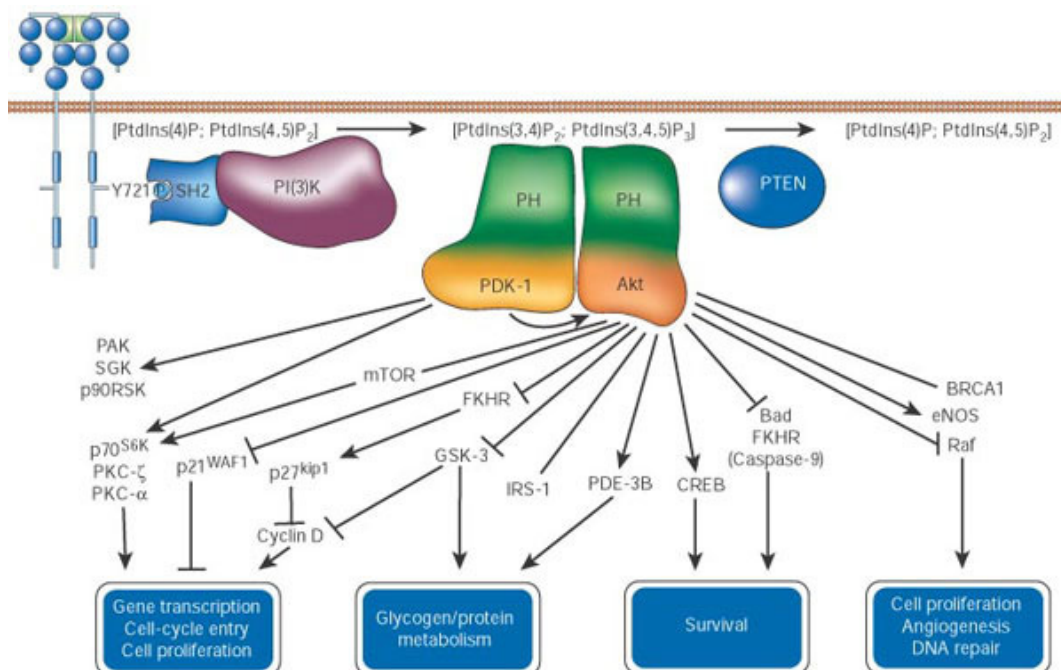


Figure 23 : Quelques voies de signalisation d'AKT.
(Blume-Jensen & Hunter, 2001).

AKT, avec ses nombreuses fonctions, est reconnue comme facteur de survie. En effet, la kinase empêche la libération de cytochrome c par la mitochondrie et inactive les facteurs de transcription Forkhead qui induisent l'expression d'éléments

pro-apoptotiques tels que Fas ligand. De plus AKT phosphoryle et inactive les facteurs pro-apoptotiques BAD et la pro-caspase 9. AKT active I κ B Kinase, un régulateur positif de NF κ B impliqué dans la transcription de gènes pro-apoptotiques.

Par ailleurs, AKT phosphoryle et inactive GSK3 (Glycogene Synthase Kinase 3) et stimule ainsi la synthèse de glycogène, car GSK3 phosphoryle et inactive la glycogène synthase en réponse à l'insuline (Hanada et al., 2004). D'autres cibles dans la régulation du métabolisme sont le transporteur du glucose GLUT-4 ou p70^{S6K}. Ces différentes régulations entraînent l'augmentation du taux de glucose intracellulaire.

AKT affecte la progression du cycle cellulaire en modulant l'activité de régulateurs de la prolifération et du cycle cellulaire tels que cycline/CDK (par exemple la cycline D), p21^{cip1/waf1}, p27^{kip1} ou MDM2.

En outre, AKT joue un rôle dans l'adaptation à l'hypoxie et au manque de nutriments dans les tumeurs. Elle permet le développement angiogénique et le contrôle de la pression systémique. La kinase active également l'enzyme e-NOS (Endothelial Nitric Oxide Synthase) qui produit le monoxyde d'azote NO, facteur endogène vasodilatateur.

AKT permet l'invasion et les métastases tumorales car elle stimule la sécrétion des MétalloProtéases matricielles (MMP) qui dégradent la MEC et permet le détachement des cellules tumorales du foyer primaire.

Les quelques activités tumorigéniques citées plus haut suggèrent qu'AKT seule pourrait induire le cancer (Testa & Bellacosa, 2001). Les transformations oncogéniques sont réparties entre les trois isoformes, qui semblent être impliquées dans des cancers spécifiques. L'amplification d'*AKT1* a été observée dans le cancer humain de l'estomac et son activité est souvent augmentée dans les cancers de la prostate et du sein, tout ceci associé à un faible pronostic (Sun et al., 2001). La surexpression d'*AKT2* a été montrée dans les tumeurs et les cellules ovariennes (Sun et al., 2001), sa surexpression entraînerait également la transformation des fibroblastes NIH-3T3. *AKT3*, qui n'est pas complètement décrite semble être impliquée dans le mélanome (Russo et al., 2009).

Ce sont les dérégulations de la voie de signalisation d'AKT qui participent le plus à la tumorigenèse, plutôt que les modifications ou mutations du gène. A l'origine des dérégulations de la kinase, on observe souvent des mutations, des délétions du gène de PTEN qui est un inhibiteur de l'activité d'AKT, ou encore l'activation

constitutive et/ou la surexpression des activateurs de la kinase tels que la PI3K (Mitsiades et al., 2004).

5.3.3 La voie des MAP Kinases

Les MAP (Mitogen-Activated Protein) kinases appartiennent à la grande famille des sérine/thréonine kinases qui fonctionnent en cascade en réponse à un stimulus. Elles sont activées par de multiples signaux comme les facteurs de croissance, les mitogènes, les hormones, les cytokines, ou encore le stress. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la différenciation, la division, la motilité et l'apoptose. Les MAP Kinase Kinase Kinases (MAPKKK) activent les MAP Kinase Kinases (MAPKK) qui ensuite activent les MAP Kinases (MAPK). Les différentes voies de signalisation des MAPK comprennent celles de p38, JNK, ERK1/2 (Figure 24), (Peyssonnaud & Eychene, 2001).

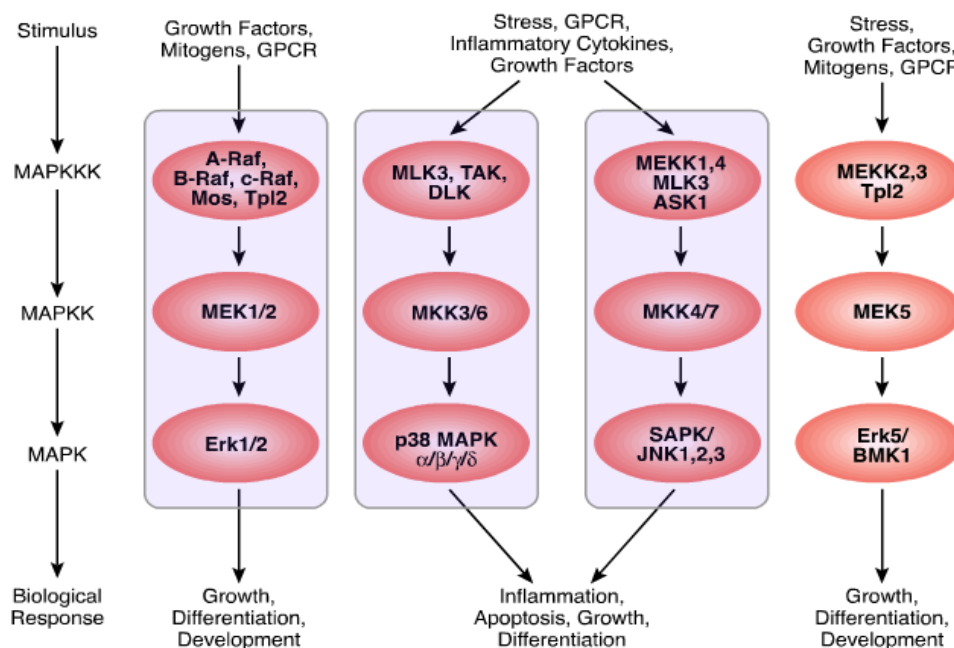


Figure 24 : Cascade des MAP Kinases.

A l'origine de leur activation, différents stimuli qui conduisent à différentes réponses biologiques, d'après Cell Signaling Technology (<http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>).

5.3.3.1 La voie Ras/Raf/MAPK

Les récepteurs membranaires couplés à Ras sont stimulés par différents signaux extracellulaires, cela conduit à l'activation de Ras (passage de la forme Ras-GDP à Ras-GTP) puis au recrutement et à l'activation (par phosphorylation/déphosphorylation) de la kinase initiatrice de la voie des MAPK, Raf (Downward, 1996).

a Raf

La kinase Raf est exprimée sous trois formes chez l'homme : A-Raf, B-Raf et C-Raf. Les kinases Raf possèdent trois régions conservées : CR1, CR2 et CR3. Le domaine contient le domaine de liaison à Ras (RBD pour Ras Binding Domain) et le domaine CRD riche en cystéine. Le domaine CR2 possède des résidus sérine et thréonine dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation de Raf. Le domaine CR3 situé en C-terminal correspond au domaine de l'activité kinase de Raf (Cutler et al., 1998).

Les kinases Raf sont activées par la fixation de Ras au niveau du domaine RDB, la phosphorylation des résidus sérine (par les Rho-GTPases (Cdc42, Rho) ou PI3K) et thréonine (par Src) du domaine CR2 (Cutler et al., 1998). Le domaine kinase est ensuite phosphorylé par des protéines non encore identifiées.

b Les kinases MEK1/2 (Map Kinase Extracellular signal Regulated Kinases 1 and 2)

MEK1 (45 kDa) et MEK2 (47 kDa) présentent 80% d'homologie et diffèrent au niveau de leur extrémité C-terminale (Zheng & Guan, 1993). Elles possèdent trois domaines : un domaine de liaison à ERK1/2 appelé D, un domaine NES d'export nucléaire et un domaine riche en proline. Les kinases MEK sont phosphorylées par Raf sur deux résidus sérine Ser218/Ser222 pour MEK1, et Ser222/Ser226 pour MEK2 (Zheng & Guan, 1994).

c Les kinases ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2)

Elles sont également appelées p42/44 MAPK (les chiffres 42 et 44 correspondent à leurs poids moléculaires, respectivement pour ERK1 et ERK2). ERK1/2 sont activées par phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine T202/Y204 pour ERK1 et T185/Y187 pour ERK2. Ces doubles phosphorylations sont effectuées par la kinase MEK, de laquelle se détachent alors ERK1/2. Ces dernières vont ensuite phosphoryler à leur tour différents substrats (comme les facteurs de transcription Elk-1, Myc, CREB, Fos) au niveau des séquences consensus P-X-S/T-P favorisant ainsi l'expression de différents gènes (facteurs de croissance, cytokines) impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie (Russo et al., 2009).

5.3.3.2 Dérégulation de la voie MAP Kinases dans le cancer

La voie des MAP Kinases joue un rôle important dans le cancer et en particulier dans le mélanome. Les cellules tumorales montrant une forte activité de cette voie sont souvent issues de tumeurs invasives et très agressives. En effet, ERK1/2 sont constitutivement activées dans plus de 90% des mélanomes (Russo et al, 2009). L'hyperphosphorylation de ERK est due à la mutation des gènes *NRas* (15-35% des mélanomes, substitution d'une leucine par une glutamine en position 61) et *BRaf* (50 à 70%). Les deux altérations sont rarement retrouvées en même temps dans le mélanome, chacune suffit seule à activer MEK/ERK. 90% des mutations de *BRaf* correspondent à une substitution de la valine par l'acide glutamique (BRafV600E) au niveau du codon 600 de l'exon 15. L'acide glutamique entraîne des changements de conformation de la protéine et une activation constitutive, favorisant ainsi le développement tumoral. Cependant le mécanisme selon lequel ces mutations favorisent le cycle cellulaire et le développement tumoral est à élucider.

In vitro, l'activation constitutive de la voie des MAPK protège de l'anoïkis des fibroblastes CCL39 (Le Gall et al., 2000), ainsi que les cellules épithéliales du sein MCF10A transformées par la transfection d'un mutant de Raf, constitutivement activé (Schulze et al., 2001). Par ailleurs, ERK1/2 affectent, par des mécanismes post-transcriptionnels et post-traductionnels, l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, permettant d'inhiber la sortie du cytochrome c (Yu et al., 2004). En outre, la caspase 9 est inhibée par phosphorylation au niveau de la thréonine 125 par ERK1, ce qui empêche son auto activation (Allan et al., 2003).

5.4 Récapitulatifs des mécanismes de régulation de la survie, l'anoïkis et la résistance à l'anoïkis

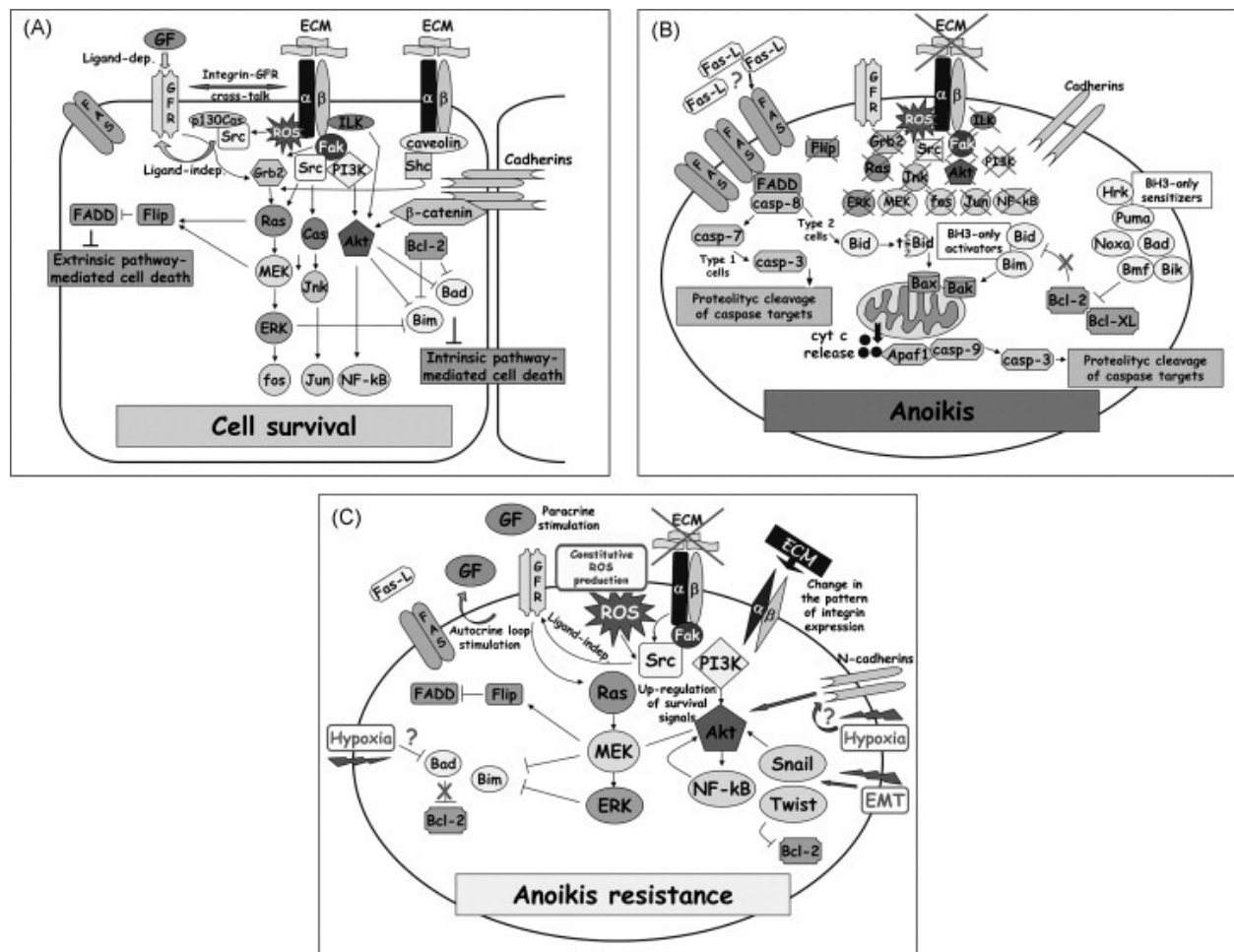


Figure 25 : Les différentes voies de régulation.

Régulation de la survie cellulaire (contexte normal (A)), l'anoïkis (B) et la résistance à l'anoïkis (C). Les différentes voies de signalisation sont indiquées comme celle de PI3K/AKT et des MAP Kinases, (Chiarugi & Giannoni, 2008).

L'identification de multiples voies de signalisation impliquées dans les mécanismes de progression tumorale conduit au développement de nouveaux traitements. Pour le mélanome, il s'agit des inhibiteurs des kinases Raf (Sorafenib) et MEK (PD0325901-Pfizer Oncology et ARRY-142886-Astra Zeneca), des inhibiteurs de la voie de PI3K (CCI-799-Wyeth Pharmaceuticals et RAD001-Novartis) et des protéines chaperones Hsp90 (17-AAG) (Russo et al., 2009). Cependant la recherche continue d'explorer de nouvelles molécules anti-tumorigéniques qui pourraient agir sur les voies de signalisation et affecter la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules de mélanome (Lejeune et al., 2007).

6 La pectine Okra

Les pectines sont des polysaccharides complexes localisés dans la paroi des végétaux. Elles sont constituées d'une chaîne principale d'acide polygalacturonique dont les monomères sont liés en 1-4 (Figure 26). Entre ces monomères s'intercalent régulièrement des molécules de rhamnose par l'intermédiaire de liaisons en 1-2 et 1-4. Certains monomères peuvent être méthylés ou acétylés. Cette structure représente l'axe homogalacturonan et xylogalacturonan correspondant à l'axe «lisse:smooth region» de la pectine. A partir des groupements rhamnose, différentes molécules comme des galactanes, arabinanes et xylanes peuvent former des ramifications constituant les régions « hérissées : hairy regions » caractérisant les rhamnogalacturonans (RG). Deux portions de chaînes d'acide galacturonique non méthylé peuvent se lier en présence d'ions divalents (exemple Ca^{2+}) formant ainsi un réseau complexe de macromolécules (Mohnen, 2008; Ridley et al., 2001).

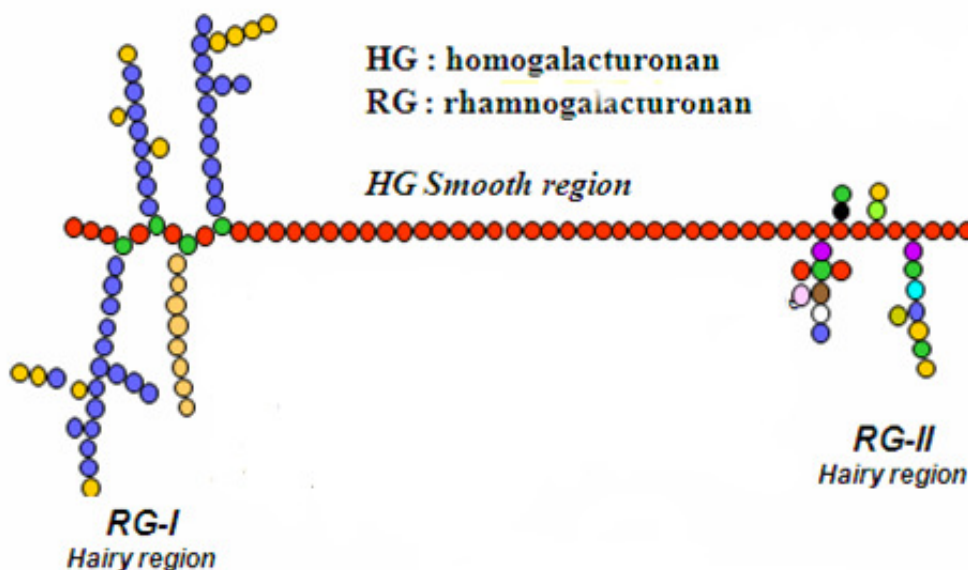


Figure 26 : Structure d'une pectine.

Les pectines sont composées de monomères d'acide polygalacturonique (rouge) avec des insertions de rhamnose (vert) au niveau desquelles partent des ramifications (RG). Les autres éléments de la structure diffèrent selon la plante et le tissu.

La structure des rhamnogalacturonans peut être ciselée de manière contrôlée par action enzymatique, si bien qu'il est possible d'obtenir des rhamnogalacturonans de structure simplifiée bien caractérisée. Ces molécules constituent un matériel particulièrement intéressant pour aborder l'étude des relations structure/fonction dans le cadre des effets biologiques induits par les pectines. Au cours du déroulement du projet européen PectiCoat (STREP FP6, 2005-2008), des pectines

modifiées et mises en solution ou greffées sur des surfaces en polystyrène ont montré leur capacité à moduler les propriétés d'adhésion, la prolifération et la survie *in vitro* de fibroblastes Swiss 3T3, de préostéoblastes MC3T3 et de cellules osseuses primaires d'embryon de poulet (Bussy et al., 2008; Nagel et al., 2008). Différentes études ont montré, entres autres, les propriétés anti-inflammatoires de pectines, ainsi que leur activité anti-mutagénique et anti-métastatique (Chen et al., 2006).

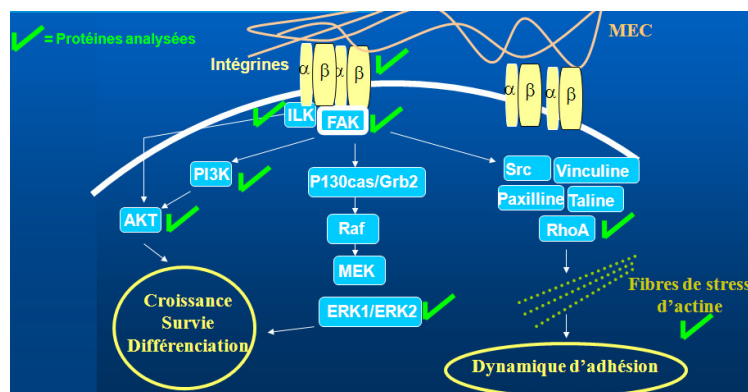
Okra, *Abelmoschus esculentus*, également appelé Gombo, appartient à la famille des Malvacées. C'est un fruit cultivé en Asie, en Afrique, au Moyen-Orient et dans les états du Sud des Etats-Unis. Cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les irritations gastriques ou les maladies dentaires (Lengsfeld et al., 2004). La pectine Okra modifiée qui a fait l'objet de notre étude a été produite par le groupe de H. Schols (Laboratory. Food chemistry, Wageningen University, NL). Elle a une structure particulièrement simple, du fait de la substitution des résidus rhamnosyl par des groupements acetyl-galactosyl. Les chaînes latérales sont réduites à 1 ou 2 groupements galactose (Vayssade et al., 2009).

Objectifs

La résistance à l'anoïkis est une étape importante lors de la progression tumorale et la formation des métastases. Dans le but de comprendre les mécanismes de résistance des cellules de mélanome hautement métastatique B16F10 en configuration 3D, nos objectifs peuvent être regroupés en deux grandes parties :

- ✓ Identifier les « verrous » moléculaires responsables de la résistance à l'anoïkis.

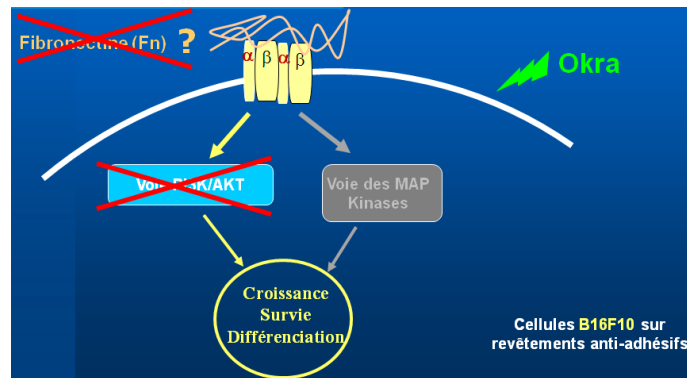
Il s'agit d'analyser l'implication des voies de signalisation médiées par les intégrines, principalement celle des MAPK, de PI3K/AKT ainsi que l'état d'activation de la protéine RhoA.



Objectif 1- Identification des « verrous moléculaires ».

Analyse des protéines clés appartenant aux différentes voies de signalisation.

- ✓ Lever les « verrous » moléculaires responsables de la survie afin de contraindre les cellules B16F10 à entrer en anoïkis. Dans ce cadre, il s'agit d'inhiber l'expression de la Fn, d'inhiber la voie PI3K/AKT (à l'aide d'inhibiteurs chimiques et d'ARN interférentiels) et d'analyser l'effet de la pectine Okra sur les cellules cancéreuses.



Objectif 2- Lever les « verrous moléculaires ».

Matériels et Méthodes

1 Culture cellulaire

Trois lignées murines adhérentes ont été utilisées, une cancéreuse et deux «normales» :

- Les cellules de mélanome hautement métastatique B16F10 (Don du Dr. Lionel Larue, UMR CNRS 146 Institut Curie, Orsay, France) cultivées en milieu RPMI (Gibco Invitrogen, France) enrichi par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco Invitrogen, France), 2 mM de glutamine (Gibco Invitrogen, France), 100 U/mL de pénicilline (Gibco Invitrogen, France) et 100 µg/mL de streptomycine (Gibco Invitrogen, France). Cette lignée a été obtenue selon la méthodologie (Fidler, 1973) qui, à l'origine, a mis en culture le mélanome B16 provenant de souris C57B1/6. Plusieurs cycles de culture *in vitro* puis d'injections intraveineuses de cellules chez la souris ont été effectués. Chaque cycle a permis d'obtenir une lignée tumorale B16 référencée auprès de l'ATCC®. A chaque fois, les cellules mises en culture puis injectées ont donné lieu à des métastases pulmonaires avec un potentiel métastatique de plus en plus élevé.

- Les fibroblastes Swiss-albino 3T3 (ATCC®, CCL-92™, LGC Promochem, France) cultivés en milieu DMEM (Gibco Invitrogen, France) enrichi par 10% de SVF, 4 mM de glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Cette lignée a été créée par G. Todaro et H. Green en 1962 à partir d'embryons de souris Swiss.

- Les pré-ostéoblastes MC3T3-E1 sous clone 24 (ATCC®, CRL-2593™, LGC Promochem, France) cultivés en milieu MEM-α (Gibco Invitrogen, France) enrichi par 10% de SVF, 2 mM de glutamine, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les sous clones, isolés à partir de la lignée hétérogène MC3T3-E1, sont sélectionnés selon leur potentiel de différenciation et de minéralisation après culture dans un milieu contenant de l'acide ascorbique. Le sous clone 24 a un faible pouvoir de différenciation et la MEC n'est pas minéralisée.

Les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 sontensemencées à une densité de 10⁴ cellules/cm² et incubées à 37°C pour respectivement 2, 3, 4, 5, 6 jours, 6, 24, 48 heures et 3, 6, 12, 24 heures. Elles sont maintenues à 37°C dans un incubateur

enrichi à 10% de CO₂ pour les cellules B16F10 et Swiss 3T3, et à 5% de CO₂ pour les cellules MC3T3.

Pour le test d'inhibition de la PI3K, les cellules ont été incubées pendant 1 heure à 37°C dans du milieu complet contenant 20 µM de LY294002 (Cell Signaling Technology, France) en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich, France), puis ensemencées sur revêtement anti-adhésif.

2 Les revêtements de culture utilisés

2.1 Revêtements anti-adhésifs (3D)

- Un polymère anti-adhésif : le Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) = polyHEMA (Sigma Aldrich).

Les boîtes de polystyrène sont enduites de polyHEMA dissous au préalable dans de l'éthanol à 95%, pour une concentration finale du polymère de 12 mg/mL et une densité de 0.8 mg/cm². Les boîtes sont ensuite séchées toute la nuit à 37°C (évaporation de l'éthanol) et stérilisées extemporanément avec une solution de pénicilline (200 U/mL)/streptomycine (200 µg/mL) dans de l'eau ultra pure stérile. Les boîtes sont alors rincées 3 fois avec de l'eau stérile.

- Une bicouche de polymères dérivés de cellulose : CEL, procédé développé au Centre de Transfert de Technologie du Mans (Dr. Legeay), décrit dans le brevet français n°2 862 979 (06/06/2005) et mondial WO 2005054424 A2 n°10/580, 679 (22/11/2007).

La première couche correspond à l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) E4M 0.2% (w/v) (Colorcon, UK) déposée après activation des surfaces, ensuite la carboxyméthylcellulose (CMC) 7LF (Benacel[®], Hercules International Limited, Pays-Bas) est déposée.

Les boîtes sont stérilisées à l'oxyde d'éthylène et emballées individuellement (entreprise STATICE, France). Elles sont ensuite réhydratées extemporanément pendant une heure avec de l'eau ultra pure stérile avant utilisation.

2.2 Revêtement adhésif (2D)

Des boîtes de polystyrène traité pour la culture cellulaire : Nunclon™ (NUNC™, Danemark) sont utilisées comme contrôle adhésif (PSt).

2.3 Méthodes de récolte des cellules selon les différents supports

Sur revêtement anti-adhésif (CEL ou polyHEMA), les cellules en agrégats sont collectées par centrifugation à 200 x g, 5 minutes, 4°C. Après dissociation mécanique dans 0.25% de trypsine-EDTA (Gibco Invitrogen, France), le même volume de SVF est ajouté pour neutraliser la trypsine.

Les cellules cultivées sur PSt sont détachées à l'aide d'une solution à 0.25% de trypsine-EDTA pendant quelques minutes à 37°C, puis la trypsine est inhibée avec du SVF. Les boîtes sont alors rincées avec du milieu et les cellules sont collectées après centrifugation 5 minutes, à 200 x g, 4°C.

3 Etude de la morphologie

3.1 Marquage du cytosquelette d'actine par la phalloïdine

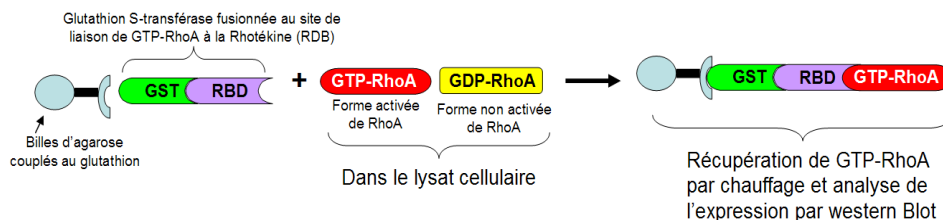
La phalloïdine, extraite de phallotoxines, est couramment utilisée pour marquer, identifier et stabiliser les filaments d'actine car elle a une forte affinité pour ces derniers, et empêche leur dépolymérisation. Les cellules sont incubées en présence de phalloïdine couplée à un fluorochrome, Phalloïdine-X5-FluoProbes®505 (Interchim, France), et un contre marquage des noyaux au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Sigma Aldrich) (1 µg/mL) est effectué.

- En 2D : les cellules adhérentes sont rincées trois fois avec du PBS (tampon phosphate salin, préparé dans le laboratoire)
- En 3D : les agrégats sont récoltés, les boîtes sont rincées avec du PBS et l'ensemble est centrifugé 5 minutes à 200 x g, 4°C. Les cellules reprises dans du PBS (10⁵ cellules pour 1 mL) sont ensuite cytocentrifugées sur lames à l'aide de l'appareil Shandon Cytospin® 3.

Toutes les cellules sont successivement fixées dans du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) (Merck Chemicals, France) pendant 10 minutes à température ambiante (TA), perméabilisées (5 minutes à TA) dans du PBS contenant 1% Triton-X-100 (Sigma Aldrich) et incubées 20 minutes à TA pour la saturation dans une solution de PBS contenant 1% de BSA (albumine sérique bovine, Sigma Aldrich). Entre chaque étape, trois lavages de 5 minutes en PBS sont effectués. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à l'obscurité avec une solution de phalloïdine-FluoProbes à 0.066 nmol/mL diluée dans du PBS (contenant 1 µg/mL de DAPI). Après 3 lavages en PBS et montage au Mowiol (Calbiochem, France), les préparations sont observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

3.2 Etat d'activation de la protéine RhoA

L'état d'activation de la protéine RhoA est étudié à l'aide d'une méthode de « pull-down » selon les instructions du fournisseur (Cytoskeleton, tébu-bio, France). Le principe est le suivant :



Les cellules sontensemencées à une densité de 10^4 cellules/cm² sur PSt (2D) ou sur revêtement anti-adhésif (3D). A différents temps (T0, 24 heures, 3 et 6 jours) les cellules sont récoltées comme suit :

- En 2D, les cellules adhérentes sont rincées avec 5mL de PBS afin d'éliminer toute trace de sérum.
- En 3D, les agrégats sont récoltés, les boîtes de culture sont rincées avec 5mL de PBS puis l'ensemble est centrifugé 3 minutes à 200 x g et à 4 °C.

Toutes les cellules sont lysées dans un 1 mL de tampon de lyse fourni dans le kit (Tris pH 7.5 à 50 mM, MgCl₂ à 10 mM, NaCl à 0.5 M, 1% Triton X-100) : les cellules

en 2D sont détachées à l'aide d'une spatule, tandis que celles en agrégats sont lysées mécaniquement à l'aide d'une pipette.

Après centrifugation 5 minutes à 5000 x g, 4°C, le surnageant, contenant les protéines, est récupéré et directement mis en contact avec 60 µL de billes d'agarose couplées GST-RBD auxquelles sont ajoutés 10 µL d'inhibiteurs de protéases fournis dans le kit (correspond à un mélange de 0.062 µg/mL de leupeptine et de pepstatine, 0.014 µg/mL de benzamidine et 0.012 µg/mL d'ester méthylique de tosyl arginine). Après incubation sous agitation 1 heure à 4°C à l'aide d'un carrousel, les échantillons sont ensuite centrifugés 3 minutes à 5000 x g, 4°C. Chaque surnageant (protéines restantes non fixées aux billes) est récupéré et stocké à -20°C pour un dosage protéique ultérieur (méthode Bradford) au bleu de Coomassie (Thermo Fisher Scientific, France), afin d'estimer la quantité de protéines. Les billes d'agarose couplées GST-RBD-GTP-RhoA sont alors lavées successivement dans 1 mL de tampon de lyse puis 1 mL de tampon de lavage fourni dans le kit (Tris pH 7.5 à 25 mM, MgCl₂ à 30 mM, NaCl à 40 mM), et centrifugées 3 minutes à 5000 x g, 4°C.

Les billes sont enfin reprises dans 10 µL de solution Laemmli 2X (contenant 25% de Tris HCl pH 6.8 à 0.5 M, 10% de glycérol, 0.0013% de bleu de bromophénol, 4% de Sodium Dodécyl Sulfate) puis chauffées à 100°C pendant 10 minutes afin de décrocher la protéine GTP-RhoA du complexe GST-RBD. L'expression est analysée par western blot, après migration dans un gel à 12%.

La révélation est réalisée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-RhoA (# ARH03) fourni avec le kit, puis d'un anticorps secondaire HRP anti-IgG de souris (# UP446330, Interchim, France) et du système de détection ECL+ (GE Healthcare Europe GmbH).

4 Etude de la prolifération cellulaire et cycle cellulaire

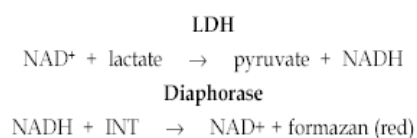
4.1 Test d'exclusion au Bleu Trypan

Le bleu Trypan pénètre dans les cellules mortes d'une part en raison de leurs parois lésées et d'autre part en raison de leur incapacité à rejeter le colorant contrairement aux cellules vivantes.

Les cellules sont récoltées d'après le protocole indiqué dans le paragraphe 2.3. Les culots sont directement repris dans du PBS, 100µL de la suspension cellulaire sont mélangés avec 50 µL de bleu Trypan (Sigma Aldrich), puis le comptage est effectué à l'aide de l'hématimètre de Malassez. Le ratio N/N0 est alors calculé, N étant le nombre de cellules vivantes comptées au temps de récolte T, et N0 le nombre de cellules vivantes à T0 lorsque les cellules sont ensemencées. Par ailleurs, un calcul de la viabilité cellulaire (rapport du nombre de cellules vivantes sur le nombre de cellules totales) a été effectué.

4.2 Mesure de l'activité de la Lactate Déshydrogénase (LDH) cytoplasmique

L'activité de la LDH, exclusivement cytoplasmique, est déterminée à l'aide d'un test colorimétrique : CytoTox 96® (Promega, France). Le principe est basé sur la conversion des sels de trétazolium (INT) en un dérivé formazan de couleur rouge, selon les réactions chimiques suivantes :

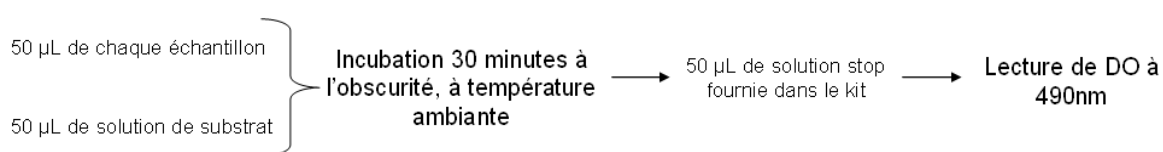


Les réactifs nécessaires à ces réactions sont fournis dans la solution 'substrat' fournie dans le kit. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de LDH libérée donc au nombre de cellules qui ont été lysées.

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 12 puits (Falcon®, Becton Dickinson Labware, France) à une densité de 10^4 cellules/cm². A différents temps,

les cellules vivantes sont récoltées comme indiqué en paragraphe 2.3 pour les cellules sur PSt. Afin d'éliminer toute trace de sérum, deux rinçages dans du PBS sont effectués. Pour les cellules en 3D, les agrégats sont également rincés (sans dissociation dans la trypsine). Les différents culots secs sont stockés à -80°C jusqu'au jour de l'essai.

Afin de lyser les cellules et libérer la LDH, tous les culots sont repris dans 500 µL de milieu de culture sans sérum, puis, une série de congélations (deux fois à -80°C) et décongélations (2 fois à 37°C) est effectuée. L'essai se déroule comme suit :



Le ratio DO_T/DO_{T0} est alors calculé, DO_T étant la valeur d'absorbance à chaque temps de récolte T, et DO_{T0} la valeur d'absorbance à T0 lorsque les cellules sontensemencées. La valeur de DO correspondant au blanc (contenant le milieu de culture comme échantillon) est déduite de toutes les absorbances.

4.3 Analyse du cycle cellulaire

La distribution des cellules dans le cycle cellulaire est étudiée à l'aide du cytomètre en flux. Le principe est basé sur le contenu cellulaire en ADN qui est marqué à l'aide d'un fluorochrome. Les cellules en phase G0/G1 ont 2n chromosomes et 4n en G2/M après la phase S de synthèse d'ADN (durant laquelle les chromosomes se dupliquent).

Les cellules sont récoltées comme indiqué dans le paragraphe 2.3 (2D et 3D). Tous les culots cellulaires sont lavés deux fois avec du PBS-EDTA (5mM), fixés dans 75% d'éthanol/25% de PBS-EDTA et stockés 24 heures à 4°C, puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Avant l'analyse au cytomètre en flux (Epics XL-MCL Beckman Coulter), les cellules sont lavées dans du PBS-EDTA et incubées pendant 15 minutes dans l'obscurité avec 1 mL du mélange suivant (pour 1 million de cellules) : PBS-EDTA contenant 0.1% de Triton-X-100, 40 µg de RNase A (Sigma

Aldrich) et 25 µg d'iodure de propidium (IP, Sigma Aldrich). Le logiciel d'analyse Wincycle (Phoenix, États-Unis) permet le traitement des données et d'obtenir la répartition dans le cycle cellulaire.

4.4 Observation des cellules en mitose : marquage de l'histone H3 phosphorylée

Les histones sont des protéines structurales qui s'associent à l'ADN pour stabiliser la chromatine. La modification au niveau de leur extrémité N-terminale (acétylation, phosphorylation, méthylation, et ubiquitination) est très importante dans la régulation de la transcription. La phosphorylation de l'histone H3 au niveau de la sérine 10 (en plus de la Ser 28 et la Thr 11) est corrélée à la condensation de la chromatine durant la mitose et la méiose.

L'anticorps polyclonal issu du sérum de lapin (#9708, Cell Signaling Technology, Ozyme, France) et couplé à un fluorochrome (Alexa®488) reconnaît l'histone H3 phosphorylée au niveau de la Ser 10. Les cellules en agrégats sont collectées selon le protocole habituel, comptées, reprises dans du PBS et cytocentrifugées 4 minutes à 200 x g, (environ 20000 cellules par lame).

Après fixation (10 minutes à TA) dans du PBS contenant 4% de PAF, rinçages dans du PBS (trois fois pendant 5 minutes) et perméabilisation dans du méthanol (10 minutes à -20°C), les cellules sont à nouveau rincées.

L'étape de blocage est effectuée pendant 1 heure en présence d'une solution de PBS contenant 0.3% de Triton-X-100 et 5% de BSA (p/v).

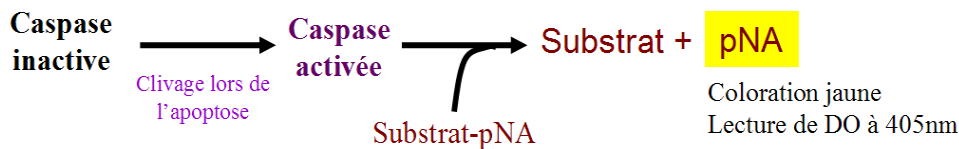
Les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps anti-H3 (20µg/mL) dilué dans du PBS contenant 0.3% de Triton-X-100 (contre marquage des noyaux au DAPI à 1 µg/mL).

Après 3 rinçages de 5 minutes et montage au Mowiol, les préparations sont observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

5 Etude de l'apoptose

5.1 Mesure d'activité des Caspases 3, 8 et 9

Afin d'analyser l'état apoptotique des cellules, le test colorimétrique APOPCYTO (MBL, Cliniscience, France) est utilisé. Le principe est le suivant :



Le substrat synthétique est couplé à la molécule de pNA (para-nitroaniline) et comprend 4 séquences d'acides aminés reconnues par l'enzyme activée. Le clivage du substrat, respectivement DEVD-pNA, IETD-pNA et LEHD-pNA pour la caspase 3, 8 et 9 permet la libération de pNA. L'activité de l'enzyme est ensuite corrélée à la quantité de pNA présente dans le milieu.

Pour chaque lignée, un contrôle positif d'apoptose a été effectué en parallèle : les cellules sont traitées pendant 24 heures sur PSt avec 1µM de staurosporine (Sigma Aldrich), un inducteur d'apoptose en solution dans du DMSO. Les cellules en 2D et 3D sont récoltées (paragraphe 2.3).

Après rinçage dans du PBS et comptage, les cellules sont lysées avec le tampon de lyse fourni dans le kit (50 µL pour 10⁶ cellules) et centrifugées 5 minutes à 10000 x g, 4 °C. Les protéines contenues dans le surnageant sont alors dosées par la méthode de Bradford au Bleu de Coomassie. Puis le test enzymatique se déroule comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Etapes du test enzymatique.

	Echantillons	Témoin négatif	Blanc
Lysats cellulaires (protéines)	50 µg QSP 50 µL avec du tampon de lyse		50 µL tampon de lyse
Solution de DTT (fournie dans le kit) diluée au 1/100 ^e	50 µL		
Inhibiteur de la caspase (fourni dans le kit)	-	1 µL	-
Substrat (fourni dans le kit)	5 µL		
	Incubation toute une nuit, 37 °C dans une plaque 96 puits		
	Lecture de DO à 405 nm		

En parallèle une gamme étalon de pNA (fourni dans le kit) est effectuée afin de déterminer la courbe d'absorbance en fonction de la concentration. La pente de la droite permet de traduire les DO obtenues en concentration de pNA libéré (µM). L'activité de l'enzyme est calculée selon les formules :

$DO \text{ relative} = (DO \text{ échantillon} - DO \text{ blanc}) - (DO \text{ témoin négatif} - DO \text{ blanc})$

(Pour le témoin négatif, l'inhibiteur de caspase correspond à un dérivé FluoroMéthyle Kétone couplé à la séquence d'acides aminés reconnue par l'enzyme)

$[pNA] \text{ en } \mu M = DO \text{ relative} / \text{pente de la droite étalon}$

$\text{Activité spécifique (A)} = ([pNA] \times \text{Volume} / \text{nombre d'heures de réaction}) / \text{quantité de protéines}$

$= (Y \mu M \times 0.1 \text{ mL} / 16 \text{ heures}) / 0.05 \text{ mg}$

Le ratio A/A0 est alors calculé, A étant l'activité spécifique à chaque temps de récolte T, et A0 l'activité spécifique à T0 lorsque les cellules sontensemencées.

5.2 Test annexine-V

Le principe du test est basé sur l'affinité Ca^{2+} dépendante de l'annexine-V pour la phosphatidylsérine (PS), un phospholipide du feuillet interne de la membrane plasmique des cellules, externalisé lors de l'apoptose. Les cellules apoptotiques sont ainsi marquées à l'annexine-V couplée à la FITC selon les instructions du fournisseur (kit Immunotech, France).

Pour chaque lignée, un contrôle positif d'apoptose a été effectué en parallèle : les cellules sont traitées pendant 24 heures sur revêtement anti-adhésif avec la staurosporine à 1 μ M (inducteur d'apoptose). Ce contrôle a permis de calibrer le cytomètre avant l'analyse des échantillons.

Les cellules sont récoltées selon le protocole habituel (incubation de quelques secondes dans la trypsine afin de ne pas détériorer la membrane plasmique). Tous les culots cellulaires sont rincés dans du PBS froid, centrifugés et repris dans du tampon de liaison 1X froid fourni avec le kit. Pour chaque échantillon, les cellules sont incubées pendant 15 minutes à 4 °C avec 1 μ L d'annexine-V couplée à la FITC et 12.5 μ g/mL d'IP (tous fournis dans le kit). Le marquage à l'IP permet l'observation des sous populations de cellules nécrotiques.

La lecture au cytomètre en flux (Epics XL-MCL, FC, Beckman Coulter France SA) s'effectue dans les 30 minutes qui suivent, 10 000 évènements sont analysés au minimum. Les cellules Annexine-V positives détectées par le cytomètre sont rapportées au nombre total d'évènements analysés afin de déduire un pourcentage de cellules subissant l'apoptose.

5.3 T.U.N.E.L (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling method)

Cette technique permet la détection de cellules apoptotiques : l'ADN des cellules fragmenté par des endonucléases lors de l'apoptose est marqué au niveau de l'extrémité 3'-OH par des nucléotides couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC-dUTP) fournis dans le kit MEBSTAIN Apoptosis Direct (Immunotech). La réaction est catalysée par la TdT (Terminal desoxynucléotidyl Transférase) selon les instructions du fournisseur.

Les cellules sont récoltées (protocole habituel) et tous les échantillons sont repris dans du PBS. Les cellules sont comptées et cytocentrifugées 4 minutes à 200 x g, 4 °C (environ 20000 cellules par lame). Après fixation (10 minutes à TA) dans du PBS contenant 4% de PAF, et 3 rinçages dans du PBS pendant 5 minutes, les cellules sont perméabilisées dans du PBS contenant 0.3% de Triton-X-100 (5 minutes à TA). Les cellules sont ensuite incubées 1h à 37 °C avec le mélange suivant : tampon TdT, TdT, FITC-dUTP selon le ratio 18/1/1.

Des contrôles positifs (incubation préalable avec une solution de DNase I dans du tampon TdT à 2.5 µg/µL pendant 30 minutes environ) et négatif (incubation 1 heure à 37°C avec le mélange tampon TdT, FITC-dUTP, sans enzyme TdT) sont effectués en parallèle.

Toutes les lames sont lavées trois fois pendant 5 minutes avec du PBS, puis les noyaux sont marqués avec une solution d'IP à 0.5 µg/mL, pendant 20 minutes à 4°C. Après 3 lavages de 3 minutes et montage au Mowiol, les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

Les cellules apoptotiques sont repérées sur les lames à l'aide du marquage FITC (vert) de l'ADN fragmenté au niveau des noyaux contremarqués en rouge par l'IP. Le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé après comptage des cellules sur plusieurs champs d'observation.

5.4 Test APOSTAIN

Ce test met en évidence les noyaux apoptotiques dont l'ADN fragmenté est plus sensible à la dénaturation à chaud en présence de formamide. L'ADN fragmenté dénaturé est détecté à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement l'ADN simple brin.

Après 48 heures de culture, les cellules sont fixées pendant 30 minutes dans une solution de méthanol froid (80%, v/v), lavées et reprises dans 250 µL de formamide pendant 10 minutes à 75°C puis 5 minutes à TA. Les sites non spécifiques sont bloqués pendant 15 minutes à TA à l'aide d'une solution de PBS contenant 1% de lait (p/v). Les échantillons sont ensuite incubés, 45 minutes à TA, avec un anticorps monoclonal anti-ADN simple brin (# AbC156, AbCys, France) dilué au 1/10^e dans une solution de PBS supplémentée de 5% de SVF. Puis, les cellules sont incubées, 30 minutes à TA, en présence d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Cy3 (# 111-165-144, Jackson ImmunoResearch, Royaume-Uni) dilué au 1/200^e dans du PBS contenant 1% de lait. Un double marquage au DAPI (1 µg/mL) a été effectué pour chaque échantillon. Les cellules sont alors

cytocentrifugées sur lames. Les préparations sont montées au Mowiol et observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

Le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé après comptage des noyaux sur plusieurs champs d'observation.

5.5 Marquage à l'Acridine Orange

L'Acridine Orange (AO) est un marqueur fluorescent sélectif des acides nucléiques. L'AO pénètre dans les cellules vivantes, s'intercale dans l'ADN double brin et émet à 526nm après excitation (fluorescence verte). Un marquage IP est effectué en parallèle afin d'observer les cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire.

Sur polyHEMA, les agrégats sont collectés par centrifugation 5 minutes à 200 x g, 4°C, puis les cellules sont incubées 5 minutes à TA dans un mélange v/v des solutions suivantes :

- PBS contenant de l'AO dilué au 1/100^e (Sigma Aldrich, solution stock préparée avec 15 mg de poudre dilué dans 1 mL d'alcool 95° puis 49 mL d'eau distillée)
- PBS contenant de l'IP à 1 mg/mL dilué au 1/20^e.

La préparation est déposée sur une lamelle et les cellules sont observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

6 Etude de l'expression des protéines

6.1 Western Blot

Les cellules sont récoltées selon le protocole habituel, rincées avec du PBS et stockées sous forme de culots secs jusqu'au jour de l'essai.

Après centrifugation, tous les échantillons sont lysés directement dans du tampon Laemmli 2X supplémenté de 5% de β -mercaptoéthanol (Sigma Aldrich) et

d'orthovanadate de sodium (Sigma Aldrich) à 100 μ M qui est un inhibiteur de phosphatases : 10⁶ cellules sont lysées dans 100 μ L de mélange tampon Laemmli/ β -mercaptoéthanol/orthovanadate. Les lysats sont alors chauffés à 100°C pendant 5 minutes afin de dénaturer les protéines et rendre accessible tous les sites (qui peuvent être inaccessibles en raison de la conformation en 3D des protéines).

Les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire lors d'une électrophorèse SDS-PAGE (gel à 7.5% ou 12% selon les protéines d'intérêt). 20 μ L de lysat, correspondant à 200000 cellules, sont déposés par puits. Des marqueurs de poids moléculaire (15 μ L de Precision Plus Protein™ Standard All Blue, Biorad, France) sont utilisés pour déterminer la taille des bandes de protéines. La migration s'effectue à 180 Volts pendant 4 heures 30 en moyenne.

Les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose (Biorad, France) dans un système de transfert semi-sec (Biorad) pendant 75 minutes à 25 Volts. La coloration des bandes de protéines au rouge ponceau (Sigma Aldrich) permet de vérifier l'efficacité du transfert sur la membrane.

La membrane est alors saturée 1 heure dans du PBS supplémenté de 5% (p/v) de lait ou de BSA (Sigma Aldrich) pour l'analyse des protéines phosphorylées, 0.1% (v/v) de Tween 20 (Sigma Aldrich). La saturation permet de réduire les bruits de fond en prévenant la fixation non spécifique des anticorps primaires et/ou secondaires.

La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée avec un anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt, puis avec un anticorps secondaire conjugué HRP (HorseRadish Peroxidase) selon les instructions du fournisseur (cf. tableau ci-dessous).

Le système de détection par chemiluminescence ECL ou ECL+ (GE Healthcare Europe GmbH) est utilisé pour la révélation des bandes de protéines sur un film ou à l'aide de l'appareil Chemidoc (Biorad).

Tableau 2 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blot.

	Référence	Origine	Type	Isotype	Dilution
Actine	MAB1501R	Chemicon	Monoclonal	IgG1 souris	1/10000
FAK	MAB 2156	Chemicon	Monoclonal	IgG1 souris	1/500
pY397FAK	MAB1144	Chemicon	Monoclonal	IgG1 souris	1/1000
Intégrine $\alpha 5$	AB1921	Chemicon	Polyclonal	IgG lapin	1/2000
Intégrine αv	AB1930	Chemicon	Polyclonal	IgG lapin	1/5000
AKT (isoformes 1/2/3)	9272	Cell signaling	Polyclonal	IgG lapin	1/1000
P473SAKT	4058	Cell signaling	Monoclonal	IgG lapin	1/1000
ERK1/ERK2	4695	Cell signaling	Monoclonal	IgG lapin	1/1000
p-(ERK1/ERK2)	4377	Cell signaling	Polyclonal	IgG lapin	1/1000
Bcl-2	610538	BD-transduction	Monoclonal	IgG1 souris	1/250
ILK	3856	Cell signaling	Polyclonal	IgG lapin	1/1000
Survivine	2808	Cell signaling	Polyclonal	IgG lapin	1/1000

Les anticorps secondaires choisis sont l'anti-IgG de souris couplé à la peroxidase (# UP446330, Interchim) ou l'anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (# UP511380, Interchim) selon l'anticorps primaire utilisé. Les anticorps secondaires sont dilués 1/2000^e.

6.2 Immunomarquage de la Fn

Les cellules sont récoltées selon le protocole habituel, il n'y a cependant pas de dissociation des agrégats dans la trypsine. Tous les échantillons sont repris dans du PBS, cytocentrifugés 4 minutes à 200 x g. Après fixation (10 minutes à TA) dans du PBS contenant 4% de PAF, 3 rinçages dans du PBS pendant 5 minutes et perméabilisation dans du PBS/1% de Triton-X-100 (5 minutes à TA), les cellules sont rincées à nouveau puis incubées 1 heure à TA en PBS/1% de BSA. Toutes les lames sont incubées 1 heure en chambre humide avec la solution d'anticorps primaire anti-fibronectine (# A0245, Dako, France) dilué au 1/100^e dans du PBS contenant 0.1% de BSA (100 μ L par lame). Après trois rinçages de 5 minutes, les

cellules sont incubées en présence de l'anticorps secondaire (111-225-144, Jackson ImmunoResearch, Royaume-Uni) couplé à un fluorochrome Cy2 et dilué au 1/100^e dans du PBS/0.1% BSA. L'incubation s'effectue en chambre humide et à l'obscurité pendant 1 heure. Les préparations sont enfin montées au Mowiol après rinçage avec du PBS et observées au microscope à épifluorescence (Leica DMI 6000).

7 Analyse par RT-PCR de l'expression du gène de la Fn

Les cellules sont récoltées selon le protocole habituel, détachées (2D) ou dissociées (3D) dans la trypsine, puis stockées à -80°C sous forme de culots secs jusqu'au jour de l'essai.

Extraction et purification des ARN

Les ARN sont extraits à l'aide de 400 µL (pour environ 2 millions de cellules) d'une solution de RNable (Eurobio, France) et de 40 µL de chloroforme (Sigma Aldrich). Après 5 minutes d'incubation dans la glace, les échantillons sont centrifugés 15 minutes à 12000 x g, 4°C. La phase supérieure de l'homogénat, correspondant exclusivement aux ARN, est prélevée et le même volume d'isopropanol (Sigma Aldrich) y est ajouté. Après incubation 10 minutes à TA, puis centrifugation 5 minutes à 12000 x g, 4°C, le précipité d'ARN formant un culot jaunâtre est lavé avec 1 mL d'éthanol dilué à 75% dans de l'eau stérile garantie sans nucléases (Sigma Aldrich).

Après centrifugation 5 minutes à 7500 x g, 4°C, les échantillons d'ARN sont purifiés à l'aide du mini kit RNeasy (# 74104, Qiagen, France), selon les instructions du fournisseur : traitement successif au β-mercaptoéthanol dilué au 1/100^e dans 350 µL de tampon RLT fourni dans le kit, 250 µL d'éthanol pur, transfert des échantillons dans une colonne fournie puis centrifugation 15 sec à 8500 x g, 25°C. Ensuite, 350 µL de tampon RW1 fourni sont ajoutés à chaque échantillon et les colonnes, placées dans des tubes de 2 mL, sont centrifugées 15 secondes à 8500 x g, 25°C. Les ARN sont ensuite traités avec 80 µL de solution de DNase I diluée au 1/80^e (0.034 Kunitz/µL) dans du tampon RDD (# 79254, Kit Qiagen), puis incubés 15 minutes à 25°C. Après lavages successifs dans 350µL de tampon RW1, 2x500 µL de tampon

RPE et centrifugations 15 secondes à 8500 x g, 25°C, les ARN purifiés sont récupérés dans 35 µL d'eau stérile garantie sans nucléases.

Un dosage au spectrophotomètre des acides nucléiques dilués au 1/100^e dans du tampon Tris HCl pH 7.5 10 mM permet d'estimer la pureté et de déterminer la concentration : le rapport DO à 260nm/DO à 280nm est environ égal à 2 et la concentration en µg/µL est donnée par la formule DO à 260nm x 4.

L'intégrité des ARN est vérifiée à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose 1% (75 minutes à 55 V) contenant du bromure d'éthidium à 0.5 mg/µL (# E1510, Sigma Aldrich) comme révélateur.

Transcription inverse

Pour chaque échantillon, le volume correspondant à 1 µg d'ARN est complété à 11 µL avec de l'eau stérile et est incubé avec 1 µL de random hexamers à 0.5µM/µL (# N808-0127, Applied Biosystems, France) 5 minutes à 70°C. 8 µL d'une solution contenant 1 µL d'inhibiteurs de RNase dans du Tris HCl 50mM pH 8.3 ; MgCl₂ 3 mM ; KCl 75 mM ; DTT 10 mM et 0.5 mM de chacun des dNTP sont ajoutés à chaque échantillon. Les ARN sont incubés 15 minutes à TA, puis 2 minutes à 42°C avant l'ajout de 200 U de transcriptase inverse (# 18064-022, Invitrogen). L'ensemble est incubé 50 minutes à 42°C, puis 15 minutes à 70°C.

Un contrôle de contamination génomique, sans transcriptase reverse, est également effectué, les étapes sont identiques à celles décrites précédemment sauf que la quantité d'ARN de départ utilisée est de 0.5 µg.

PCR en temps réel

Le thermocycleur utilisé est le miniOpticon (Biorad) qui permet de détecter le signal de fluorescence émis par le sybr green s'intercalant à l'ADN au fur et à mesure de l'amplification. Le volume réactionnel de 20 µL comprend 1 µL d'ADNc et 19 µL du mélange :

- 10 µL d'IQ SYBR GREEN Supermix (Biorad) dont la solution mère à 2X est composée de KCl à 100 mM, Tris HCl pH 8.4 à 40 mM, dNTP à 0.4 mM, iTaq

polymérase à 50 unités/mL, MgCl₂ à 6 mM, SYBR GREEN I, fluorescéine à 20 nM et divers stabilisants.

- 1 µL de chaque amorce sens et anti-sens (MWG-Biotech AG, tableau 3) à 6000 nM pour une concentration finale de 300 nM dans le volume réactionnel de 20 µL.

- 7 µL d'eau stérile garantie sans nucléases.

La quantification de l'expression du gène d'intérêt s'effectue grâce au logiciel Genex (Biorad) et les gènes de référence utilisés pour la normalisation sont l'ARN polymérase II et l'Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase 1.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR en temps réel

Cibles	Sens	Anti-Sens
Fibronectine	5'-AGACCATACCTGCCGAATGTAG-3'	5'-GAGAGCTTCCTGTCCTGTAGAG-3'
HPRT1	5'-CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA-3'	5'-CCACAGGACTAGAACACCTGCTAA-3'
ARN Pol2	5'-CATCAAAGTGGTAGAGGGAG-3'	5'-CAGAGTGTGGATCTTAGGTG-3'

8 Inhibition de l'expression des protéines par ARN interférentiels ou siRNA (small interfering RNA)

Le jour précédent la transfection, les cellules B16F10 sontensemencées sur PSt (boîtes rondes de 10 cm de diamètre) à une densité de 5000 cellules/cm² respectivement dans 10 mL de milieu RPMI enrichi en sérum (10%) et en glutamine (2 mM), mais sans antibiotiques (pénicilline/streptomycine).

Dans un premier temps, l'agent de transfection, la lipofectamine™ 2000 (# 11668-027, Invitrogen, France), est incubé 5 minutes à TA après dilution au 1/50^e et 3/100^e dans 1.5mL de milieu enrichi uniquement en glutamine, respectivement pour les essais concernant la fibronectine et AKT. De même, 0.6 et 2.4 nmol d'oligonucléotides (Sigma Aldrich, tableau 4) ciblant respectivement les ARNm de *fibronectine* et *AKT* (isoformes 1 et 2) sont dilués dans 1.5 mL de milieu enrichi en glutamine. Après homogénéisation, les dilutions de lipofectamine™2000 et de siRNA sont mélangées, incubées 20 minutes à TA puis ajoutées sur les cellules en culture. Le milieu est complété à 15 mL (toujours sans antibiotiques) et les cellules sont incubées à 37°C pendant 72 heures (*fibronectine*) et 48 heures (*AKT*). 24 heures

après transfection, 5 mL de milieu neuf (enrichi en sérum et en glutamine) sont ajoutés aux cellules en culture.

D'autres oligonucléotides ciblant *AKT1* ont été utilisés par la suite (silencer select®, Ambion, France) à une concentration de 0.6 nmol (siRNA à fort capacité d'inhibition). Pour ces essais, le milieu de culture a été changé 24 heures après la transfection (le reste du protocole est identique au précédent) et les cellules sont récoltées 48 heures après la transfection.

Les cellules transfectées sont récoltées puisensemencées sur revêtement anti-adhésif pendant 24, 48, 72 et 96 heures.

Tableau 4 : Séquences des siRNA utilisés

Cibles	Sens	Anti-Sens
Fibronectine (Sigma)	5'-CCUACAACAUCAUAGUGGA -3'	5'-UCCACUAUGAUGUUGUAGG-3'
AKT1 (Sigma)	5'-CUUCUAUGGUGCGGAGAUU -3'	5'-AUUCUCCGCACCAUAGAAG-3'
AKT2 (Sigma)	5'-GAGAUGUGGUGUACCGUGA -3'	5'-UCACGGUACACCACAUCUC-3'
AKT1 (Ambion)	5'-ACAGAGCUGGUUUACUGA -3'	5'-UCAGUAAUACCAGCUCUGU-3'
Contrôle négatif (Ambion)	Non communiqué	Non communiqué
Contrôle négatif (Sigma)	5'-GUCAGAACCACACUAUGUA-3'	5'-UACAUAGUGUGGUUCUGAC-3'

9 Traitement avec la pectine Okra

Cette pectine reçue sous forme de poudre (Don de Schols, Université de Wageningen) est issue du traitement enzymatique du légume Okra (également appelé Gombo). Elle est solubilisée dans du milieu sans sérum, puis la solution obtenue est filtrée avant utilisation. La solution de pectine est ajoutée au moment de l'ensemencement (PSt et polyHEMA) pour une concentration finale de 1mg/mL.

**Tableau 5 : Composition en sucres d'Okra (en pourcentage molaire),
expression du rapport rhamnose/acide galacturonique et composition totale en sucre
(en pourcentage massique).**

	Fuc	Rha	Ara	Gal	GalA	Rha/GalA	Total sugar
okra pectin	0	26	0	34	35	0.74	90

10 Analyses statistiques

Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en triplicata. Des tests statistiques non paramétriques ont été utilisés car il s'agit de petits échantillons (moins de 30) : celui de Kruskal & Wallis, ainsi que celui de Mann & Whitney pour la comparaison de chaque temps de culture au temps T0 (deux échantillons indépendants). Toutes les données ont été traitées à l'aide du logiciel Graphpad Prism 4.0.

Résultats

1 Aspects morphologiques des cellules cultivées sur substratum anti-adhésif

1.1 Les cellules adoptent une morphologie ronde et agrégée

La morphologie des cellules adhérentes cultivées sur polyHEMA et CEL a été étudiée par comparaison au PSt, sur lequel elles prolifèrent en 2D. Les cellules de mélanome B16F10, les fibroblastes Swiss 3T3 et les ostéoblastes MC3T3 adoptent une architecture en 3D sur revêtement anti-adhésif (Figure 27). Les cellules B16F10 forment de larges agrégats contrairement aux deux autres modèles cellulaires.

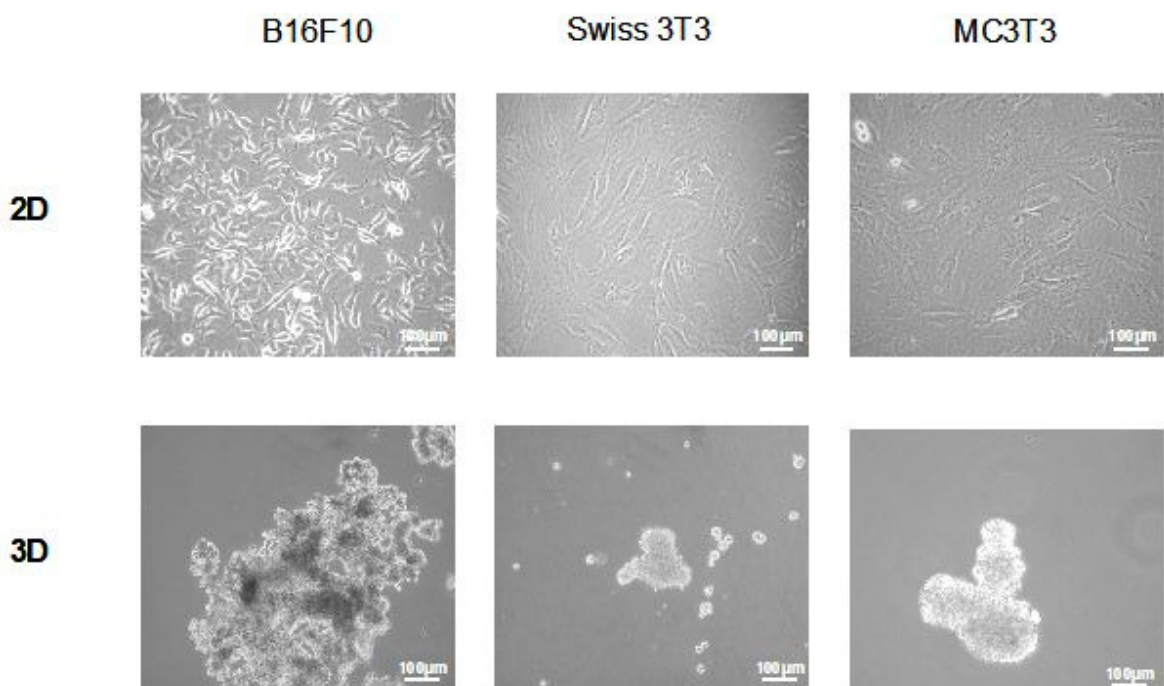


Figure 27 : Morphologie des cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 après 48 heures de culture en 2D et 3D.

Objectif x 20.

1.2 Le cytosquelette n'est pas structuré en fibres de stress

Un marquage de l'actine F (filamenteuse) avec la phalloïdine couplée à la FITC, permet d'observer une organisation structurée du cytosquelette en fibres de stress dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 (Figure 28). En revanche sur revêtement anti-adhésif, il n'y a pas de formation de filaments d'actine dans les cellules en agrégats.

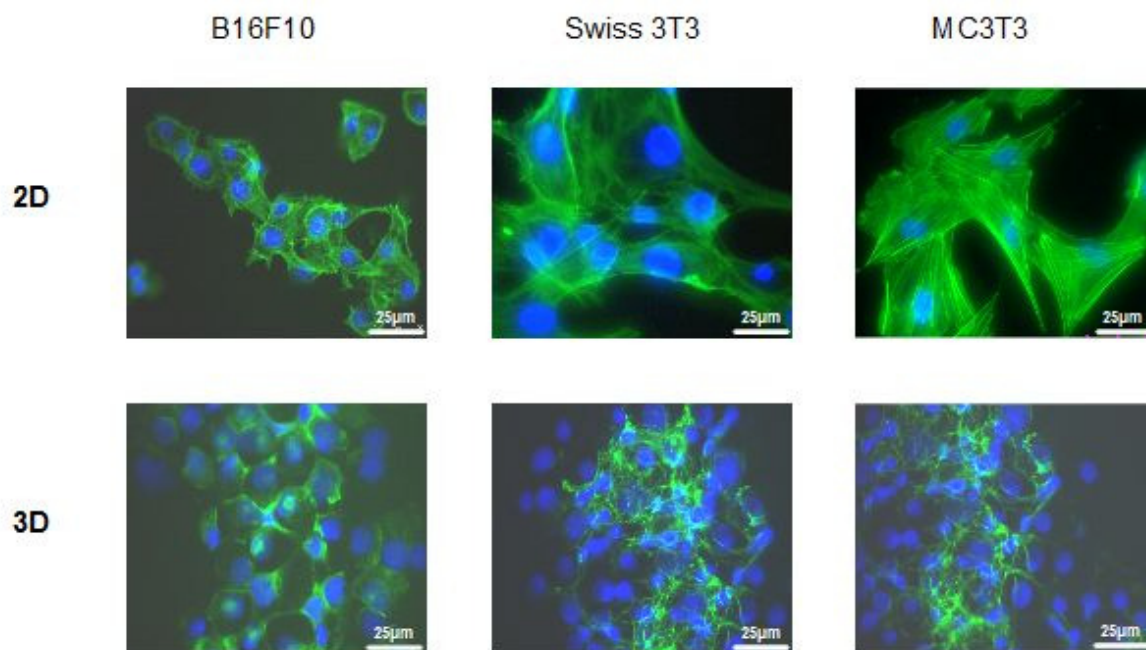


Figure 28 : Organisation du cytosquelette dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées en 2D et 3D.

Marquage des filaments d'actine à l'aide de la phalloïdine/FITC dans les cellules après 24 heures de culture et observation au microscope à épifluorescence (objectif x 63). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu).

1.3 L'activation de la protéine RhoA est modulée suivant le type cellulaire

L'état d'activation de la protéine RhoA, impliquée dans la formation du cytosquelette d'actine et la prolifération cellulaire, a été étudié après 24 heures de culture sur PSt et CEL.

Sur PSt, RhoA est activée dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 (Figure 29A).

Sur CEL, l'expression de la forme activée, GTP-RhoA, reste inchangée dans les cellules de mélanome, tandis que dans les fibroblastes, elle diminue considérablement.

La protéine totale (forme activée et non activée) est fortement exprimée dans les cellules B16F10 cultivées en 2D et 3D, de même que dans les cellules Swiss 3T3

en 2D. Cependant l'expression de RhoA totale diminue fortement en 3D dans les cellules Swiss 3T3.

RhoA étant activée dans les cellules B16F10 après 24 heures de culture sur CEL, l'étude a été effectuée également à 3 et 6 jours de culture pour cette lignée. RhoA reste activée après 3 et 6 jours dans les cellules de mélanome cultivées sur CEL (Figure 29B). L'expression de la protéine totale reste également forte et inchangée à ces temps de culture.

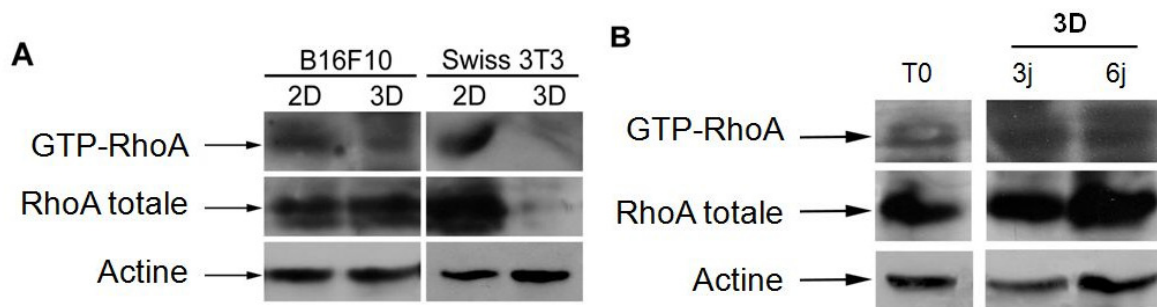


Figure 29 : Analyse de l'activation de RhoA dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées en 2D et 3D.

(A) Immunoblots de GTP-RhoA et RhoA totale dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées sur PSt et CEL pendant 24 heures. (B) Immunoblots de GTP-RhoA et RhoA totale dans les cellules de mélanome cultivées sur CEL pendant 3 et 6 jours.

L'ensemble des résultats indique que dans les cellules cancéreuses B16F10 organisées en larges agrégats sur revêtement anti-adhésif, il n'y a pas d'organisation des filaments d'actine, cependant la protéine RhoA reste activée jusqu'à 6 jours de culture, contrairement à ce qui est observé pour les cellules normales.

2 Etudes portant sur la prolifération et la survie (résistance à l'anoïkis) des cellules cultivées sur substratum anti-adhésif

2.1 La prolifération est plus ou moins inhibée suivant le type cellulaire

La prolifération des cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 a été évaluée à l'aide de numérations associées au test d'exclusion au bleu trypan, et par la mesure de l'activité de la LDH intracellulaire. Les temps de culture choisis sont respectivement 2, 3, 4, 5 et 6 jours pour les B16F10, 6, 24 et 48 heures pour les Swiss 3T3, 3, 6, 12 et 24 heures pour les MC3T3.

2.1.1 Evaluation par des numérations associées au test d'exclusion au bleu Trypan.

Les cellules B16F10 prolifèrent de façon significative jusqu'à 3 jours de culture sur polyHEMA (les indices de prolifération sont respectivement 2.49 ± 0.3 , $p = 0.0001$ et 3.04 ± 0.51 , $p = 0.0003$ après 2 et 3 jours). L'indice N/N0 diminue entre 4 et 6 jours sur revêtement anti-adhésif (respectivement 2.73 ± 0.41 , $p < 0.0001$, 2.09 ± 0.52 , $p = 0.0022$, 1.76 ± 0.42 , $p = 0.0145$ après 4, 5 et 6 jours de culture) mais reste supérieur à celui mesuré à T0 (Figure 30A).

L'indice N/N0 des cellules Swiss 3T3 diminue significativement après 48 heures de culture sur polyHEMA (0.74 ± 0.04 , $p < 0.0001$). Les valeurs de N/N0 après 6 et 24 heures de culture sont respectivement de 0.96 ± 0.11 , et 0.95 ± 0.28 , ns (= non significatif) (Figure 30B).

Le nombre des cellules MC3T3 diminue significativement dès 6 heures de culture sur polyHEMA ($N/N0 = 0.78 \pm 0.17$, $p = 0.0005$). Les indices N/N0 sont de 0.95 ± 0.27 (ns) après 3 heures, 0.79 ± 0.25 (ns) après 12 heures et 0.58 ± 0.14 , $p < 0.0001$ après 24 heures de culture sur revêtement anti-adhésif (Figure 30C).

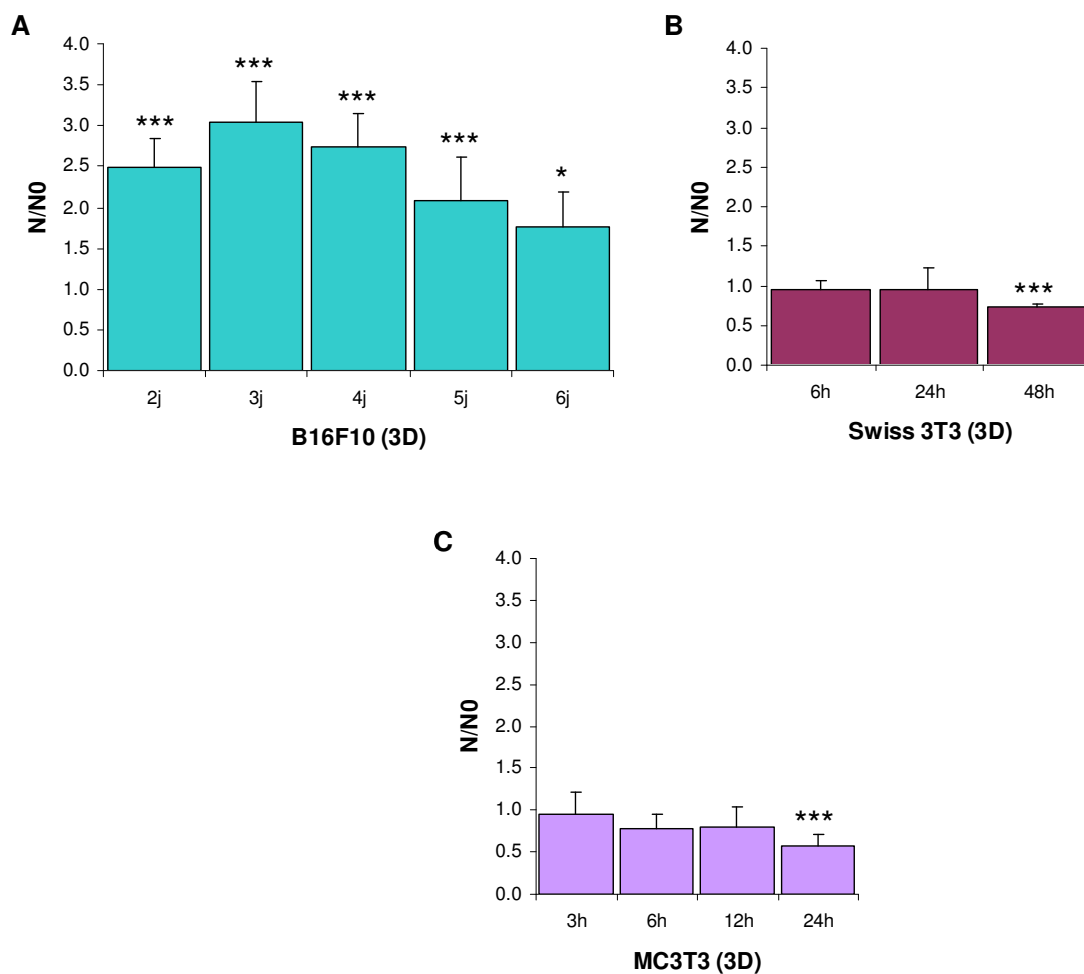


Figure 30 : Evolution des indices N/N0 sur polyHEMA.

L'indice N/N0 des cellules B16F10 (A), Swiss 3T3 (B) et MC3T3 (C) est représenté par le ratio N/N0. N est le nombre total de cellules à chaque temps de culture T et N0 le nombre total de cellules à T0 avant ensemencement. Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes (n = 9) et les symboles * (p < 0.05) et *** (p < 0.001) indiquent des différences significatives entre T et T0 (test de Mann & Whitney).

2.1.2 Evaluation par la mesure de l'activité intracellulaire de la LDH

Afin de confirmer les résultats précédents pour les cellules B16F10 et Swiss 3T3, la prolifération a également été évaluée par la mesure de l'activité de l'enzyme intracellulaire LDH. Les indices de prolifération des cellules cultivées sur polyHEMA et PSt ont été déterminés (Figure 31).

L'activité de la LDH dans les cellules B16F10 cultivées sur PSt augmente significativement (p = 0.0022) jusqu'à 6 jours de culture et reste supérieure à celle mesurée à T0 ($DO_T/DO_{T0} = 9.14 \pm 1.7$ après 2 jours et 128.06 ± 49.3 après 6 jours

de culture) (Figure 31A). En 3D, l'activité de la LDH dans les cellules de mélanome augmente significativement ($p = 0.0022$) jusqu'à 3 jours de culture (respectivement $DO_T/DO_{T0} = 2.17 \pm 0.2$ et 3.71 ± 0.5 après 2 et 3 jours de culture), puis diminue significativement ($p = 0.0022$) entre 4 et 6 jours (respectivement 3.57 ± 0.7 , 3.45 ± 0.3 et 2.07 ± 0.1 après 4, 5 et 6 jours de culture sur polyHEMA) (Figure 31B). L'activité de la LDH a été mesurée jusqu'à 10 jours de culture : elle reste stable en 2D (126.40 ± 38.5 après 10 jours), continue à diminuer en 3D (1.31 ± 0.1) mais reste supérieure à 1 (résultats non montrés).

L'activité de la LDH dans les Swiss 3T3 augmente significativement ($p = 0.0022$) sur PSt après 24 et 48 heures de culture (1.95 ± 0.1 et 3.47 ± 0.4) (Figure 31C). Sur revêtement anti-adhésif, l'activité de l'enzyme reste stable après 6 et 24 heures, puis diminue significativement ($p = 0.0022$) après 48 heures de culture (0.80 ± 0.1) (Figure 31D).

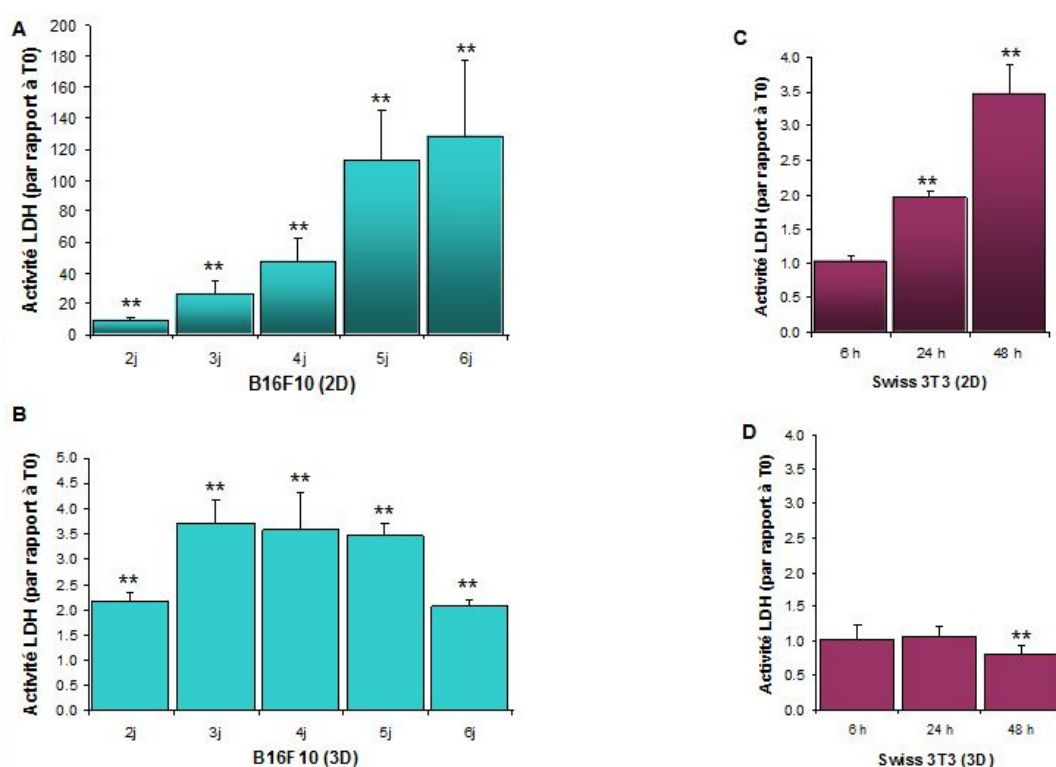


Figure 31 : Evolution de l'activité LDH dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées en 2D et 3D.

Activité de la LDH dans les cellules B16F10 vivantes cultivées pendant 6 jours sur PSt (A) et polyHEMA (B), et dans les fibroblastes Swiss 3T3 vivantes cultivées pendant 48 heures sur PSt (C) et polyHEMA (D). L'activité de l'enzyme correspond au ratio DO_T/DO_{T0} , DO_T étant la valeur d'absorbance au temps T et DO_{T0} la valeur d'absorbance à T0 lorsque les cellules sont ensemencées. Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes ($n = 9$) et le symbole ** ($p < 0.01$) indique des différences significatives entre T et T0 (test de Mann & Whitney).

2.2 La sensibilité ou la résistance à l'anoïkis dépend du type cellulaire

Les études présentées associent des mesures colorimétriques d'activation des caspases 3 et 9, une quantification des cellules Annexine-V positive par cytométrie en flux et une observation d'apoptose tardive par la méthode TUNEL.

2.2.1 Etat d'activation des caspases 3 et 9

L'état d'activation des caspases dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3, cultivées sur revêtement anti-adhésif, a été étudié. La caspase 3 est activée par clivage lors du processus apoptotique, son état renseigne donc sur la mort cellulaire. L'activation de la caspase 9, elle, indique une apoptose dépendante de la voie mitochondriale ou intrinsèque.

La caspase 3 est activée de façon significative ($p = 0.0286$) dans les cellules de mélanome après 3 jours de culture sur polyHEMA ($A/A0 = 2.47 \pm 0.14$, tandis qu'après 2 jours $A/A0 = 0.72 \pm 0.41$, ns). Le pic d'activation est atteint après 5 jours (4.59 ± 0.68) mais reste bien inférieur au contrôle positif (9.51 ± 2.65) (Figure 32A).

Il n'y a pas d'activation significative de la caspase 9 dans les cellules de mélanome jusqu'à 6 jours de culture en 3D (respectivement 0.86 ± 0.24 , 1.98 ± 0.96 et 1.77 ± 1.15 après 2, 4 et 6 jours) (Figure 33A).

Dans les cellules Swiss 3T3, la caspase 3 est fortement activée, et ceci de façon croissante et significative ($p = 0.0286$) après 24 heures (17.45 ± 0.35) et 48 heures (23.69 ± 1.24) de culture sur polyHEMA (Figure 32B).

De même, la caspase 9 est très activée ($p = 0.0121$) dans les fibroblastes (respectivement 10.61 ± 2.08 et 11.33 ± 1.45 après 24 et 48 heures de culture sur revêtement anti-adhésif) (Figure 33B).

Dans les cellules MC3T3, la caspase 3 est activée de façon significative après 12 heures (2.90 ± 1.46 , $p = 0.0022$) et 24 heures (5.50 ± 2.33 , $p = 0.0095$) de culture en 3D (Figure 32C).

La caspase 9 ne semble pas être activée dans les ostéoblastes de 3 heures à 24 heures (1.23 ± 0.37 , ns) de culture sur polyHEMA (Figure 33C).

L'état d'activation de la caspase 8 a également été évalué lors d'un essai pour les 3 lignées : l'expérience, effectuée une fois, n'indique aucune activation de cette enzyme aux de temps de culture habituels (résultats non montrés).

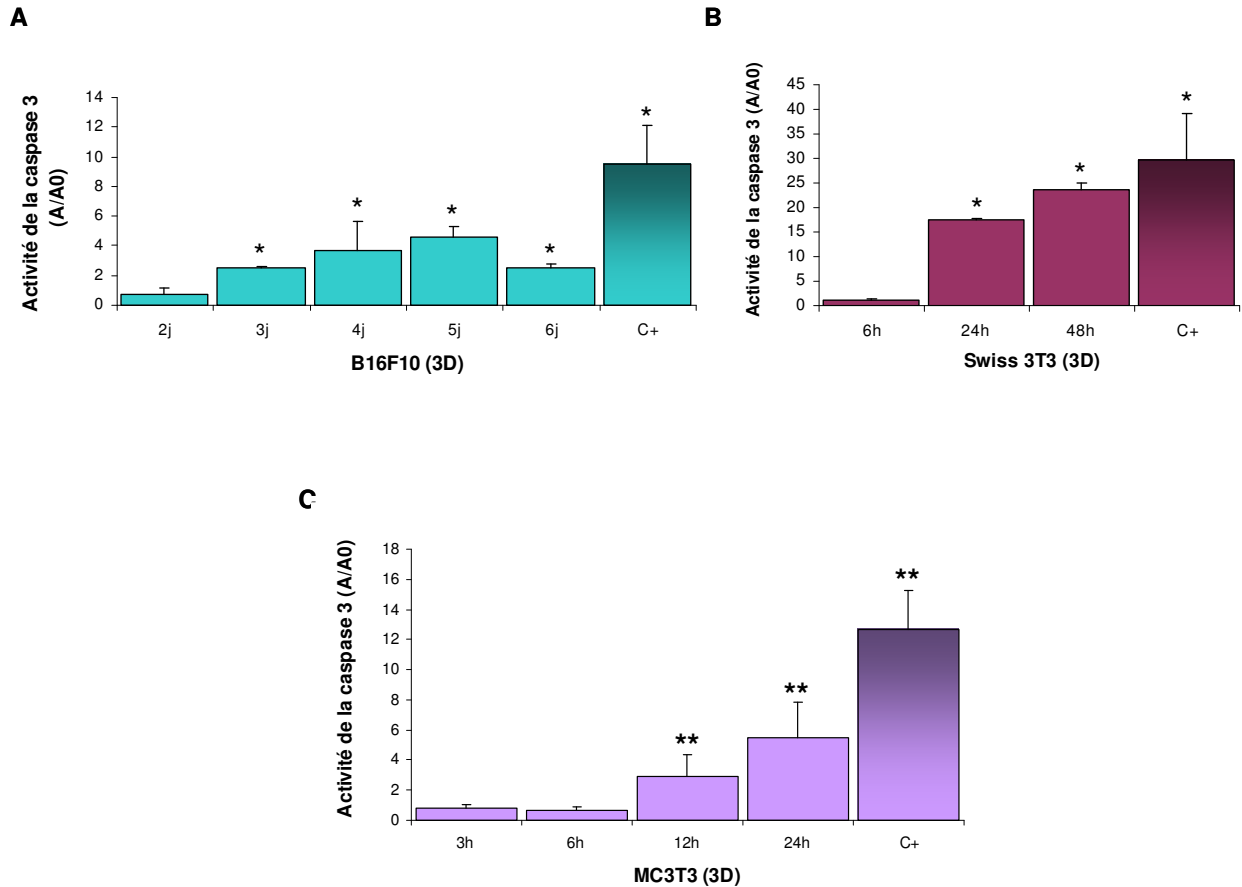


Figure 32 : Analyse de l'état d'activation de la caspase 3 dans les cellules cultivées sur polyHEMA.

L'activité de la caspase 3 dans les cellules de mélanome B16F10 (A), les Swiss 3T3 (B) et les MC3T3 (C) est représentée par le ratio A/A0, A étant l'activité spécifique à chaque temps T et A0 l'activité spécifique à T0 lorsque les cellules sontensemencées. C+ correspond au contrôle positif pour lequel les cellules sontensemencées pendant 24 heures en présence d'un inducteur d'apoptose (1 μ M de staurosporine). Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes (n = 9) et les symboles * (p < 0.05) et ** (p < 0.01) indiquent des différences significatives entre T et T0 (test de Mann & Whitney).

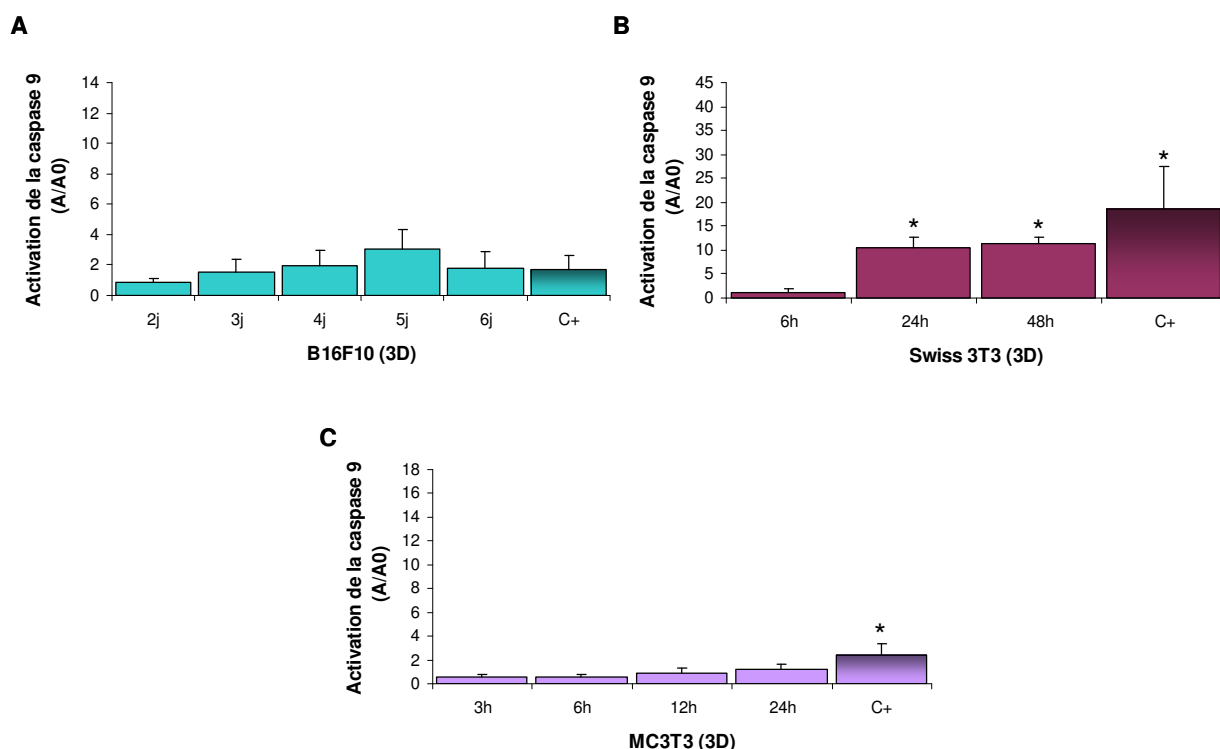


Figure 33 : Analyse de la voie mitochondriale de l'apoptose dans les cellules cultivées sur polyHEMA.

L'activité de la caspase 9 dans les cellules de mélanome B16F10 (A), les Swiss 3T3 (B) et les MC3T3 (C) est représentée par le ratio A/A0, A étant l'activité spécifique à chaque temps T et A0 l'activité spécifique à T0 lorsque les cellules sont ensemencées. C+ correspond au contrôle positif pour lequel les cellules sont ensemencées pendant 24 heures en présence d'un inducteur d'apoptose (1 μ M de staurosporine). Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes (n = 9) et le symbole * (p < 0.05) indique des différences significatives entre T et T0 (test de Mann & Whitney).

2.2.2 Evaluation de l'apoptose par marquage à l'annexine-V

Le pourcentage de cellules apoptotiques après ensemencement sur revêtement anti-adhésif a été évalué à l'aide du marquage à l'annexine-V (Figure 34).

Pour les cellules B16F10, la population annexine-V positive est significativement supérieure à chaque temps de culture comparé à T0 (0.79% $\pm$ 0.40) (Figure 34A). Cependant, le nombre de cellules apoptotiques reste quasiment inchangé de 2 à 6 jours de culture sur polyHEMA (2.18% $\pm$ 0.07, p = 0.045 après 2 jours, 2.68% $\pm$ 0.97, p = 0.0006 après 4 jours, 2.79% $\pm$ 1.10 après 6 jours).

Pour les fibroblastes Swiss 3T3, la population annexine-V positive augmente significativement ($p = 0.0022$) après 24 et 48 heures de culture sur polyHEMA (respectivement $5.90\% \pm 1.34$ et $5.30\% \pm 1.18$) (Figure 34B). Seulement $2.24\% \pm 0.99$ sont détectés après 6 heures et $1.72\% \pm 0.45$ à T0.

Pour les ostéoblastes MC3T3, le pourcentage de cellules apoptotiques augmente significativement ($p = 0.0022$) après 24 heures de culture sur revêtement anti-adhésif ($7.23\% \pm 3.27$). Les valeurs (ns) sont respectivement de $0.81\% \pm 0.98$, $0.77\% \pm 0.39$ et $1.43\% \pm 0.42$ après 3, 6 et 12 heures (Figure 34C) et $1.86\% \pm 0.62$ à T0.

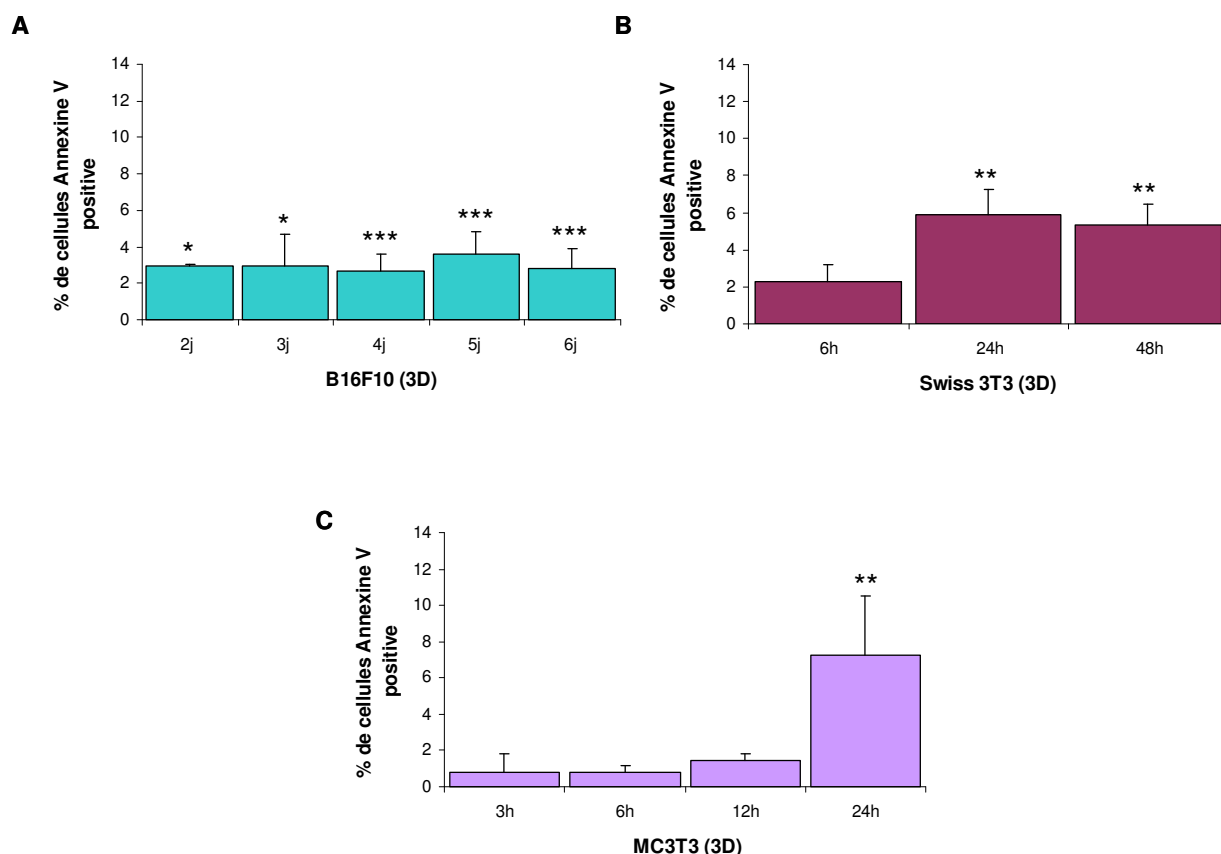


Figure 34 : Quantification de l'apoptose par le marquage à l'annexine-V.

Le pourcentage des cellules apoptotiques B16F10 (A), Swiss 3T3 (B) et MC3T3 (C) est déterminé à l'aide du marquage à l'annexine V de la phosphatidylsérine externalisée et l'analyse au cytomètre de flux. Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes ($n = 9$) et les symboles * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) et *** ($p < 0.001$) indiquent des différences significatives entre T et T0 (test de Mann & Whitney).

2.2.3 Evaluation de l'apoptose par la méthode T.U.N.E.L

Afin de confirmer les résultats précédents (tests d'activité de la caspase 3 et annexine V), un marquage des noyaux fragmentés lors du processus apoptotique a été effectué, à l'aide de la méthode T.U.N.E.L (Figure 35).

Pour les trois lignées, aucun signal n'est détecté lorsque les cellules sont cultivées en 2D.

En revanche, sur revêtement anti-adhésif (CEL et polyHEMA), des noyaux marqués sont observés, notamment pour les cellules normales Swiss 3T3 et MC3T3 à des temps de culture plus poussés (24 et 48 heures). Un pourcentage de cellules apoptotiques a été estimé en comptant le nombre de cellules totales et le nombre de cellules apoptotiques et ceci sur plusieurs champs d'observation de la lame : 4.74% des noyaux sont marqués après 6 jours de culture en 3D pour les cellules de mélanome, 15.4% après 48 heures de culture pour les Swiss 3T3 et 33.3% après 24 heures de culture pour les MC3T3 (résultats non montrés). Les résultats de comptage correspondent à un seul essai.

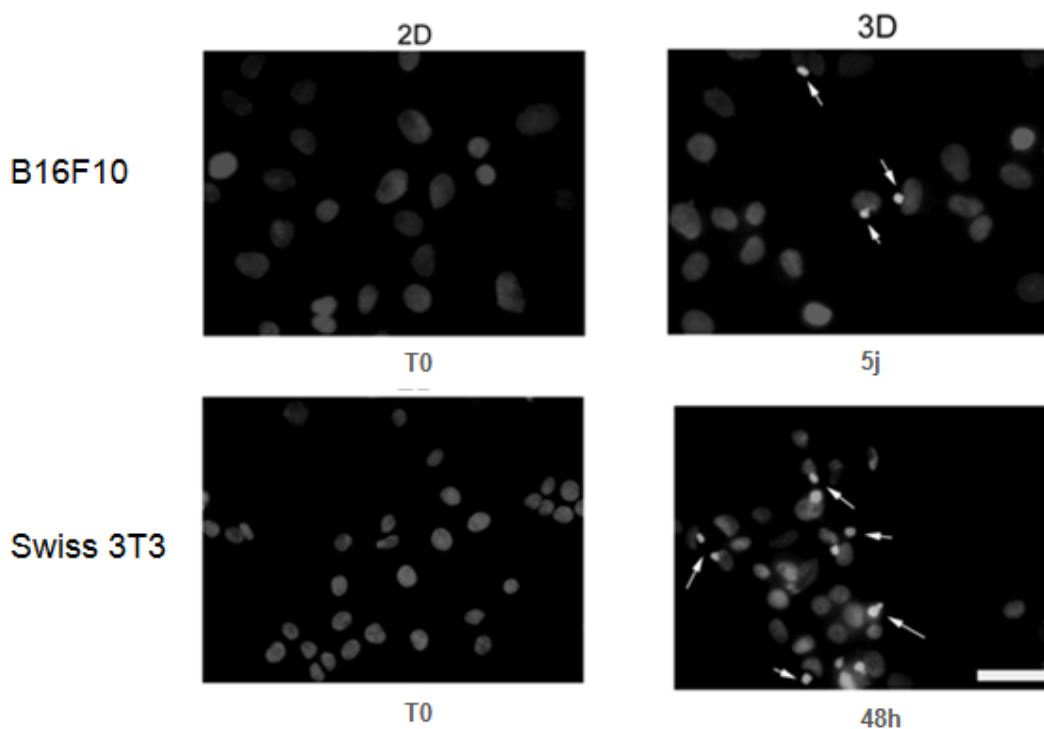


Figure 35 : Évaluation de l'apoptose par la méthode T.U.N.E.L dans les cellules B16F10 et Swiss 3T3 cultivées en 2D et 3D.

2D = culture sur PSt et 3D = revêtement anti-adhésif.

2.3 Les cellules apoptotiques et nécrotiques ne sont pas regroupées au centre des agrégats

Les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 en agrégats sur revêtement anti-adhésif ont été marquées avec de l'acridine orange qui pénètre dans les cellules vivantes et fluoresce alors en vert. Un marquage IP, effectué en parallèle, a permis de localiser les cellules mortes ayant perdu leur intégrité membranaire.

Pour les 3 lignées étudiées, la répartition des cellules en nécrose et en apoptose tardive dans les agrégats est aléatoire, elles sont retrouvées en périphérie et/ou au centre (Figure 36).

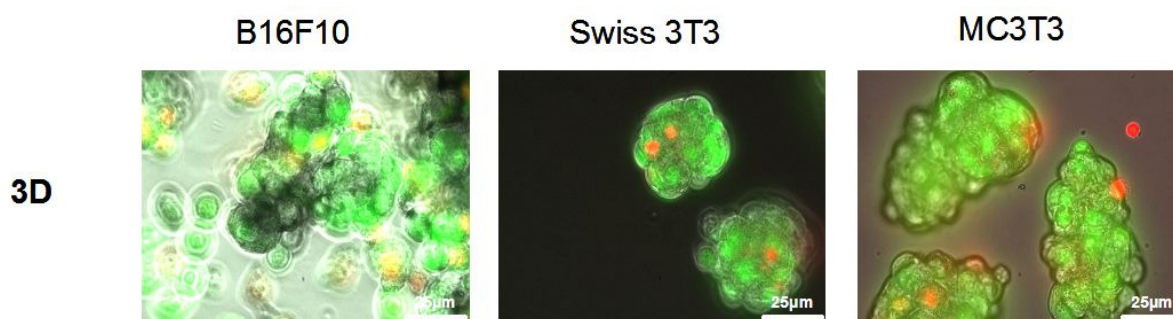


Figure 36 : Localisation des cellules nécrotiques et apoptotiques dans les agrégats.

Les cellules vivantes sont marquées à l'aide de l'acridine orange (fluorescence verte) et le marquage à l'IP (rouge) permet d'identifier les cellules mortes, après 3 jours, 48 heures, 24 heures respectivement pour les cellules B16F10, Swiss 3T3, MC3T3. Objectif x 63.

Les différentes techniques ont permis de mettre en évidence une résistance à l'apoptose des cellules de mélanome B16F10 cultivées sur revêtement anti-adhésif, même si celles-ci prolifèrent moins comparativement aux résultats obtenus sur PSt. Les lignées normales Swiss 3T3 et MC3T3, par contre, entrent rapidement en apoptose lorsqu'elles sont cultivées en 3D.

3 Analyse des voies de signalisation dans les cellules cultivées sur substratum anti-adhésif

3.1 Les voies de survie PI3K/AKT et MAPK sont différemment activées suivant le type cellulaire

L'expression des intégrines ($\alpha 5$ et αv), molécules d'adhérence impliquées dans la médiation des signaux intracellulaires, a été analysée par western blot, ainsi que l'état d'activation de quelques protéines clés impliquées dans la prolifération et la survie (Figures 37 et 38).

Dans les cellules B16F10, l'expression des intégrines $\alpha 5$ augmente entre 3 et 6 jours de culture sur polyHEMA. Celle des intégrines αv reste identique à T0 jusqu'à 5 jours de culture sur revêtement anti-adhésif, puis diminue à 6 jours (Figure 37). L'expression d'ILK1 totale demeure inchangée jusqu'à 6 jours de culture en 3D alors que celle de la survivine diminue par rapport à T0, notamment après 4 jours de culture (Figure 38).

La protéine FAK est activée à 2 jours de culture sur polyHEMA dans les cellules de mélanome, puis l'expression de la forme activée pY397FAK diminue entre 3 et 6 jours de culture (Figure 37). L'expression de FAK totale reste inchangée. La kinase AKT est activée entre 2 et 4 jours de culture, puis l'expression de pS473AKT diminue à 5 et 6 jours, tandis que l'expression de la forme totale reste inchangée jusqu'à 6 jours. Les kinases de la voie des MAP Kinases, ERK1 et 2, sont également activées dans les cellules cancéreuses jusqu'à 6 jours de culture en 3D, l'expression des formes totales reste inchangée. L'expression de Bcl-2 diminue entre 2 jours et 6 jours de culture (Figure 38).

Dans les cellules Swiss 3T3, l'expression des intégrines $\alpha 5$ diminue après 48 heures de culture sur polyHEMA. Celle des intégrines αv diminue dès 6 heures de culture, puis de façon considérable après 48 heures. L'expression de la forme totale d'ILK1 n'est pas modifiée après 48 heures de culture en 3D, alors que celle de la survivine diminue après 6 heures, jusqu'à disparition totale à 24 et 48 heures. L'expression de pY397FAK et FAK totale diminue dans les fibroblastes, de même que la forme activée d'AKT et des protéines ERK1/2. Cependant l'expression des

formes totales d'AKT et d'ERK1/2 reste inchangée. L'expression de Bcl-2 diminue après 24 heures de culture.

Dans les cellules MC3T3, l'expression des intégrines $\alpha 5$ augmente entre 6 et 12 heures de culture, puis diminue après 24 heures de culture sur revêtement anti-adhésif. Les intégrines αv sont faiblement exprimées après 12 et 24 heures de culture, de même que pY397FAK après 24 heures. L'expression d'ILK1 reste inchangée par rapport à T0, celle de la survivine diminue fortement dès 6 heures de culture. L'expression des formes totales de FAK et AKT reste identique à T0. pS473AKT est faiblement exprimée après 24 heures de culture en 3D, mais l'expression diminue dès 6 heures. Les protéines ERK1/2 sont activées après 6 et surtout 12 heures de culture dans les ostéoblastes cultivés en 3D, puis l'expression de p-(ERK1/2) diminue considérablement à 24 heures, alors que l'expression des formes totales reste inchangée. La protéine Bcl-2 est faiblement exprimée dans cellules MC3T3 à tous les temps de culture.

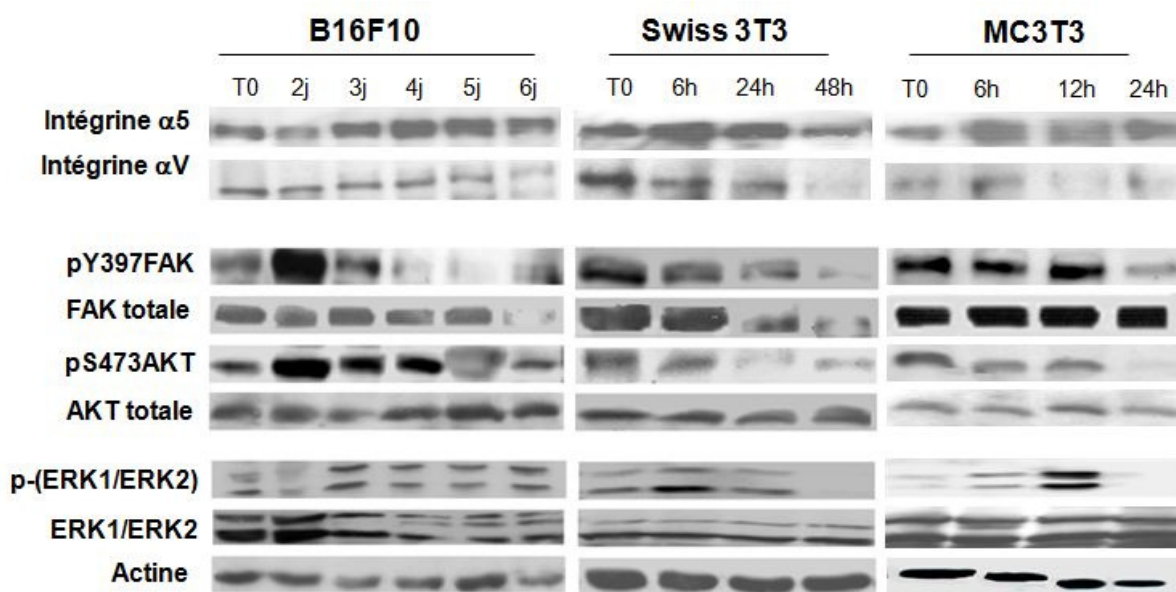


Figure 37 : Analyse par western blot des voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK dans les cellules cultivées en 3D.

Etude de l'expression des intégrines $\alpha 5$ et αv , analyse de l'état d'activation des kinases FAK, AKT et ERK1/2 dans les 3 types cellulaires cultivés en 3D. L'actine est utilisée comme contrôle interne.

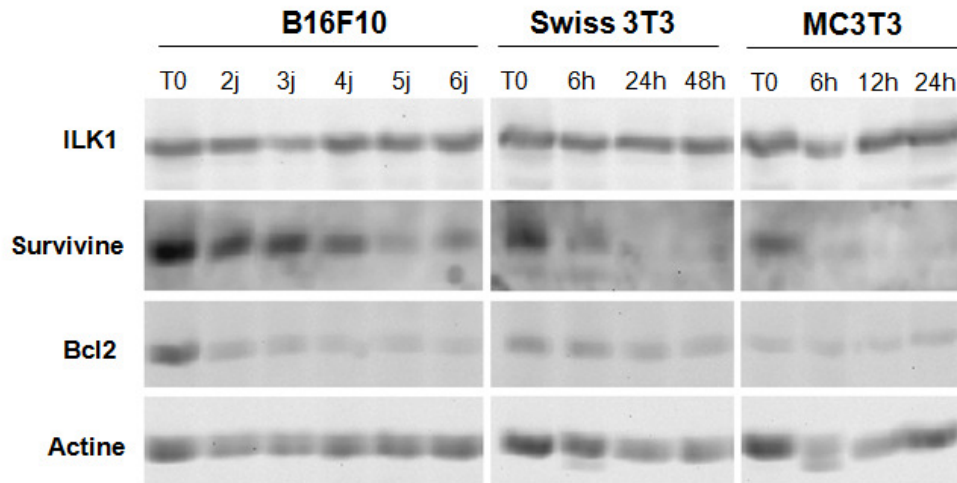


Figure 38 : Analyse par western blot de l'expression des protéines ILK1, survivine et Bcl-2 dans les cellules cultivées en 3D.
L'actine est utilisée comme contrôle interne.

3.2 La voie de survie PI3K/AKT est impliquée dans la prolifération cellulaire et l'activation d'AKT

3.2.1 L'inhibition de PI3K affecte la prolifération des cellules de mélanome cultivées en 3D, et l'activation d'AKT

Afin de confirmer l'implication de la voie PI3K/AKT dans la résistance à l'apoptose sur revêtement anti-adhésif, les cellules de mélanome ont été traitées pendant 1 heure avec 20 μ M d'un inhibiteur de la kinase PI3K, LY2940002 en solution dans du DMSO, puis ensemencées sur polyHEMA. Un contrôle sans inhibiteur (traitement avec uniquement du DMSO) a été réalisé en parallèle.

Les résultats obtenus montrent une diminution de l'indice N/N0 après 24 heures de culture sur polyHEMA ($N/N0 = 1.77 \pm 0.45$) comparé au contrôle ($N/N0 = 2.50 \pm 0.80$). Après 48 heures de culture, les valeurs de N/N0 sont de 1.06 ± 0.44 et 2.59 ± 0.62 respectivement pour les cellules traitées et le contrôle.

Les résultats préliminaires suggèrent une inhibition de l'activation d'AKT dans les cellules de mélanome traitées par LY2940002 (résultats non montrés), cependant une optimisation du protocole est nécessaire pour confirmer cette observation.

3.2.2 L'inhibition de la kinase AKT par siRNA affecte la prolifération des cellules B16F10 cultivées en 3D

L'expression d'AKT 1 a été inhibée par la technique d'ARN interférentiel, puis les cellules cancéreuses B16F10 transfectées pendant 48 heures ont été cultivées sur polyHEMA pendant 48 heures.

De très fortes concentrations d'oligonucléotides ont été utilisées à la suite des premiers essais car AKT est fortement exprimée dans les cellules de mélanome B16F10. La difficulté a été de trouver une concentration adéquate de lipofectamine 2000 pour permettre la transfection tout en limitant au mieux les effets cytotoxiques. Nos résultats préliminaires (expérience réalisée une fois) indiquent une diminution de l'indice N/N0 après 48 heures de culture sur revêtement anti-adhésif, comparé au contrôle négatif (résultats non montrés). Nous avons vérifié par western blot que l'expression d'AKT totale était bien diminuée après 48 heures de culture sur revêtement anti-adhésif (Figure 39). Cependant des mises au point sont nécessaires afin d'optimiser notre protocole de transfection. AKT1 semble donc être impliquée dans la survie des cellules B16F10 cultivées en 3D. Nous avons effectué en parallèle une inhibition de l'expression d'AKT2, et de façon simultanée celle des deux isoformes AKT1 et AKT2. L'inhibition de l'isoforme AKT2 n'a eu aucun effet sur la prolifération des cellules B16F10 cultivées sur polyHEMA.

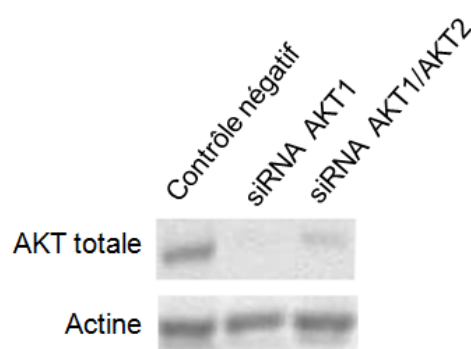


Figure 39 : Analyse par western blot de l'expression de la forme totale d'AKT dans les cellules B16F10 transfectées par des siRNA ciblant AKT1 et cultivées sur polyHEMA pendant 48 heures.

L'ensemble des résultats indique que les voies de survie PI3K/AKT et MAPK sont activées dans les cellules de mélanome B16F10, résistantes à l'anoïkis sur

revêtement anti-adhésif. Une inhibition de la voie PI3K/AKT affecte leur prolifération en 3D.

Par ailleurs, il n'y a pas d'activation de ces deux voies dans les cellules normales Swiss 3T3 et MC3T3 qui sont rapidement induites en apoptose.

4 Etude du rôle de la fibronectine dans la résistance ou la sensibilité à l'anoïkis

L'augmentation de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 5$ dans les cellules B16F10 entre 3 et 6 jours de culture sur polyHEMA, contrairement à ce qui se passe dans les autres types cellulaires, incite à explorer l'expression de la Fn sécrétée par les cellules agrégées.

4.1 L'expression de la fibronectine néosynthétisée par les agrégats est observée dans les trois types cellulaires

La présence de la fibronectine, protéine de la matrice extracellulaire, a été analysée dans les cellules cultivées en 3D par immunocytochimie (Figure 40).

Le signal correspondant à la fibronectine augmente dans les cellules B16F10 en agrégats après 4 jours de culture sur polyHEMA, puis diminue jusqu'à 6 jours de culture (Figure 40A).

Dans les fibroblastes Swiss 3T3, la protéine est présente dans les cellules agrégées après 24 et 48 heures de culture en 3D (Figure 40B).

De même, dans les ostéoblastes MC3T3, la fibronectine est observée dans les agrégats après 6 et 24 heures de culture (Figure 40C).

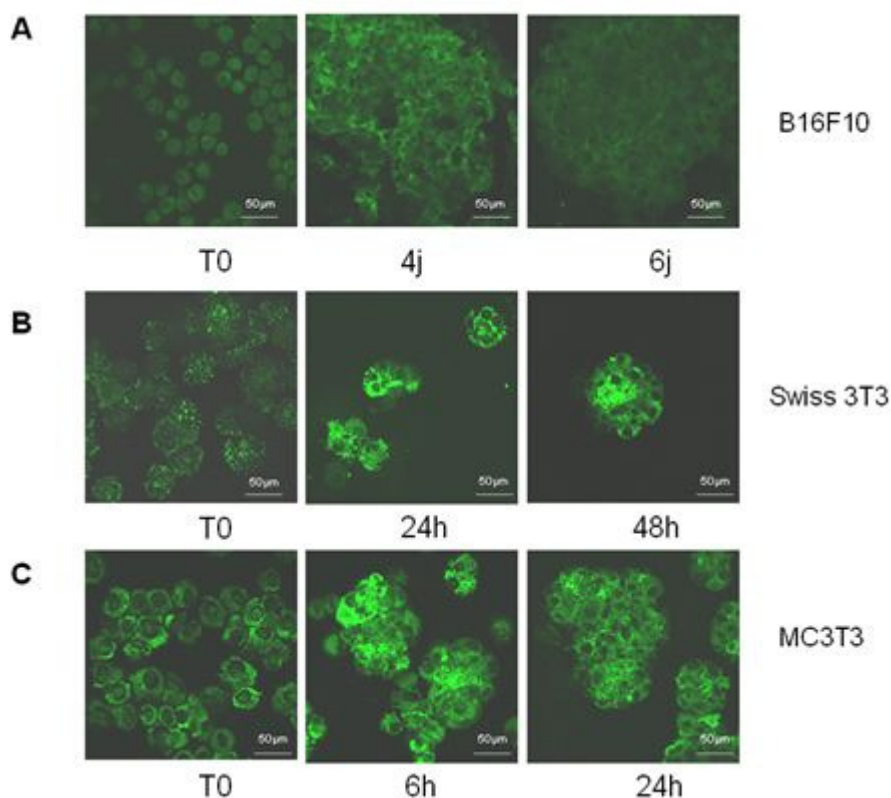


Figure 40 : Analyse immunocytochimique de l'expression de la fibronectine dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées sur revêtement anti-adhésif. (Objectif x 40)

4.2 L'expression du gène fibronectine diffère suivant le type cellulaire

L'expression du gène de la fibronectine dans les trois types cellulaires cultivés en 3D a été analysée par RT-PCR en temps réel, en comparaison à T0 (contrôle). Les gènes de référence utilisés pour la normalisation sont ceux de l'*ARN polymérase II* et *Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase 1*.

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas d'évolution de l'expression du gène dans les cellules de mélanome cultivées sur revêtement anti-adhésif, comparé à T0 (Figure 41A). Les valeurs d'expression sont respectivement de 1.29 ± 0.84 et 0.91 ± 0.42 après 2 et 6 jours de culture par rapport à T0 (1 ± 0.64).

L'expression du gène *fibronectine* est croissante dans les cellules Swiss 3T3 cultivées en 3D (les expressions sont de 1.69 ± 1.071 , 3.79 ± 1.11 et 4.32 ± 1.8 respectivement après 6, 24 et 48 heures) comparé à T0 (1 ± 0.59) (Figure 41B).

Dans les cellules MC3T3, l'expression du gène est également croissante, elle est respectivement de 1.69 ± 0.56 , 4.56 ± 1.87 et 4.67 ± 1.69 après 6, 12 et 24 heures de culture en 3D, 1 ± 0.36 pour le contrôle (T0) (Figure 41C).

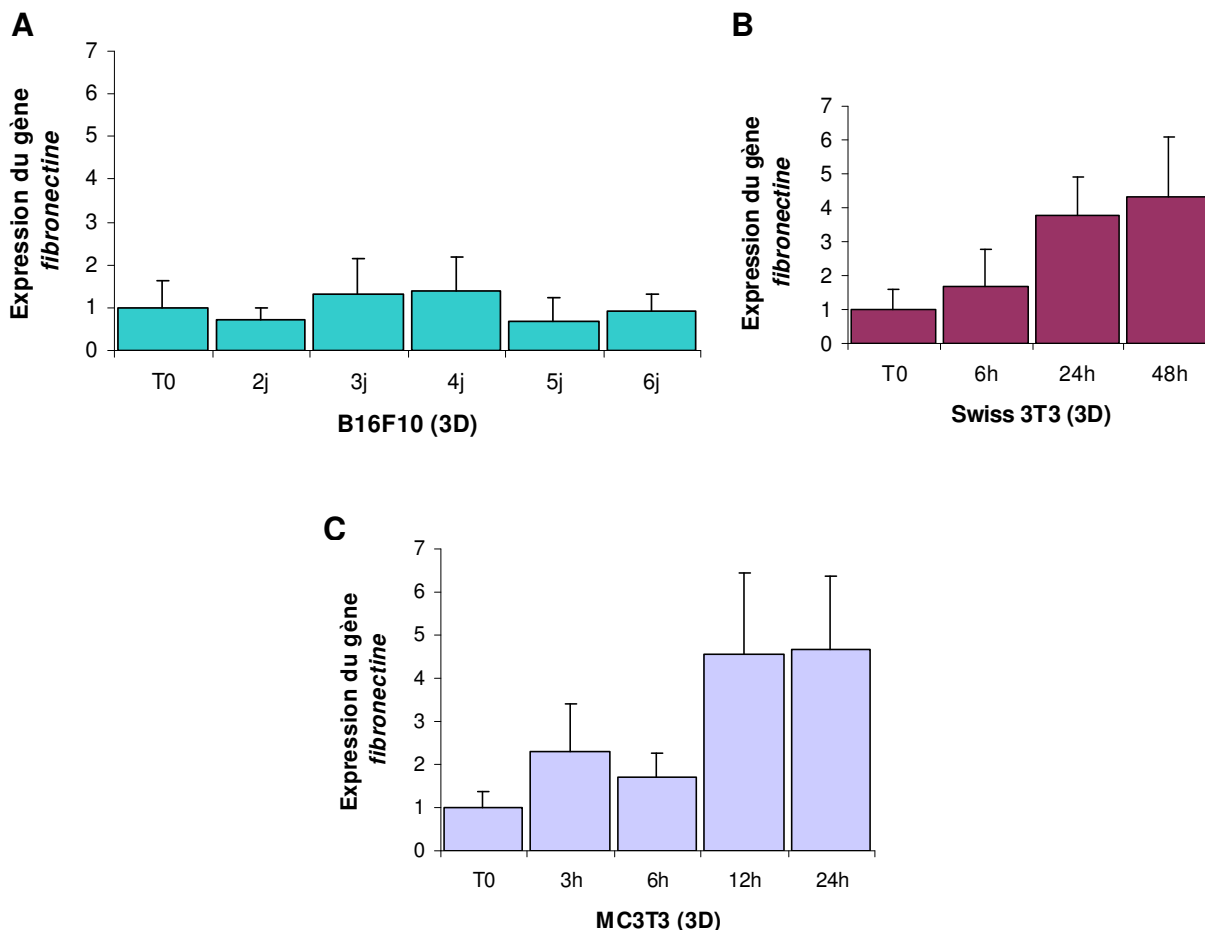


Figure 41 : Analyse de l'expression du gène *fibronectine* dans les cellules B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées en 3D.

Les expressions sont représentées en comparaison à T0 et sont la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata. Les gènes de référence utilisés pour la normalisation sont *ARN Pol II* et *HPRT1*. Le logiciel Genex (BioRad) a été utilisé pour le traitement de toutes les données.

4.3 L'inhibition de l'expression de la fibronectine par siRNA n'influence ni la prolifération cellulaire ni l'apoptose

Différentes concentrations de siRNA ont été utilisées pour la mise en place et l'optimisation du protocole. En effet, dans un premier temps nous avons effectué une série de transfections avec des concentrations variables d'oligonucléotides et de lipofectamine 2000. L'expression de la protéine a été analysée par immunofluorescence après 24, 48, 72 et 96 heures de transfection sur PSt. Une

meilleure inhibition de la protéine a été observée après 72 heures de transfection (résultats non montrés), nous avons donc choisi ce temps de transfection pour les essais suivants. Dans un deuxième temps, les cellules de mélanome ont été transfectées pendant 72h puis ensemencées sur polyHEMA pendant 96 heures. L'expression du gène *Fibronectine* été mesurée par RT-PCR (Figure 42) après 24, 48, 72 et 96 heures de culture sur polyHEMA afin de vérifier que l'expression de Fn était bien inhibée. Un contrôle négatif a été utilisé en parallèle pour tous les essais (transfection d'oligonucléotides ne ciblant l'expression d'aucune protéine dans les cellules murines).

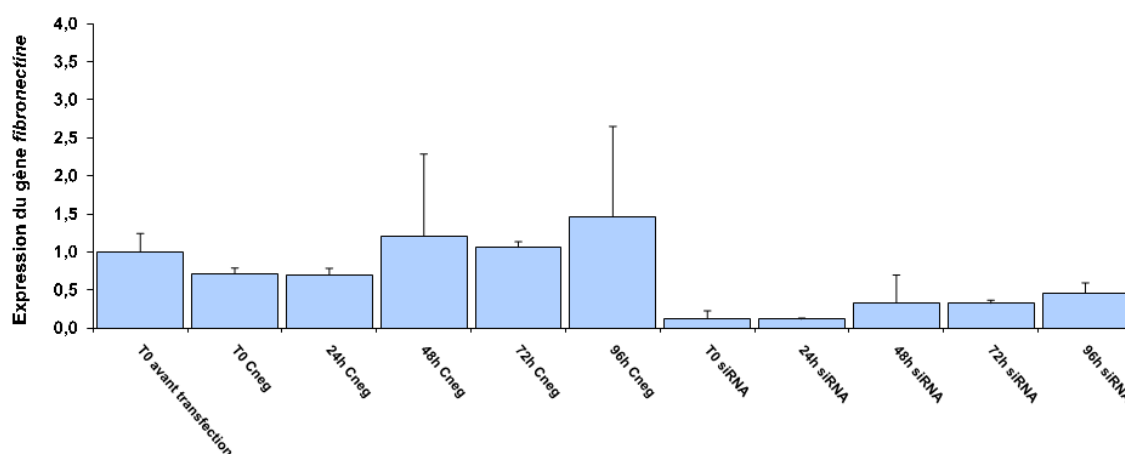


Figure 42 : Analyse de l'expression du gène *fibronectine* dans les cellules B16F10 transfectées avec des siRNA Fn puis ensemencées sur polyHEMA.

Le gène *fibronectine* a été analysé avant la transfection (T0 avant transfection), 72h après transfection et avant ensemencement sur polyHEMA (T0 contrôle négatif et T0 siRNA), puis après 24, 48, 72 et 96 heures de culture sur polyHEMA. Cneg = contrôle négatif.

Les études sur la prolifération, l'apoptose et la répartition dans le cycle cellulaire ont été ensuite effectuées.

4.3.1 Evaluation par des numérations associées au test d'exclusion au bleu Trypan

Afin d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'expression de la fibronectine sur la prolifération, les cellules de mélanome transfectées ont été cultivées sur revêtement anti-adhésif. Une numération a été effectuée après 72 heures de culture (Figure 43) : les indices N/N0 sont de 1.91 ± 0.25 , 3.20 ± 0.33 et 4.11 ± 1.05 respectivement à 24, 48 et 72 heures de culture sur polyHEMA *versus* 1.91 ± 0.20 , 3.21 ± 0.49 et $4.35 \pm$

0.51 à 24, 48 et 72 heures de culture en 3D pour le contrôle négatif. L'inhibition de l'expression de la Fn dans les cellules B16F10 ne modifie pas significativement leur prolifération en 3D.

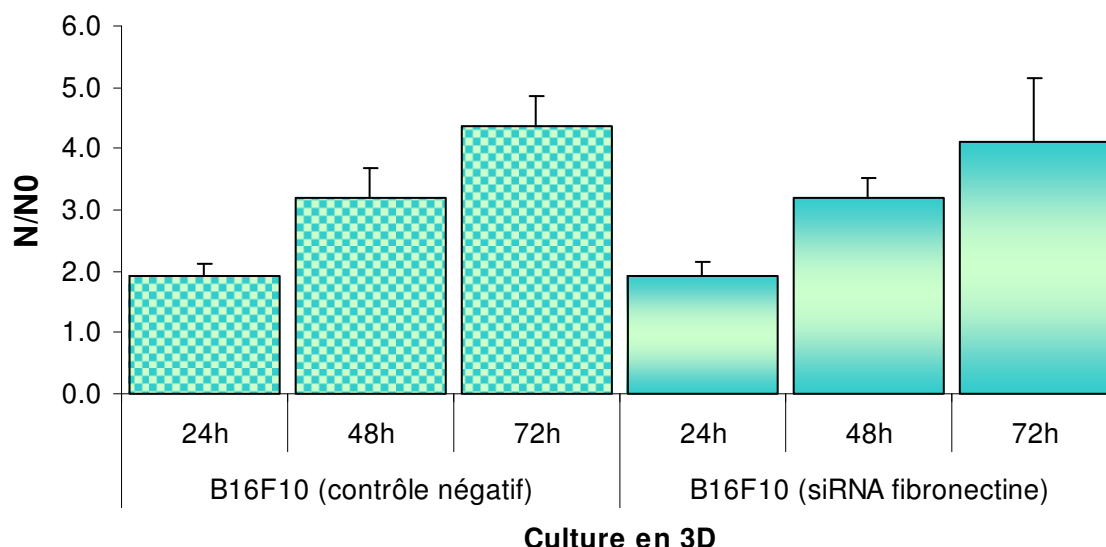


Figure 43 : Evaluation des indices N/N0 pour les cellules transfectées (siRNA fibronectine) en comparaison au contrôle négatif.

Les résultats sont la moyenne de 2 expériences indépendantes réalisées en triplicata.

4.3.2 Analyse de l'apoptose dans les cellules transfectées puis cultivées sur polyHEMA

Les essais, effectués une fois, montrent qu'il n'y a pas d'activation de la caspase 3 dans les cellules de mélanome transfectées, puisensemencées sur revêtement anti-adhésif. L'inhibition de l'expression de la fibronectine n'induit pas d'apoptose dans les cellules cancéreuses (résultats non montrés).

4.3.3 Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire

Les résultats indiquent que l'inhibition de l'expression de la Fn n'a aucun effet sur la répartition des cellules de mélanome dans le cycle (Figure 44) : la majorité des cellules est bloquée en phase G0/G1 (contrôle négatif et cellules transfectées avec des siRNA Fn). Les résultats pour le contrôle négatif concordent avec des études précédentes dans le laboratoire qui avaient montré un arrêt du cycle en G1 lorsque les cellules étaient cultivées sur revêtement anti-adhésif (Velzenberger et al., 2008).

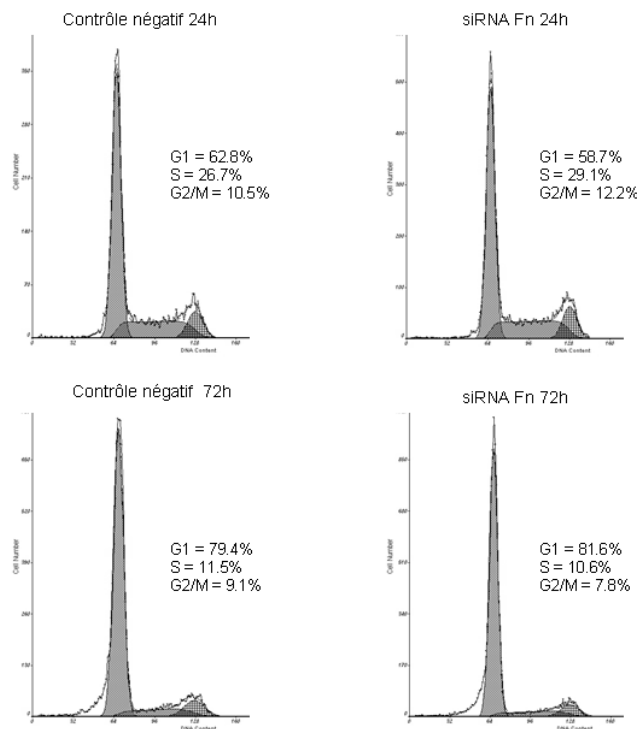


Figure 44 : Répartition dans le cycle cellulaire des cellules de mélanome B16F10 transfectées puis ensemencées sur polyHEMA pendant 72 heures.
A gauche les contrôles négatifs à 24 et 72 heures de culture en 3D. A droite les cellules transfectées avec des siRNA Fn. La majorité des cellules est arrêtée en phase G1.

4.3.4 Observation de la mitose après inhibition de l'expression de la Fn

Un marquage de l'histone H3 phosphorylée, permettant d'estimer les cellules en mitose, a été effectué sur des cellules de mélanome transfectées puis ensemencées sur polyHEMA (Figure 45). Il n'y a pas de différence de marquage sur revêtement anti-adhésif après transfection.

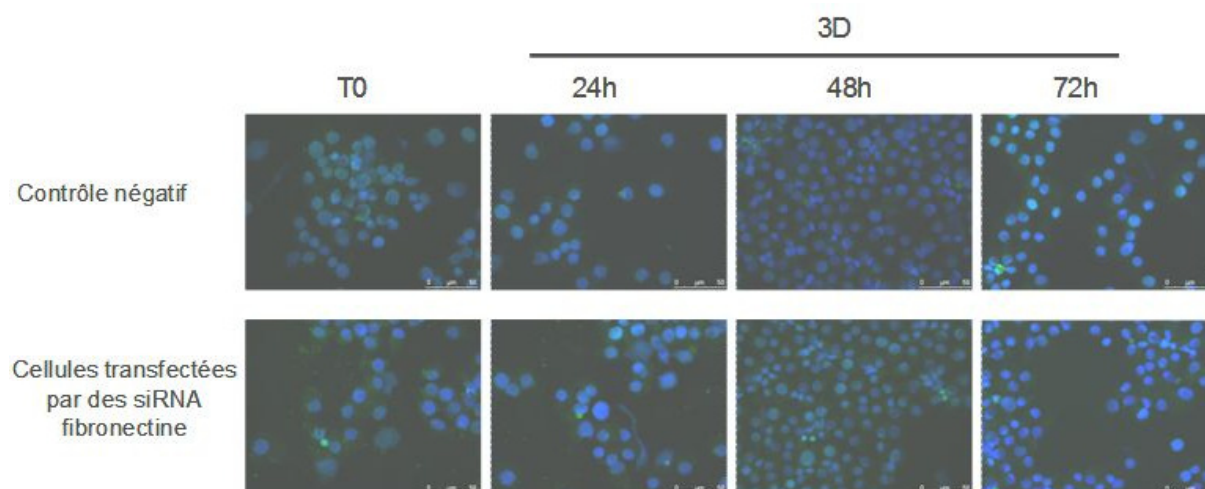


Figure 45 : Analyse des cellules B16F10 en mitose à l'aide du marquage de l'Histone H3 phosphorylée (vert).

Un double marquage des noyaux au DAPI a été utilisé (en bleu). Objectif x 40. Barre = 50µm.

L'ensemble de nos résultats portant sur la Fn indique que cette protéine de la MEC est exprimée dans les trois types cellulaires, avec une augmentation de l'expression du gène dans les lignées normales Swiss 3T3 et MC3T3 cultivées en 3D. En revanche elle reste inchangée dans les cellules B16F10. Par ailleurs, l'inhibition de son expression à l'aide de siRNA n'influence ni la prolifération ni l'apoptose des cellules de mélanome cultivées en 3D.

5 Etude de l'activité anti-tumorigénique de la pectine Okra

5.1 La morphologie cellulaire est affectée par la pectine Okra

Les cellules B16F10 cultivées sur PSt, adhèrent et prolifèrent en 2D. Sur polyHEMA, elles adoptent une morphologie 3D et forment de larges agrégats. En présence de la pectine Okra RG-I (0.1%), il y a à 24 et 48 heures une diminution de l'adhésion sur PSt et de l'agrégation sur polyHEMA (Figure 46).

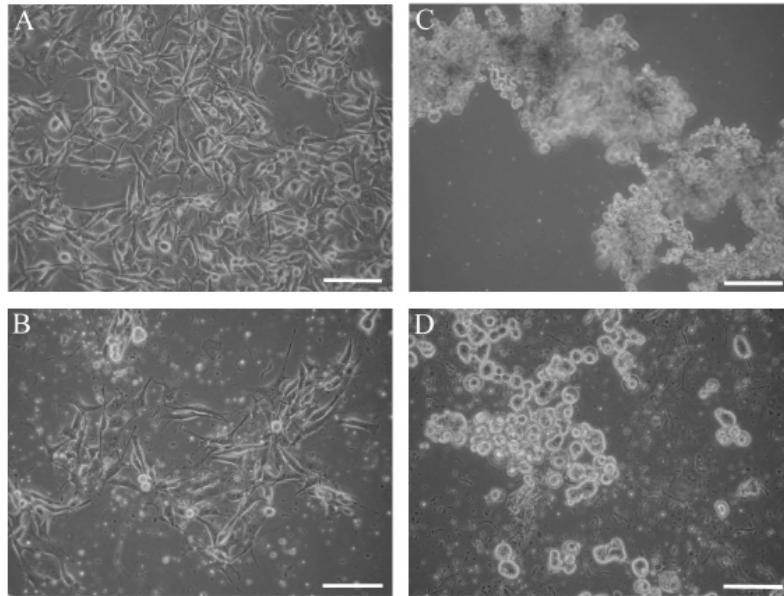


Figure 46 : Morphologie des cellules B16F10 sur PSt et polyHEMA après 48 heures de traitement avec la pectine Okra.

Les cellules de mélanome adhèrent sur PSt sans (A) ou en présence (B) d'Okra. Les agrégats formés sur polyHEMA (C) sont réduits après 48 heures de traitement avec la pectine (D). Barre = 100μm.

5.2 La prolifération et le cycle cellulaire sont modifiés par la pectine Okra

La prolifération des cellules B16F10 après 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, en présence ou non (contrôle) d'Okra RG-I, a été étudiée (Figure 47), ainsi que leur répartition dans le cycle cellulaire (Figure 48).

Sur PSt, l'indice N/N0 diminue significativement ($p < 0.001$) en présence de la pectine (3.66 ± 0.84) comparé au contrôle (6.12 ± 0.97).

Par ailleurs, il y a une augmentation significative ($p < 0.05$) du pourcentage de cellules bloquées en phase G2/M ($8.52 \pm 0.76\%$ vs $7.44 \pm 0.87\%$ pour le contrôle).

Sur polyHEMA, l'indice de prolifération des cellules de mélanome diminue significativement ($p < 0.0001$) après 48 heures de traitement avec Okra RG-I ($N/N0 = 1.16 \pm 0.25$) comparé au contrôle (4.66 ± 0.70).

La majorité des cellules est bloquée en phase G1 du cycle en présence ou non de la pectine. Cependant le traitement entraîne une diminution significative ($p < 0.0001$) du pourcentage de cellules bloquées en phase G1 ($58.57 \pm 1.82\%$ vs 65.88

$\pm 3.21\%$ pour le contrôle), et une augmentation significative ($p < 0.0001$) de la population bloquée en phase G2/M ($13.61 \pm 1.11\%$ vs $7.24 \pm 0.61\%$ pour le contrôle).

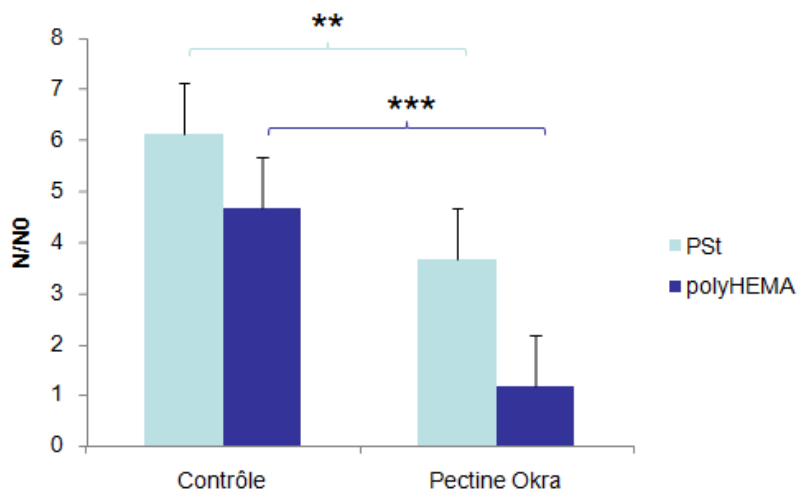


Figure 47 : Prolifération des cellules B16F10 après 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, en présence ou non (contrôle) de la pectine Okra.

Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes ($n = 9$) et les symboles ** ($p < 0.01$) et *** ($p < 0.001$) indiquent des différences significatives par rapport au contrôle (test de Mann & Whitney).

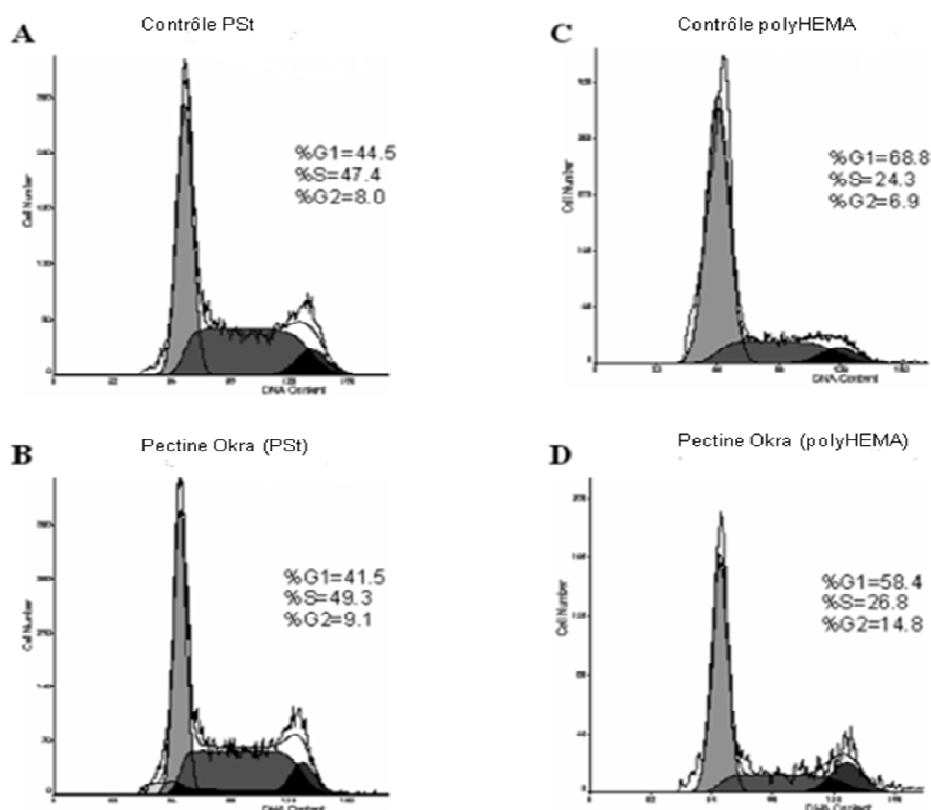


Figure 48 : Répartition des cellules B16F10 dans le cycle cellulaire après 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, sans (contrôle, A et B) ou en présence (B, D) de la pectine Okra.

Les histogrammes sont représentatifs de 9 expériences réalisées.

5.3 L'apoptose est induite par la pectine Okra

Les tests annexine-V et Apostain ont été utilisés pour déterminer le pourcentage de cellules apoptotiques après 24 et 48 heures de culture sur PSt et polyHEMA, en présence ou non de la pectine.

En 2D, le pourcentage des cellules annexine-V positives augmente significativement ($p < 0.05$) après 24 heures de traitement ($2.14 \pm 0.17\%$ vs $1.29 \pm 0.24\%$ pour le contrôle).

De même en 3D, $6.79 \pm 0.65\%$ ($p < 0.001$) de cellules sont annexine-V positives après 24 heures de traitement tandis que seulement $2.55 \pm 0.88\%$ sont apoptotiques dans le contrôle.

Le marquage à l'apostain indique qu'après 48 heures, le pourcentage de cellules apoptotiques reste élevé sur polyHEMA en présence d'Okra RG-I (3.21%), comparé au PSt (0.29% avec la pectine).

L'ensemble des résultats indiquent que la pectine Okra agit sur la prolifération, le cycle cellulaire et induit en apoptose les cellules de mélanome B16F10.

Tableau 6 : Synthèse des résultats obtenus dans les trois lignées cellulaires cultivées en 3D.

		B16F10	Swiss 3T3	MC3T3
Aspects morphologiques	Morphologie	agrégée	agrégée	agrégée
	Fibres d'actine	-	-	-
	Expression RhoA	→	↘↘	
	Activité RhoA	++	↘↘	
Etudes sur la prolifération et la survie	Indice N/N0	↗ puis ↘	↘	↘
	Activité intracellulaire de la LDH	↗ puis ↘	↘	
	Activité caspase 3	↗ puis ↘	↗↗	↗
	Activité caspase 9	→	↗↗	→
	Cellules annexine-V positives	↗	↗	↗
	Cellules T.U.N.E.L positives	↗	↗↗	↗↗
	Localisation des cellules nécrotiques dans les agrégats	aléatoire	aléatoire	aléatoire
Analyse des voies de signalisation	Activité de FAK	↗ puis ↘	↘	↘
	Activité d'AKT	↗ puis ↘	↘	↘
	Activité de ERK1/2	↗	↘	↘
	Intégrine α5	↗	↘	↘
	Intégrine αv	→ puis ↘	↘	→
	ILK	→	→	→
	survivine	↘	↘	↘
	Bcl-2	↘	↘	→
Modulation des voies de signalisation	Inhibition de PI3K (LY294002)	↘ de la prolifération		
	Inhibition d'AKT (siRNA)	↘ de la prolifération		
Analyse du rôle de la fibronectine dans la survie	Expression de la protéine	↗ puis ↘	↗	↗
	Expression du gène	→	↗	↗
	Effet de l'inhibition de l'expression (siRNA)	Pas d'effet sur la prolifération ni sur le cycle cellulaire		
Effet d'Okra	Morphologie	↘ agrégation		
	Indice N/N0	↘		
	Cycle cellulaire	↘ nombre de cellules en G1 ↗ nombre de cellules en G2/M		
	Apoptose	↗		

Discussion

Les interactions cellules-cellules et cellules-MEC régulent l'adhésion et la prolifération, par l'activation des voies de signalisation intracellulaire. La perturbation de ces interactions peut induire une forme d'apoptose appelée anoïkis, processus permettant le maintien de l'homéostasie tissulaire dans l'organisme (Chiarugi & Giannoni, 2008; Frisch & Francis, 1994; Gilmore, 2005).

La résistance à l'anoïkis est une caractéristique des cellules tumorales et une étape critique lors de la transformation métastatique (Geiger & Peeper, 2009; Grossmann, 2002; Simpson et al., 2008). Afin d'identifier les mécanismes moléculaires de l'adhésion et de la survie cellulaire, différents modèles de culture sont couramment utilisés *in vitro*. Au cours de ce travail de thèse, des revêtements anti-adhésifs empêchant l'adhésion et induisant l'agrégation des cellules adhérentes ont été utilisés dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à l'anoïkis des cellules de mélanome hautement métastatique B16F10, dans une configuration d'architecture 3D. Les fibroblastes Swiss 3T3 et les pré-ostéoblastes MC3T3 ont été utilisés comme modèles cellulaires non cancéreux.

1 La morphologie des cellules en 3D

Les cellules adhérentes B16F10, Swiss 3T3 et MC3T3 prolifèrent sur PSt (2D) et adoptent une architecture en 3D sur revêtements anti-adhésifs comme le polyHEMA ou les supports celluloses (Gekas et al., 2004; Velzenberger et al., 2008), avec formation de larges agrégats pour les cellules de mélanome. Les études portant sur la morphologie indiquent également une organisation du cytosquelette d'actine en fibres de stress sur PSt pour les trois types cellulaires contrairement à l'absence d'organisation structurée des filaments d'actine obtenue sur polyHEMA ou CEL.

2 La prolifération et la survie des cellules en 3D

Les travaux précédents sur la prolifération cellulaire (Velzenberger et al., 2008) ont montré que l'indice de prolifération N/N0 des cellules cancéreuses cultivées pendant 48 heures sur revêtements anti-adhésifs était significativement diminué comparativement au PSt, même si celles-ci continuent à proliférer en 3D. En

effet, la majorité des cellules est bloquée en phase G1 du cycle cellulaire sur polyHEMA ou CEL alors qu'en 2D, le pourcentage des cellules est moindre en G1 et plus élevé en S-G2/M. Nos résultats actuels montrent que les cellules de mélanome prolifèrent jusqu'à 3 jours de culture sur polyHEMA, puis le nombre de cellules diminue jusqu'à 6 jours de culture, cependant l'indice N/N0 reste supérieur à 1 (T0). Ces résultats ont été confirmés par une autre méthode d'évaluation de la prolifération : la mesure de l'activité de la LDH intracellulaire. Les indices N/N0 des fibroblastes Swiss 3T3 et des ostéoblastes MC3T3 diminuent significativement pendant 24 heures et 48 heures de culture en 3D, les valeurs des indices sont alors inférieures à 1.

L'analyse de l'apoptose par la mesure de l'état d'activation de la caspase 3 montre une activation de l'enzyme après 3 jours de culture dans les cellules B16F10, mais cette activation reste faible comparativement aux deux lignées normales. En effet, la caspase 3 est fortement activée dans les Swiss 3T3 dès 24 heures de culture en 3D, et dès 12 heures pour les MC3T3. De même, la caspase 9 est très activée dans les fibroblastes dès 24 heures de culture en 3D, ce qui indique une anoïkis dépendante de la voie mitochondriale. Gekas et al., (2004) (travaux du laboratoire) avaient déjà observé une apoptose dépendante de la voie intrinsèque dans les cellules Swiss 3T3 cultivées sur un revêtement cellulosique (Cuprophane). La caspase 9 ne semble pas être activée ni dans les cellules de mélanome, ni dans les pré-ostéoblastes. La caspase 8 n'est activée dans aucune des lignées. Rajeswari & Pande (2006) ont montré que des fibroblastes de rat entraient en apoptose (activation directe de la caspase 3) sans activation des caspases initiateuses 8 et 9. Cependant ces mêmes auteurs ont montré qu'une interaction entre la pro-caspase 3 et les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ non liées entraînait une activation de la caspase 3 au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats indiquent une surexpression des intégrines $\alpha 5$ dans les cellules B16F10 cultivées en 3D, ce qui pourrait expliquer l'activation de l'enzyme dans ces cellules après 3 jours de culture sur revêtement anti-adhésif. Par ailleurs, il est connu que certaines cellules cancéreuses surexpriment les caspases 3, 7, 9 et que ces dernières peuvent même être activées de façon constitutive (Philchenkov, 2004; Philchenkov et al., 2004). L'action des enzymes est cependant contrecarrée par la surexpression de protéines inhibitrices comme XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein). Ce déséquilibre entre les voies de survie et de mort

favoriserait la résistance aux signaux apoptotiques et à la chimiothérapie (Gallardo-Perez et al., 2009).

Dans le but de confirmer l'apoptose précoce des cellules normales et l'anoïkis tardive des cellules de mélanome cultivées en 3D, un marquage à l'annexine-V, puis à l'aide de la méthode TUNEL ont été effectués. L'annexine-V reconnaît les phosphatidylsérines externalisées lors du processus apoptotique et les cellules marquées sont quantifiées à l'aide d'un cytomètre de flux. Le pourcentage de cellules positives pour l'annexine-V augmente pour les cellules B16F10 sur revêtement anti-adhésif comparativement à T0, mais ne varie pas entre 2 et 6 jours de culture en 3D, alors qu'il augmente significativement après 24 heures de culture pour les cellules Swiss 3T3 et MC3T3. A l'aide de la méthode T.U.N.E.L, nous avons montré que les cellules apoptotiques sont plus nombreuses après 24 et 48 heures pour les lignées normales, alors qu'elles ne représentent que 4.74% après 6 jours de culture pour les cellules B16F10. Un marquage Apostain (technique proche du T.U.N.E.L permettant de détecter l'ADN des cellules apoptotiques), effectué lors de travaux précédents au sein du laboratoire, avait permis d'observer des résultats similaires après 48 heures pour les trois types cellulaires (Velzenberger et al, 2008).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des cellules nécrotiques et apoptotiques dans les agrégats. Un marquage parallèle des cellules vivantes (par de l'acridine orange) et des cellules mortes (par de l'iodure de propidium) a permis d'observer une répartition aléatoire des cellules nécrotiques et apoptotiques dans nos agrégats. Cet aspect hétérogène diffère des observations réalisées dans d'autres modèles de culture en suspension, comme les sphéroïdes sur support d'agarose, qui maintiennent un gradient d'oxygène, de nutriments et de facteurs de croissance. Dans cet exemple, les cellules au centre de l'agrégat, mal approvisionnées, entrent en apoptose et surexpriment des gènes pro-apoptotiques, contrairement à celles en périphérie qui prolifèrent (Desoize et al., 1998b; Gallardo-Perez et al., 2009).

3 L'implication des voies de signalisation dans la résistance à l'anoïkis des cellules

Lors des interactions cellules-MEC, les intégrines, molécules d'adhérence regroupées en amas à la surface des cellules, se lient à la MEC d'une part, et d'autre part au cytosquelette d'actine au niveau intracellulaire. La liaison de l'intégrine à la MEC par ses sous unités α et β entraîne le recrutement et la régulation de plusieurs molécules formant l'adhésion focale (Figure 49). Ainsi, les protéines de la famille des Rho-GTPases, composées entre autres de RhoA, sont régulées par les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ (Huveneers & Danen, 2009). RhoA est impliquée dans la formation des fibres de stress d'actine et l'adhésion focale (Bourdoulous, 1998). Nos résultats indiquent une activation de RhoA dans les cellules B16F10 en 2D et 3D, mais uniquement en 2D pour la lignée normale Swiss 3T3. Les études complémentaires allant jusqu'à 6 jours pour les cellules B16F10 montrent que la protéine reste activée dans les cellules de mélanome cultivées en 3D. Rappelons qu'il n'y pas d'organisation structurée des filaments d'actine, pour toutes les lignées cultivées en 3D. Une surexpression de RhoA a été décrite dans divers cancers humains comme le cancer du foie, de la peau, du colon et cette surexpression est corrélée avec la progression tumorale (Gomez del Pulgar et al., 2005; Karlsson et al., 2009). RhoA joue un rôle anti-apoptotique dans le cancer de l'estomac en favorisant la résistance à l'anoïkis (Cai et al., 2008), et intervient également dans la régulation de l'invasion des cellules humaines de fibrosarcome sur une matrice de collagène en 3D (Yamazaki et al., 2009). Aussi, Sarraeyrouse et al. (2007) ont montré que les cellules transfectées par le mutant V14RhoA, constitutivement activé, devenaient résistantes à l'anoïkis. En outre, une inhibition de l'activité de RhoA dans les cellules de cancer de prostate semble induire la mort cellulaire (Hoque et al., 2008). L'activation de la protéine observée dans les cellules B16F10 cultivées en 3D favoriserait donc leur résistance à l'anoïkis.

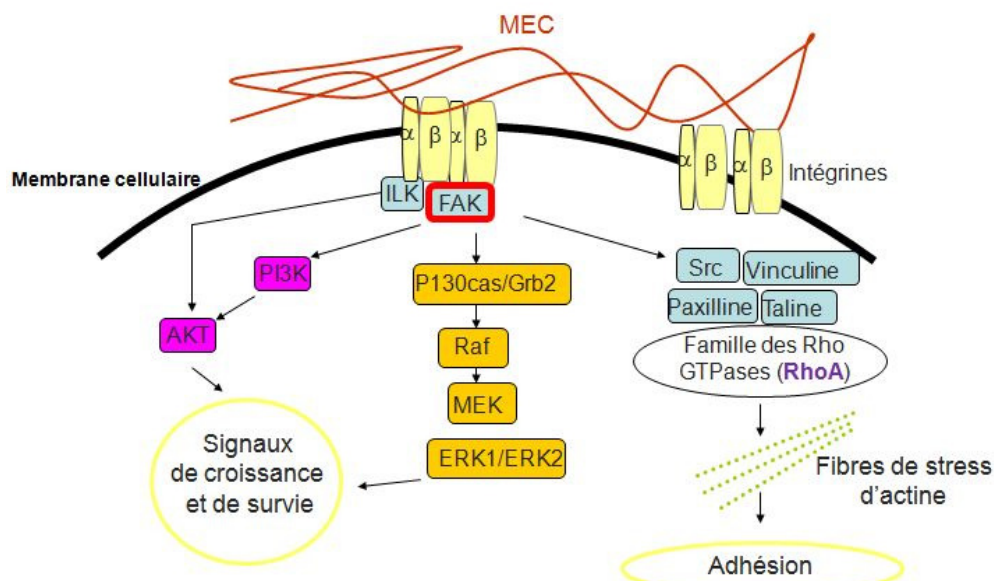


Figure 49 : Voies de signalisation étudiées.

FAK, la protéine centrale de l'adhésion focale au contact des intégrines et régulateur des Rho-GTPases, est activée dans les cellules de mélanome après 2 jours de culture sur polyHEMA, puis cette activation diminue jusqu'à 6 jours. FAK est impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme la survie, la migration et l'invasion. C'est un médiateur clé dans l'acquisition de phénotypes agressifs par les cellules de mélanome (Hess et al., 2005). Des travaux précédents dans le laboratoire (Hindié et al., 2005) ont montré qu'il n'y avait pas d'activation de la kinase au niveau de la Tyr 576 et 577, ni de liaison avec les protéines en aval comme Grb2 et p130Cas. Cependant FAK est bien phosphorylée au niveau de la Tyr 397 et cette activation, confirmée par nos résultats, conduit à la prolifération et la survie cellulaire (Wozniak et al., 2004). Différentes équipes (Liu et al., 2008; Zhang et al., 2004) ont montré que l'activation de FAK inhibait l'anoïkis des cellules de cancer du colon. Tsutsumi et al. (2008) ont montré que l'inhibition de l'expression de la kinase par des siRNA empêchait l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et de ce fait, la formation et le développement de tumeur *in vivo* (chez des souris).

Dans les cellules normales nous n'observons pas d'activation de FAK, et l'expression de la forme totale de la kinase est diminuée dans les fibroblastes Swiss 3T3. Comme, d'après les études menées par Grossmann et al. (2001), la protéine est un substrat des caspases durant l'apoptose, elle est clivée de façon successive

par les caspases 3, 6 et 7. La forte activation de la caspase 3 dans les fibroblastes pourrait expliquer ce résultat concernant la disparition de FAK totale.

Une fois activée, FAK active à son tour d'autres effecteurs appartenant aux voies de survie PI3K/AKT et MAPK (Liu et al., 2008).

3.1 L'implication de la voie PI3K/AKT dans la résistance à l'anoïkis

La voie de PI3K/AKT joue un rôle majeur dans la régulation de l'adhésion cellulaire et des signaux de survie. PI3K, une fois activée, recrute AKT et permet son activation. Nous observons une activation d'AKT entre 2 et 4 jours dans les cellules B16F10 cultivées en 3D, tandis que l'expression de la forme activée diminue dans les cellules normales Swiss 3T3 et MC3T3. L'activation constitutive d'AKT est observée dans plusieurs tumeurs et est corrélée à une progression vers la malignité tumorale (Grabacka et al., 2006), son activation est essentielle pour l'invasion et le développement métastatique des mélanomes.

Une fois activée par phosphorylation, AKT inhibe de nombreux substrats comme Bad et la caspase 9 (Reddig & Juliano, 2005). L'activation de la kinase dans les cellules de mélanome cultivées en 3D explique donc la non activation de la caspase 9 observée lors de nos études.

Une autre voie de régulation impliquant AKT, activée par Ras et PI3K, a été décrite par Jiang et al. (2004) (Figure 50). En effet, AKT inhiberait l'expression d'une Rho-GTPase, RhoB, dans les cellules B16F10. Il est reconnu que RhoB empêche la transformation tumorale, l'invasion et les métastases. Son expression est souvent diminuée dans les cellules cancéreuses à l'inverse de RhoA (Vega & Ridley, 2008). Jiang et al. (2004) ont montré que la surexpression de RhoB (suite à une transfection de mutant) dans les cellules B16F10 inhibait la formation de métastases dans le colon des souris C57/BL6. Les auteurs ont également montré que la protéine RhoB induisait plus rapidement en anoïkis des fibroblastes de souris NIH3T3 cultivés sur polyHEMA. La protéine RhoA n'étant pas exprimée dans les cellules Swiss 3T3 cultivées en 3D, une surexpression de RhoB pourrait être envisagée dans ces cellules sensibles à l'apoptose, d'autant plus que l'inhibition de RhoA induirait une forte expression de RhoB sous sa forme totale et activée (Ho et al., 2008)

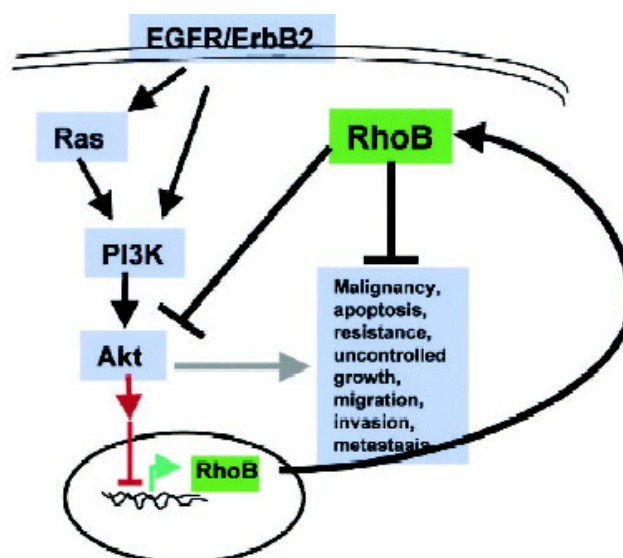


Figure 50 : Mécanisme de régulation impliquant RhoB.

D'après Jiang et al, 2004.

Afin de vérifier l'implication de la voie de survie PI3K/AKT dans la résistance à l'anoïkis des cellules de mélanome B16F10 cultivées en 3D, la kinase PI3K a été inhibée par un flavonoïde, LY2940002. Cette molécule est un inhibiteur compétitif et réversible de PI3K au niveau du site de fixation de l'ATP. Nous observons, après 48 heures de traitement avec l'inhibiteur, une diminution de la prolifération cellulaire et de l'activation de la kinase AKT. Les effets de la molécule sur l'induction de l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro* sont connus pour différents types de cancer (Westfall & Skinner, 2005). Hu et al. (2000) ont montré que la molécule LY294002, seule, inhibait la croissance cellulaire, induisait en apoptose les cellules de cancer d'ovaire et diminuait de façon significative la croissance de tumeur ovarienne dans des souris athymiques. Harfouche et al. (2009) ont montré qu'une inhibition de PI3K par la molécule LY294002 *via* des nanoparticules empêchait l'activation d'AKT, la prolifération, et induisait en apoptose les cellules B16F10.

L'expression d'AKT1 a été inhibée par siRNA, nos résultats préliminaires montrent une diminution de l'indice N/N0 pour les cellules de mélanome transfectées puis cultivées en 3D. Cependant, les paramètres du protocole utilisé sont à optimiser pour confirmer ce résultat. AKT1 dont la localisation est ubiquitaire, est l'une des trois isoformes d'AKT. Elle semble être la forme majoritaire dans les cellules de

mélanome, car l'expression d'AKT totale (c'est-à-dire les trois isoformes) diminue considérablement suite à l'inhibition de l'expression d'AKT1 par siRNA.

ILK1 est une autre kinase qui active directement AKT par phosphorylation au niveau du résidu sérine 473 (Delcommenne et al., 1998). Nos résultats indiquent qu'ILK1 est exprimée dans les trois types cellulaires aux temps de culture choisis. Dai et al. (2003) ont montré une corrélation entre la surexpression de cette kinase et la progression du mélanome, accompagnée d'une mortalité élevée chez les patients. Une inhibition de l'expression d'ILK par siRNA réduit la capacité d'invasion, de migration des cellules humaines de mélanome ainsi que le développement tumoral (Wong et al., 2007). De même, Persad et al. (2000), ont montré qu'une inhibition d'ILK supprime l'activation d'AKT et induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et l'apoptose des cellules cancéreuses de prostate.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés à la survivine, une protéine fortement exprimée dans la plupart des tumeurs et substrat d'AKT. En effet, il a été montré que dans les cellules tumorales, la survivine forçait la transition G1/S en l'absence de facteurs de croissance et bloquait l'apoptose mitochondriale par la stabilisation de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2, l'inhibition de la libération par la mitochondrie des facteurs apoptogènes comme Smac ou AIF, et l'inhibition directe des caspases 3, 7 et 9 (Romagnoli et al., 2008) (Figure 51). Nos résultats indiquent une diminution de l'expression de la survivine dans les cellules B16F10 après 4 jours de culture en 3D, alors que cette dernière diminue dès 6 heures dans les cellules Swiss 3T3, puis disparaît complètement après 24 heures. De même, dans les pré-ostéoblastes MC3T3, l'expression de la protéine disparaît fortement dès 6 heures de culture sur revêtement anti-adhésif.

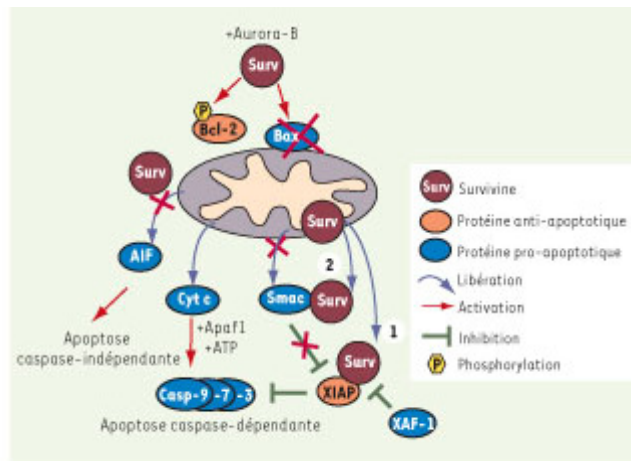


Figure 51 : Rôle de la survivine dans le blocage de l'apoptose mitochondriale.

En amont de la mitochondrie, la survivine forme un complexe avec une kinase (Aurora B) et stabilise Bcl-2 par phosphorylation. Au niveau de la mitochondrie, elle empêche la libération de Smac et AIF impliqués dans l'apoptose caspase-dépendante et indépendante respectivement. En aval de la mitochondrie, la survivine est elle-même relarguée et inhibe, entre autres, les caspases 3, 7 et 9. D'après Romagnoli et al, 2008.

L'analyse de la protéine Bcl-2 par western blot a montré une diminution de son expression dans les cellules de mélanome B16F10 cultivées en 3D comparativement à T0. Elle diminue également dans les fibroblastes Swiss 3T3 et est faiblement exprimée dans les cellules MC3T3. Bcl-2, localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, contrôle la libération du cytochrome c dans le cytosol et l'activation de caspases effectrices. Son activité est modulée par interaction avec une série de protéines du cytosol. Une interaction entre Bcl-2 et Bad, par exemple, inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-2. Lorsque les facteurs de croissance phosphorylent Bad par l'intermédiaire de la kinase AKT, ils inhibent l'interaction Bcl-2-Bad et permettent à Bcl-2 de recouvrer son pouvoir anti-apoptotique (Bettaieb et al., 1999). Aussi, la surexpression de Bcl-2 induit-elle la résistance à tous les agents cytotoxiques. C'est un facteur de mauvais pronostic en termes de réponse au traitement et de survie dans plusieurs tumeurs malignes. Cependant des études ont montré une perte d'expression de Bcl-2 dans le mélanome métastatique, en plus de la perte d'expression de protéines pro-apoptotiques, appartenant également à la super famille des protéines Bcl-2. Une explication serait que cette famille de protéines (pro et anti-apoptotiques) soit fortement immunogène et la diminution d'expression serait un mécanisme de survie leur permettant d'échapper au système immunitaire (Leverkus & Gollnick, 2006).

3.2 Implication de la voie des MAPK dans la résistance à l'anoïkis

La voie des MAPK fortement impliquée dans la prolifération et la survie des cellules de mélanome, a également été étudiée. Nos résultats indiquent une activation de ERK1/2 dans les cellules B16F10 jusqu'à 6 jours de culture sur polyHEMA. En revanche, il n'y a pas d'augmentation des formes activées de ERK1/2 dans les cellules normales. Ces kinases sont activées de façon constitutive dans plus de 90% des mélanomes, en raison de la mutation des protéines activatrices en amont comme NRas et Braf (Russo et al., 2009). Toutes ces dérégulations protègent les cellules de l'anoïkis (Boisvert-Adamo et al., 2009). Par ailleurs, ERK1/2 inhibent par phosphorylation la caspase 9 (Allan et al., 2003), tout comme la protéine AKT activée. Ce qui suggère que ces deux mécanismes d'inhibition, associés, sont à l'origine de l'absence d'activation de la caspase 9 dans les cellules de mélanome B16F10 cultivées en 3D.

4 Le rôle de la fibronectine dans la survie cellulaire

La signalisation intracellulaire est médiée par la liaison des intégrines à la MEC. Nos résultats montrent une augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 5$ après 3 jours de culture dans les cellules cancéreuses, tandis que dans les cellules MC3T3 et Swiss 3T3, une diminution est observée après 24 heures et 48 heures de culture sur polyHEMA. L'expression des intégrines αv reste inchangée dans les cellules B16F10 au cours du temps sur polyHEMA comparativement à T0, et diminue ou est faiblement exprimée dans les cellules Swiss 3T3 et les MC3T3. Des études ont montré que la sous unité intégrine $\alpha 5$ est surexprimée dans les cellules B16F10 contrairement aux sous unités $\alpha 4$, αv et $\beta 1$ (Qian, 2005). Son inhibition à l'aide d'anticorps anti- $\alpha 5$ empêche la formation de métastases pulmonaires et inhibe l'adhésion cellulaire à la fibronectine. De plus la perte de l'interaction $\alpha 5$ -fibronectine diminue la survie et induit les cellules B16F10 en apoptose.

L'augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 5$ dans les cellules de mélanome, contrairement aux autres types cellulaires, nous a incités à analyser l'expression de la fibronectine sécrétée par les cellules agrégées. La Fn est surexprimée dans plusieurs types de mélanome et son expression serait régulée par la voie des MAPK (Gaggioli et al., 2007). L'inhibition de l'expression de la Fn

entraîne la réduction du potentiel invasif des cellules humaines de mélanome (Gaggioli et al., 2007). L'inhibition par siRNA de Mcl1 (Myeloid cell leukemia séquence 1), une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2 et surexprimée également dans le mélanome, induit l'anoïkis sauf si les cellules ont été mises en contact (adhésion) au préalable avec la fibronectine (Boisvert-Adamo et al., 2009). La Fn néosynthétisée est observée dans les trois types cellulaires à l'aide de la technique d'immunofluorescence, cependant l'expression du gène diffère suivant le type cellulaire. En effet, nous n'observons pas d'évolution dans les cellules de mélanome cultivées en 3D comparativement à T0, tandis que l'expression du gène augmente dans les lignées normales Swiss 3T3 et MC3T3. Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'inhibition par siRNA de la Fn n'influence ni la prolifération cellulaire, ni l'apoptose des cellules B16F10 cultivées en 3D. Engbring et al. (2008) ont montré que la fibronectine était surexprimée dans les cellules B16F10 en présence d'un peptide inducteur de métastase osseuse et du foie, AG73, dérivé de la chaîne alpha de la laminine. L'équipe a également démontré que la transfection de siRNA ciblant l'expression de la fibronectine dans les cellules B16F10 ne réduisait pas les métastases osseuses en présence d'AG73. D'après Liu et al. (2008), la Fn agirait comme un suppresseur de tumeur. En effet, la diminution de son expression stimulerait la prolifération, forcerait les cellules à perdre la capacité à adhérer et augmenterait leur propriété invasive et migratoire. Au contraire, Banerji et al. (2008) ont montré que lorsque les cellules de mélanome A375 étaient cultivées en présence de fibronectine, les protéines MMP9 (Matrix MetalloProteinases) étaient surexprimées après 2 heures et les protéines MMP2 étaient activées. Ces enzymes dégradent les protéines matricielles et favorisent l'invasion tumorale. Les voies de signalisation impliquées seraient celles de PI3K et ERK car le processus est inhibé en présence d'inhibiteurs de ERK (PD98059) ou de PI3K (LY294002). Les MMP sont des enzymes qui clivent les composants de la MEC et favorisent ainsi le développement métastatique. AKT1, par activation du facteur de transcription NFκB, serait à l'origine de la surexpression des enzymes MMP9 et 2 (Park et al., 2001).

Par ailleurs, il existerait dans les fibroblastes une voie médiée par les intégrines indépendante de celle de FAK, et impliquant la calvéoline, Fyn ou Yes puis Shc (Figure 52). Ce dernier, une fois phosphorylé, activerait les MAPK (Barberis et al., 2000). Si la synthèse de la Fn est effectivement régulée par les MAPK (Gaggioli et al., 2007), cette voie parallèle dans les cellules normales pourrait t-elle suffire pour

activer le gène de la Fn? L'expression de pERK1/2 n'est fortement diminuée qu'après 48 heures de culture en 3D dans les Swiss 3T3. Cependant celle des intégrines étudiées ($\alpha 5$ et αv) étant de plus en plus faible, la liaison avec la Fn (donc le contact avec la MEC) est réduite au fur et à mesure : l'anoïkis est ainsi inévitablement déclenchée dans ces cellules normales.

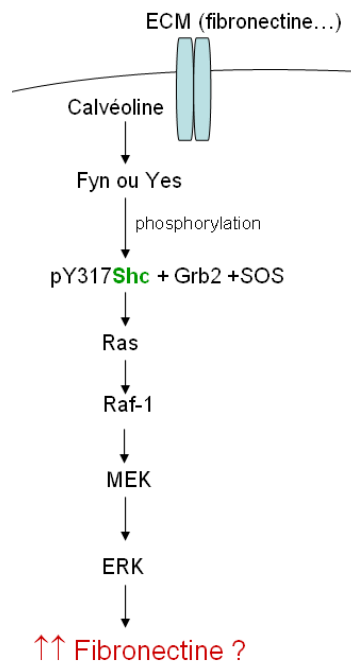


Figure 52 : Hypothèse d'une voie de régulation de la Fn dans les fibroblastes Swiss 3T3.

Modifiée d'après Barberis et al., 2000.

5 Okra : une pectine anti-tumorale

Les thérapies émergentes du mélanome ciblent les voies de survie PI3K/AKT et MAPK afin d'optimiser l'efficacité des traitements (Hwang et al, 2008). Il s'agit d'inhibiteurs sélectifs des RAF (Sorafenib) et MEK kinases (PD0325901), de la voie de PI3K (CCI-779), des protéines chaperones Hsp90 (17-AAG) qui stabilisent la plupart des kinases (Russo et al., 2009). D'autres thérapies combinent les inhibiteurs des voies de survie et les médiateurs pro-apoptotiques (Eberle et al., 2007). *In vitro*, la culture en agrégats ou en sphéroïdes est nécessaire pour étudier l'effet de médicaments anti-cancéreux, car la sensibilité des cellules tumorales décroît fortement lorsqu'elles sont en 3D (Fayad et al., 2009).

Diverses études sur les pectines ont montré leurs propriétés anti-métastatiques sur différents types de cancer. La structure très simple de la pectine Okra présente un

grand intérêt pour essayer d'appréhender les mécanismes mis en œuvre dans les relations structure/fonctions biologiques de la molécule. Nous avons étudié l'activité anti-tumorigénique de la pectine Okra sur les cellules de mélanome B16F10 cultivées sur polyHEMA. Nos résultats indiquent que le traitement avec la pectine affecte la morphologie des cellules B16F10 cultivées en 3D. De plus la prolifération et le cycle cellulaire sont modifiés, et l'apoptose est induite. En effet, Okra empêche la formation d'agrégats. Han et al. (2006) ont montré qu'une injection de polysaccharides peptidiques à des souris C57BL/6 diminuait le nombre de métastases des cellules B16F10 (injectées le premier jour du traitement) en inhibant leur adhésion à la MEC. Les études au sein du laboratoire sur les molécules d'adhésion indiquent que l'expression de la sous unité intégrine $\alpha 5$ est diminuée à la surface des cellules B16F10, de même que celle des N-cadhérines qui permettent le contact cellule-cellule (Vayssade et al., 2009). Okra empêcherait donc les liaisons cellules-cellules ou cellules-MEC.

La pectine inhibe la prolifération sur polyHEMA et provoque un arrêt du cycle cellulaire en G2. Hsieh et al. (2006) ont observé que des extraits de l'm-YunityTM, un champignon contenant des pectines, inhibaient la prolifération, induisaient l'arrêt du cycle (phase G1) et favorisaient l'apoptose des cellules humaines de leucémie. De même Olano-Martin et al. (2003) ont observé que la pectine de pomme peu méthylée favorisait l'apoptose des cellules humaines de cancer du colon HT29.

Les pectines affectent autant l'adhésion cellulaire, la croissance et la survie *in vitro* que le développement tumoral et la prévention du cancer *in vivo*.

Les interactions entre les cellules cancéreuses et Okra, l'influence de la structure de la pectine sur l'induction de l'apoptose, ainsi que les mécanismes intracellulaires impliqués sont à explorer dans des études ultérieures.

Conclusions et perspectives

Nous avons cultivé les cellules de mélanome B16F10 sur un revêtement anti-adhésif afin de les placer dans une architecture 3D plus représentative d'une situation de développement tumoral *in vivo*, pour étudier leur capacité à résister à l'anoïkis. Nous avons pris comme référence les lignées Swiss 3T3 et MC 3T3. Il nous a ainsi été possible de mettre en évidence des dysfonctionnements représentant des «verrous» moléculaires pouvant être cause de la survie des cellules de mélanome. En particulier, des anomalies ont été relevées dans l'activation de RhoA, des caspases 3 et 9, de la voie PI3K/AKT, ainsi qu'au niveau de l'expression des intégrines et de la survivine. Nous avons alors cherché à lever certains de ces « verrous » en faisant agir des molécules inhibitrices ou en utilisant des siRNA. Un effet significatif sur la prolifération cellulaire a été observé en inhibant la voie PI3K/AKT. Par contre, l'hypothèse d'un rôle déterminant de la fibronectine dans le comportement des cellules B16F10 n'a pas été confirmée, au niveau de l'expression du gène (mesurée par RT-PCR en temps réel ou inhibée par siRNA). Enfin, des résultats prometteurs ont été obtenus sur l'effet apoptotique de la pectine Okra.

Les perspectives à court terme s'orientent vers des études complémentaires permettant d'approfondir les relations existant entre l'expression du gène *fibronectine* et la survie (ou autre comportement) cellulaire. Les approches à envisager pourraient consister à surexprimer le gène chez les B16F10 et/ou, plus simplement, à l'inhiber chez les cellules de référence Swiss 3T3. Par ailleurs, les effets induits par une inhibition de RhoA et de la survivine devraient apporter un meilleur éclairage sur l'incidence de la surexpression respective de ces deux molécules. Enfin, Okra mérite qu'une attention particulière soit portée à son mode d'action.

D'après notre expérience qui couvre maintenant plusieurs années, le revêtement CMC stérilisé à l'oxyde d'éthylène est facile d'utilisation et garde son efficacité pendant au moins 18 mois de conservation. Son application à la culture de cellules humaines de mélanome a déjà été discutée avec des cliniciens et fait partie des objectifs à privilégier à moyen terme.

A plus long terme, la question de fond suivante doit être soulevée : comment se positionne le système 3D que nous avons mis au point parmi les modèles pouvant servir à tester la sensibilité de cellules de mélanome aux drogues anticancéreuses ?

Dans la littérature, les systèmes de culture 3D sont généralement présentés comme des configurations conférant aux cellules agrégées une résistance à la chimiothérapie. Cette situation n'est absolument pas vérifiée avec Okra, dans nos conditions expérimentales. Il est donc important d'envisager de valider notre modèle en le confrontant à une série de drogues bien connues pour affecter la survie cellulaire par des mécanismes différents : les cibles étant par exemple les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ pour la pentoxifilline, ERK pour le curcuma et les PKC pour la pentoxifilline et la staurosporine.

Ces différentes études pourraient aboutir à l'identification de cibles thérapeutiques à privilégier. A terme, le modèle CMC pourrait être dédié à la caractérisation du potentiel anti-tumoral de nouveaux candidats-médicaments.

Références bibliographiques

- Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC and Peter ME. (2002). *Apoptosis-independent functions of killer caspases* *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 721-6.
- Allan LA, Morrice N, Brady S, Magee G, Pathak S and Clarke PR. (2003). *Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK* *Nat Cell Biol*, **5**, 647-54.
- Aplin AE, Howe A, Alahari SK and Juliano RL. (1998). *Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins* *Pharmacol Rev*, **50**, 197-263.
- Aplin AE, Howe AK and Juliano RL. (1999). *Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth* *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 737-44.
- Arthur WT and Burridge K. (2001). *RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity* *Mol Biol Cell*, **12**, 2711-20.
- Arthur WT, Noren NK and Burridge K. (2002). *Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion* *Biol Res*, **35**, 239-46.
- Banerji A, Das S and Chatterjee A. (2008). *Culture of human A375 melanoma cells in the presence of fibronectin causes expression of MMP-9 and activation of MMP-2 in culture supernatants* *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **27**, 135-45.
- Barberis L, Wary KK, Fiucci G, Liu F, Hirsch E, Brancaccio M, Altruda F, Tarone G and Giancotti FG. (2000). *Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK* *J Biol Chem*, **275**, 36532-40.
- Barczyk M, Carracedo S and Gullberg D. (2009). *Integrins* *Cell Tissue Res*.
- Bellacosa A, Kumar CC, Di Cristofano A and Testa JR. (2005). *Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting* *Adv Cancer Res*, **94**, 29-86.
- Bellacosa A, Testa JR, Moore R and Larue L. (2004). *A portrait of AKT kinases: human cancer and animal models depict a family with strong individualities* *Cancer Biol Ther*, **3**, 268-75.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP and Tsichlis PN. (1991). *A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region* *Science*, **254**, 274-7.
- Bergman M, Djaldetti M, Salman H and Bessler H. (2009). *Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation* *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **in press**, doi:10.1016/j.biopha.2009.03.004
- Bettaieb A, Sordet O, Belon JP and Solary E. (1999). *[Apoptosis and chemotherapy]* *Bull Cancer*, **86**, 41-6.
- Blume-Jensen P and Hunter T. (2001). *Oncogenic kinase signalling* *Nature*, **411**, 355-65.

- Bogenrieder T and Herlyn M. (2002). *Cell-surface proteolysis, growth factor activation and intercellular communication in the progression of melanoma Crit Rev Oncol Hematol*, **44**, 1-15.
- Boisvert-Adamo K, Longmate W, Abel EV and Aplin AE. (2009). *Mcl-1 is required for melanoma cell resistance to anoikis Mol Cancer Res*, **7**, 549-56.
- Bouaouina M. H-ML. (2006). *Activation des intégrines et adhérence des leucocytes et des plaquettes. Nouvelles données sur des voies de signalisation communes Hématologie*, **12**, 21-33.
- Buongiorno P and Bapat B. (2005). *Rho GTPases and cancer Prog Mol Subcell Biol*, **40**, 29-53.
- Bussy C, Verhoef R, Haeger A, Morra M, Duval JL, Vigneron P, Bensoussan A, Velzenberger E, Cascardo G, Cassinelli C, Schols H, Knox JP and Nagel MD. (2008). *Modulating in vitro bone cell and macrophage behavior by immobilized enzymatically tailored pectins J Biomed Mater Res A*, **86**, 597-606.
- Cai J, Niu X, Chen Y, Hu Q, Shi G, Wu H, Wang J and Yi J. (2008). *Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits RhoA activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis Neoplasia*, **10**, 41-51.
- Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S and Xu L. (2000). *Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes Clin Cancer Res*, **6**, 2417-23.
- Chang HY and Yang X. (2000). *Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases Microbiol Mol Biol Rev*, **64**, 821-46.
- Chen CH, Sheu MT, Chen TF, Wang YC, Hou WC, Liu DZ, Chung TC and Liang YC. (2006). *Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways Biochem Pharmacol*, **72**, 1001-9.
- Chun-Yi L, Cheng-Feng L, Chiung-Hui H and Yau-Huei W. (2004). *Mitochondrial DNA Mutation and Depletion Increase the Susceptibility of Human Cells to Apoptosis Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1011**, 133-145.
- Chiarugi P and Giannoni E. (2008). *Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells Biochem Pharmacol*, **76**, 1352-64.
- Cornillon J, Campos L and Guyotat D. (2003). *[Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein] Med Sci (Paris)*, **19**, 743-52.
- Cutler RE, Jr., Stephens RM, Saracino MR and Morrison DK. (1998). *Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 9214-9.

- Dai DL, Makretsov N, Campos EI, Huang C, Zhou Y, Huntsman D, Martinka M and Li G. (2003). *Increased expression of integrin-linked kinase is correlated with melanoma progression and poor patient survival Clin Cancer Res*, **9**, 4409-14.
- Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. (1999). *Cellular survival: a play in three Akts Genes Dev*, **13**, 2905-27.
- Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J and Dedhar S. (1998). *Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11211-6.
- DeMali KA, Wennerberg K and Burridge K. (2003). *Integrin signaling to the actin cytoskeleton Curr Opin Cell Biol*, **15**, 572-82.
- Desoize B, Gimonet D and Jardiller JC. (1998a). *Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance Anticancer Res*, **18**, 4147-58.
- Desoize B, Gimonet D and Jardillier JC. (1998b). *Multicellular resistance: another mechanism for multidrug resistance? Bull Cancer*, **85**, 785.
- Diaz-Montero CM, Wygant JN and McIntyre BW. (2006). *PI3-K/Akt-mediated anoikis resistance of human osteosarcoma cells requires Src activation Eur J Cancer*, **42**, 1491-500.
- Downward J. (1996). *Control of ras activation Cancer Surv*, **27**, 87-100.
- Dransart E, Olofsson B and Cherfils J. (2005). *RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation Traffic*, **6**, 957-66.
- Dutta RC and Dutta AK. (2009). *Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications Biotechnol Adv*, **27**, 334-9.
- Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, Trefzer U and Fecker LF. (2007). *Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches Drug Resist Updat*, **10**, 218-34.
- Engbring JA, Hossain R, VanOsdol SJ, Kaplan-Singer B, Wu M, Hibino S and Koblinski JE. (2008). *The laminin alpha-1 chain derived peptide, AG73, increases fibronectin levels in breast and melanoma cancer cells Clin Exp Metastasis*, **25**, 241-52.
- Faucheux N and Nagel MD. (2002). *Cyclic AMP--dependent aggregation of Swiss 3T3 cells on a cellulose substratum (Cuprophane) and decreased cell membrane Rho A Biomaterials*, **23**, 2295-301.
- Fayad W, Brnjic S, Berglind D, Blixt S, Shoshan MC, Berndtsson M, Olofsson MH and Linder S. (2009). *Restriction of cisplatin induction of acute apoptosis to a subpopulation of cells in a three-dimensional carcinoma culture model Int J Cancer*.

- Feder-Mengus C, Ghosh S, Reschner A, Martin I and Spagnoli GC. (2008). *New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal?* *Trends Mol Med*, **14**, 333-40.
- Fidler IJ. (1973). *Selection of successive tumour lines for metastasis* *Nat New Biol*, **242**, 148-9.
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M and Thenet S. (2004). *Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes* *J Biol Chem*, **279**, 43061-9.
- Frisch SM and Francis H. (1994). *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis* *J Cell Biol*, **124**, 619-26.
- Frisch SM and Screaton RA. (2001). *Anoikis mechanisms* *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 555-62.
- Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E and Chan-Hui PY. (1996). *Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase* *J Cell Biol*, **134**, 793-9.
- Gaggioli C, Robert G, Bertolotto C, Bailet O, Abbe P, Spadafora A, Bahadoran P, Ortonne JP, Baron V, Ballotti R and Tartare-Deckert S. (2007). *Tumor-derived fibronectin is involved in melanoma cell invasion and regulated by V600E B-Raf signaling pathway* *J Invest Dermatol*, **127**, 400-10.
- Gallardo-Perez JC, Espinosa M, Ceballos-Cancino G, Daniel A, Rodriguez-Enriquez S, Aviles A, Moreno-Sanchez R, Melendez-Zajgla J and Maldonado V. (2009). *NF-kappa B is required for the development of tumor spheroids* *J Cell Biochem*, **108**, 169-180.
- Garcia AJ, Vega MD and Boettiger D. (1999). *Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation* *Mol Biol Cell*, **10**, 785-98.
- Geiger TR and Peeper DS. (2009). *Metastasis mechanisms* *Biochim Biophys Acta*.
- Gekas J, Hindie M, Faucheux N, Lanvin O, Maziere C, Fuentes V, Gouilleux-Gruart V, David B, Maziere JC, Lassoued K and Nagel MD. (2004). *The inhibition of cell spreading on a cellulose substrate (cuprophan) induces an apoptotic process via a mitochondria-dependent pathway* *FEBS Lett*, **563**, 103-7.
- Gilmore AP. (2005). *Anoikis* *Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1473-7.
- Golubovskaya V, Beviglia L, Xu LH, Earp HS, 3rd, Craven R and Cance W. (2002). *Dual inhibition of focal adhesion kinase and epidermal growth factor receptor pathways cooperatively induces death receptor-mediated apoptosis in human breast cancer cells* *J Biol Chem*, **277**, 38978-87.
- Golubovskaya VM, Finch R and Cance WG. (2005). *Direct interaction of the N-terminal domain of focal adhesion kinase with the N-terminal transactivation domain of p53* *J Biol Chem*, **280**, 25008-21.

- Gomez del Pulgar T, Benitah SA, Valeron PF, Espina C and Lacal JC. (2005). *Rho GTPase expression in tumourigenesis: evidence for a significant link Bioessays*, **27**, 602-13.
- Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K and Reiss K. (2006). *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt Clin Cancer Res*, **12**, 3028-36.
- Gronowicz G and McCarthy MB. (1996). *Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion J Orthop Res*, **14**, 878-87.
- Grossmann J. (2002). *Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis" Apoptosis*, **7**, 247-60.
- Grossmann J, Artinger M, Grasso AW, Kung HJ, Scholmerich J, Fiocchi C and Levine AD. (2001). *Hierarchical cleavage of focal adhesion kinase by caspases alters signal transduction during apoptosis of intestinal epithelial cells Gastroenterology*, **120**, 79-88.
- Hail N, Jr., Carter BZ, Konopleva M and Andreeff M. (2006). *Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys Apoptosis*, **11**, 889-904.
- Han SB, Lee CW, Kang MR, Yoon YD, Kang JS, Lee KH, Yoon WK, Lee K, Park SK and Kim HM. (2006). *Pectic polysaccharide isolated from Angelica gigas Nakai inhibits melanoma cell metastasis and growth by directly preventing cell adhesion and activating host immune functions Cancer Lett*, **243**, 264-73.
- Hanada M, Feng J and Hemmings BA. (2004). *Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target Biochim Biophys Acta*, **1697**, 3-16.
- Hanahan D and Weinberg RA. (2000). *The hallmarks of cancer Cell*, **100**, 57-70.
- Harfouche R, Basu S, Soni S, Hentschel DM, Mashelkar RA and Sengupta S. (2009). *Nanoparticle-mediated targeting of phosphatidylinositol-3-kinase signaling inhibits angiogenesis Angiogenesis*.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K and Stephens LR. (2006). *Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells Biochem Soc Trans*, **34**, 647-62.
- Heino J and Kapyla J. (2009). *Cellular receptors of extracellular matrix molecules Curr Pharm Des*, **15**, 1309-17.
- Hess AR, Postovit LM, Margaryan NV, Seftor EA, Schneider GB, Seftor RE, Nickoloff BJ and Hendrix MJ. (2005). *Focal adhesion kinase promotes the aggressive melanoma phenotype Cancer Res*, **65**, 9851-60.
- Hindie M, Vayssade M, Dufresne M, Queant S, Warocquier-Clerout R, Legeay G, Vigneron P, Olivier V, Duval JL and Nagel MD. (2006). *Interactions of B16F10 melanoma cells aggregated on a cellulose substrate J Cell Biochem*, **99**, 96-104.

- Hindie M, Legeay G, Vayssade M, Warocquier-Clérout R, Nagel MD. (2005). *Culture of melanoma cells as aggregates on cellulose substratum* *Biomol Eng*, **22**, 205-8.
- Ho TT, Merajver SD, Lapiere CM, Nusgens BV and Deroanne CF. (2008). *RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha* *J Biol Chem*, **283**, 21588-98.
- Hoque A, Chen H and Xu XC. (2008). *Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **17**, 88-94.
- Houghton AN and Polsky D. (2002). *Focus on melanoma* *Cancer Cell*, **2**, 275-8.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK and Juliano RL. (1998). *Integrin signaling and cell growth control* *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 220-31.
- Hsieh TC, Wu P, Park S and Wu JM. (2006). *Induction of cell cycle changes and modulation of apoptogenic/anti-apoptotic and extracellular signaling regulatory protein expression by water extracts of I'm-Yunity (PSP)* *BMC Complement Altern Med*, **6**, 30.
- Hu L, Zaloudek C, Mills GB, Gray J and Jaffe RB. (2000). *In vivo and in vitro ovarian carcinoma growth inhibition by a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002)* *Clin Cancer Res*, **6**, 880-6.
- Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J and Mould AP. (2003). *Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble* *Trends Biochem Sci*, **28**, 313-20.
- Huveneers S and Danen EH. (2009). *Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho* *J Cell Sci*, **122**, 1059-69.
- Hynes RO. (2002). *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines* *Cell*, **110**, 673-87.
- Jiang K, Sun J, Cheng J, Djeu JY, Wei S and Sebt S. (2004). *Akt mediates Ras downregulation of RhoB, a suppressor of transformation, invasion, and metastasis* *Mol Cell Biol*, **24**, 5565-76.
- Jin Z et El-Deiry WS. (2005). *Overview of cell death signaling pathways* *Cancer Biol Ther*, **4**, 139-63.
- Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z and Brakebusch C. (2009). *Rho GTPase function in tumorigenesis* *Biochim Biophys Acta*.
- Kaspar M, Zardi L and Neri D. (2006). *Fibronectin as target for tumor therapy* *Int J Cancer*, **118**, 1331-9.
- Kerr JF, Wyllie AH and Currie AR. (1972). *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics* *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kim BS et Mooney DJ. (1998). *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering* *TIBTECH*, **16**, 224-30.

- Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S and Melino G. (2005). *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death Cell Death Differ*, **12 Suppl 2**, 1463-7.
- Kulasekara KK, Lukandu OM, Neppelberg E, Vintermyr OK, Johannessen AC and Costea DE. (2009). *Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer Arch Oral Biol*, **54**, 924-31.
- Kupferman ME, Patel V, Sriuranpong V, Amornphimoltham P, Jasser SA, Mandal M, Zhou G, Wang J, Coombes K, Multani A, Pathak S, Silvio Gutkind J and Myers JN. (2007). *Molecular analysis of anoikis resistance in oral cavity squamous cell carcinoma Oral Oncol*, **43**, 440-54.
- Larsen M, Artym VV, Green JA and Yamada KM. (2006). *The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling Curr Opin Cell Biol*, **18**, 463-71.
- Le Gall M, Chambard JC, Breitmayer JP, Grall D, Pouyssegur J and Van Obberghen-Schilling E. (2000). *The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal Mol Biol Cell*, **11**, 1103-12.
- Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA and Liddington RC. (1995). *Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? Structure*, **3**, 1333-40.
- Lejeune FJ, Rimoldi D and Speiser D. (2007). *New approaches in metastatic melanoma: biological and molecular targeted therapies Expert Rev Anticancer Ther*, **7**, 701-13.
- Lengsfeld C, Titgemeyer F, Faller G and Hensel A. (2004). *Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of Helicobacter pylori to human gastric mucosa J Agric Food Chem*, **52**, 1495-503.
- Lerat H, Lissitzky JC, Singer JW, Keating A, Herve P and Charbord P. (1993). *Role of stromal cells and macrophages in fibronectin biosynthesis and matrix assembly in human long-term marrow cultures Blood*, **82**, 1480-92.
- Leverkus M and Gollnick H. (2006). *"Bak (and Bax) to the future"--of primary melanoma prognosis? J Invest Dermatol*, **126**, 1212-4.
- Li G, Satyamoorthy K and Herlyn M. (2002). *Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development Crit Rev Oral Biol Med*, **13**, 62-70.
- Li G, Schaidt H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K and Herlyn M. (2001). *Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development Oncogene*, **20**, 8125-35.

- Liu G, Meng X, Jin Y, Bai J, Zhao Y, Cui X, Chen F and Fu S. (2008). *Inhibitory role of focal adhesion kinase on anoikis in the lung cancer cell A549 Cell Biol Int*, **32**, 663-70.
- Liu W, Cheng S, Asa SL and Ezzat S. (2008). *The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis Cancer Res*, **68**, 8104-12.
- Lock RB and Ross WE. (1990). *Possible role for p34cdc2 kinase in etoposide-induced cell death of Chinese hamster ovary cells Cancer Res*, **50**, 767-71.
- Lomas J, Martin-Duque P, Pons M and Quintanilla M. (2008). *The genetics of malignant melanoma Front Biosci*, **13**, 5071-93.
- Lombello CB, Malmonge SM and Wada ML. (2000). *PolyHEMA and polyHEMA-poly(MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells J Mater Sci Mater Med*, **11**, 541-6.
- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J and Cantley LC. (2002). *Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway Mol Cell*, **10**, 151-62.
- McClary KB, Ugarova T and Grainger DW. (2000). *Modulating fibroblast adhesion, spreading, and proliferation using self-assembled monolayer films of alkylthiolates on gold J Biomed Mater Res*, **50**, 428-39.
- Meredith JE, Jr., Fazeli B and Schwartz MA. (1993). *The extracellular matrix as a cell survival factor Mol Biol Cell*, **4**, 953-61.
- Michel JB. (2003). *Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 2146-54.
- Mitsiades CS, Mitsiades N and Koutsilieris M. (2004). *The Akt pathway: molecular targets for anti-cancer drug development Curr Cancer Drug Targets*, **4**, 235-56.
- Mohnen D. (2008). *Pectin structure and biosynthesis Curr Opin Plant Biol*, **11**, 266-77.
- Mould AP, Barton SJ, Askari JA, Craig SE and Humphries MJ. (2003). *Role of ADMIDAS cation-binding site in ligand recognition by integrin alpha 5 beta 1 J Biol Chem*, **278**, 51622-9.
- Mueller-Klieser W. (1997). *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications Am J Physiol*, **273**, C1109-23.
- Muzio M, Stockwell BR, Stennicke HR, Salvesen GS and Dixit VM. (1998). *An induced proximity model for caspase-8 activation J Biol Chem*, **273**, 2926-30.
- Nagel MD, Verhoef R, Schols H, Morra M, Knox JP, Ceccone G, Della Volpe C, Vigneron P, Bussy C, Gallet M, Velzenberger E, Vayssade M, Cascardo G, Cassinelli C, Haeger A, Gilliland D, Liakos I, Rodriguez-Valverde M and Siboni S. (2008). *Enzymatically-*

- tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts Biochim Biophys Acta*, **1780**, 995-1003.
- Nelson CM and Chen CS. (2002). *Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal FEBS Lett*, **514**, 238-42.
- Olano-Martin E, Rimbach GH, Gibson GR and Rastall RA. (2003). *Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in in vitro human colonic adenocarcinoma cells Anticancer Res*, **23**, 341-6.
- Park BK, Zeng X and Glazer RI. (2001). *Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells Cancer Res*, **61**, 7647-53.
- Persad S, Attwell S, Gray V, Delcommenne M, Troussard A, Sanghera J and Dedhar S. (2000). *Inhibition of integrin-linked kinase (ILK) suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3207-12.
- Peyssonnaud C and Eychene A. (2001). *The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation Biol Cell*, **93**, 53-62.
- Philchenkov A. (2004). *Caspases: potential targets for regulating cell death J Cell Mol Med*, **8**, 432-44.
- Philchenkov A, Zavelevich M, Krocak TJ and Los M. (2004). *Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities Exp Oncol*, **26**, 82-97.
- Rajeswari J and Pande G. (2006). *Direct association between caspase 3 and alpha5beta1 integrin and its role during anoikis of rat fibroblasts Cell Biol Int*, **30**, 963-9.
- Rak J, Mitsushashi Y, Sheehan C, Krestow JK, Florenes VA, Filmus J and Kerbel RS. (1999). *Collateral expression of proangiogenic and tumorigenic properties in intestinal epithelial cell variants selected for resistance to anoikis Neoplasia*, **1**, 23-30.
- Ratheesh A, Ingle A and Gude RP. (2007). *Pentoxifylline modulates cell surface integrin expression and integrin mediated adhesion of B16F10 cells to extracellular matrix components Cancer Biol Ther*, **6**, 1743-52.
- Reddig PJ and Juliano RL. (2005). *Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival Cancer Metastasis Rev*, **24**, 425-39.
- Ridley BL, O'Neill MA and Mohnen D. (2001). *Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling Phytochemistry*, **57**, 929-67.
- Riedl SJ and Shi Y. (2004). *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 897-907.
- Romagnoli M, Seveno C, Bataille R and Barille-Nion S. (2008). *[Survivin in cancerology : molecular aspects and therapeutic applications] Med Sci (Paris)*, **24**, 821-7.

- Roskelley CD and Bissell MJ. (1995). *Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function* *Biochem Cell Biol*, **73**, 391-7.
- Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Libra M, McCubrey JA, Spandidos DA, Stivala F and Malaponte G. (2009). *Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review)* *Int J Oncol*, **34**, 1481-9.
- Sarrabayrouse G, Synaeve C, Leveque K, Favre G and Tilkin-Mariame AF. (2007). *Statins stimulate in vitro membrane FasL expression and lymphocyte apoptosis through RhoA/ROCK pathway in murine melanoma cells* *Neoplasia*, **9**, 1078-90.
- Schneider G and Burridge K. (1994). *Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata* *Exp Cell Res*, **214**, 264-9.
- Schulze A, Lehmann K, Jefferies HB, McMahon M and Downward J. (2001). *Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells* *Genes Dev*, **15**, 981-94.
- Segal-Bendirdjian E, Dudognon C, Mathieu J, Hillion J and Besancon F. (2005). *[Cell death signalling: recent advances and therapeutic application]* *Bull Cancer*, **92**, 23-35.
- Simpson CD, Anyiwe K and Schimmer AD. (2008). *Anoikis resistance and tumor metastasis* *Cancer Lett*, **272**, 177-85.
- Siwak D, Shishodia S, Aggarwal B, Kurzrock R. (2005). *Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of IKB kinase and Nuclear Factor KB activity and are independent of the B-Raf/Mitogen Activated/Extracellular signal-Regulated protein kinase pathways and the AKT pathway* *Cancer*, **104**, 879-90.
- Smalley KS. (2009). *Understanding Melanoma Signaling Networks as the Basis for Molecular Targeted Therapy* *J Invest Dermatol*.
- Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT and Herlyn M. (2006). *Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases* *Mol Cancer Ther*, **5**, 1136-44.
- Steele JG, Dalton BA, Johnson G and Underwood PA. (1993a). *Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene* *J Biomed Mater Res*, **27**, 927-40.
- Steele JG, Dalton BA, Johnson G and Underwood PA. (1995). *Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts* *Biomaterials*, **16**, 1057-67.
- Steele JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR and Underwood PA. (1993b). *Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to*

- unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment J Biomater Sci Polym Ed*, **5**, 245-57.
- Stupack DG. (2005). *Integrins as a distinct subtype of dependence receptors Cell Death Differ*, **12**, 1021-30.
- Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsichlis PN, Nicosia SV and Cheng JQ. (2001). *AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells Am J Pathol*, **159**, 431-7.
- Swan EA, Jasser SA, Holsinger FC, Doan D, Bucana C and Myers JN. (2003). *Acquisition of anoikis resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer Oral Oncol*, **39**, 648-55.
- Testa JR and Bellacosa A. (2001). *AKT plays a central role in tumorigenesis Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10983-5.
- Thornberry NA and Lazebnik Y. (1998). *Caspases: enemies within Science*, **281**, 1312-6.
- Tibbitt MW and Anseth KS. (2009). *Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture Biotechnol Bioeng*, **103**, 655-63.
- Tsutsumi K, Kasaoka T, Park HM, Nishiyama H, Nakajima M and Honda T. (2008). *Tumor growth inhibition by synthetic and expressed siRNA targeting focal adhesion kinase Int J Oncol*, **33**, 215-24.
- Vachon PH. (2006). *[Cell survival: differences and differentiation] Med Sci (Paris)*, **22**, 423-9.
- Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W and Vandenabeele P. (1999). *The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis Cell Death Differ*, **6**, 1117-24.
- Vayssade M, N. S, R. V, C. D, O. G, P. V, G. V, H. S and M.-D. N. (2009). *Antiproliferative and proapoptotic actions of Okra pectin on B16F10 melanoma cells Phytotherapie research, (sous presse)*.
- Vega FM and Ridley AJ. (2008). *Rho GTPases in cancer cell biology FEBS Lett*, **582**, 2093-101.
- Velzenberger E, Vayssade M, Legeay G and Nagel M-D. (2008). *Study of cell behaviour on a cellulose anti-adhesive substratum Cellulose*, **15**, 347-357.
- von Herbay A and Rudi J. (2000). *Role of apoptosis in gastric epithelial turnover Microsc Res Tech*, **48**, 303-11.
- Westfall SD and Skinner MK. (2005). *Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes ovarian cancer cells to carboplatin and allows adjunct chemotherapy treatment Mol Cancer Ther*, **4**, 1764-71.

- Wierzbicka-Patynowski I and Schwarzbauer JE. (2003). *The ins and outs of fibronectin matrix assembly* *J Cell Sci*, **116**, 3269-76.
- Wong RP, Ng P, Dedhar S and Li G. (2007). *The role of integrin-linked kinase in melanoma cell migration, invasion, and tumor growth* *Mol Cancer Ther*, **6**, 1692-700.
- Woodgett JR. (2005). *Recent advances in the protein kinase B signaling pathway* *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 150-7.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L and Keely PJ. (2004). *Focal adhesion regulation of cell behavior* *Biochim Biophys Acta*, **1692**, 103-19.
- Yamada KM and Cukierman E. (2007). *Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D* *Cell*, **130**, 601-10.
- Yamazaki D, Kurisu S and Takenawa T. (2009). *Involvement of Rac and Rho signaling in cancer cell motility in 3D substrates* *Oncogene*, **28**, 1570-83.
- Yu C, Rahmani M, Dent P and Grant S. (2004). *The hierarchical relationship between MAPK signaling and ROS generation in human leukemia cells undergoing apoptosis in response to the proteasome inhibitor Bortezomib* *Exp Cell Res*, **295**, 555-66.
- Zamir E and Geiger B. (2001). *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions* *J Cell Sci*, **114**, 3583-90.
- Zhang Y, Lu H, Dazin P and Kapila Y. (2004). *Squamous cell carcinoma cell aggregates escape suspension-induced, p53-mediated anoikis: fibronectin and integrin α 5 mediate survival signals through focal adhesion kinase* *J Biol Chem*, **279**, 48342-9.
- Zheng CF and Guan KL. (1993). *Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases* *J Biol Chem*, **268**, 23933-9.
- Zheng CF and Guan KL. (1994). *Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues* *Embo J*, **13**, 1123-31.

Publications et communications

Publications

Vayssade M., Sengkhampan N., Verhoef R., Delaigue C., **Goundiam O.**, Vigneron P., Voragen A.G.J., Schols H.A., Nagel M.D.

Antiproliferative and proapoptotic actions of Okra pectin on B16F10 melanoma cells,
Phytotherapy Research (accepté)

Goundiam O., Nagel M.D., Vayssade M.

Growth and survival signaling in B16F10 melanoma cells in 3D architecture
Cell Biology International (accepté)

Communications internationales avec actes et comités de lecture

Goundiam O., Nagel M.D., Vayssade M.

Study of melanoma cell survival in a 3D architecture

7ème congrès mondial sur le mélanome, 5ème congrès de l'Association Européenne de Dermato-Oncologie,
12-16 Mai 2009, Vienne, Autriche (communication orale)

Goundiam O., Nagel M.D., Vayssade M.

Anti-adhesive substratum to study tumorigenic potential of melanoma cells in vitro

36ème Congrès de la Société Européenne d'Organes Artificiels, 2-5 Septembre 2009, Compiègne
(Présentation orale du poster)

International Journal of Artificial Organs, 32, 458, 2009

Communications nationales avec actes et comités de lecture

Goundiam O., Nagel M.D., Vayssade M.

Etude de la résistance à l'anoïkis de cellules cancéreuses cultivées sur revêtements anti-adhésifs

XXVIIIème Forum de Cancérologie, 22-24 Juin 2008, Paris (communication affichée)

Bulletin du Cancer, 95, 593, 2008.E08-13

Goundiam O., Nagel M.D., Vayssade M.

Study of cancer cell survival using an anti-adhesive substratum

33ème Congrès de la Société de Biomécanique, 1-3 Septembre 2008, Compiègne (communication orale)

Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering S1, 105-106, 2008

Autres communications

Farges G., Brockaert H., Dao T.T, **Goundiam O.**

"Contribution aux bonnes pratiques en recherche biomédicale : acteurs et processus de publication", IRBM-
NEWS vol 28 (4), 2007

Résumé

Dans les conditions physiologiques, les cellules interagissent entre elles et avec les composants de la matrice extracellulaire (MEC) par l'intermédiaire des molécules d'adhérence. Une interruption de ces interactions conduit à une forme de mort cellulaire programmée (apoptose) appelée anoïkis. Le dysfonctionnement de ce processus conduit à des désordres pathologiques comme le cancer. En effet, la résistance à l'anoïkis est une étape importante vers la transformation maligne. L'objectif de cette thèse était de comprendre les mécanismes de résistance à l'anoïkis des cellules de mélanome hautement métastatique B16F10. Pour cela, nous avons utilisé des revêtements anti-adhésifs (CEL et polyHEMA) défavorables à l'attachement cellulaire et donc aux interactions cellules-MEC. Les fibroblastes Swiss 3T3 et les pré-ostéoblastes MC3T3 ont été utilisés comme lignées de référence sensibles à l'anoïkis.

Nos résultats indiquent que dans les cellules cancéreuses B16F10 organisées en larges agrégats sur revêtement anti-adhésif, il n'y a pas d'organisation des filaments d'actine, cependant la protéine RhoA, impliquée dans l'adhésion médiée par les intégrines, reste activée jusqu'à 6 jours de culture.

Les voies de survie intracellulaires PI3K/AKT et MAPK sont activées dans les cellules de mélanome. L'inhibition de PI3K par la molécule LY294002 et d'AKT par des ARN interférentiels affectent la prolifération des cellules cultivées en 3D.

La Fn, une protéine majeure de la MEC ne semble pas être impliquée dans la survie des cellules de mélanome. L'inhibition de son expression à l'aide d'ARN interférentiels n'influence ni la prolifération ni l'apoptose des cellules de mélanome.

La culture sur revêtement anti-adhésif constitue ainsi un modèle intéressant pour analyser les dysfonctionnements qui régulent la résistance à l'anoïkis des cellules cancéreuses.

Mots clés : anoïkis, revêtements anti-adhésifs, polyHEMA, revêtement cellulosique, voies de signalisation, fibronectine, RhoA, siRNA, mélanome.