



HAL
open science

Etudes des mécanismes de mort cellulaire et résistance des cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques : modèle du mélanome

Eléonore Mayola

► **To cite this version:**

Eléonore Mayola. Etudes des mécanismes de mort cellulaire et résistance des cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques : modèle du mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T012 . tel-00719317

HAL Id: tel-00719317

<https://theses.hal.science/tel-00719317>

Submitted on 19 Jul 2012

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.

UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD

Année 2011

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Cancérologie - Biochimie, Biologie cellulaire et moléculaire

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie : Biologie – Médecine – Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Eléonore MAYOLA

le 28 avril 2011

Titre :

**Etude des mécanismes de mort cellulaire et de résistance des
cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles
approches thérapeutiques : modèle du mélanome**

Directrice de thèse : Pr Brigitte DEBUIRE

JURY

Pr Christian Poüs

Dr Gilles Courtois

Dr Gwénaél Jan

Pr Catherine Alcaïde

Pr Brigitte Debuire

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le Professeur Brigitte Debuire pour la confiance qu'elle m'a témoignée en me permettant de réaliser ma thèse dans son laboratoire.

Un grand merci au Professeur Antoinette Lemoine pour son aide et son soutien tout au long de ma thèse.

Je tiens à remercier le Professeur Christian Poüs pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Merci aux Docteurs Gilles Courtois et Gwénaél Jan pour avoir accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse. Je remercie le Professeur Catherine Alcaïde, ma professeure de biologie cellulaire au Magistère de Génétique, pour sa participation à mon jury en tant qu'examinatrice.

Merci au Docteur Claude Boucheix et au Professeur Eric Rubinstein ainsi que tous mes collègues de l'U1004. Merci à Davide pour son enthousiasme sur le projet PBG et pour m'avoir épaulée ces derniers mois! Merci au Docteur Stéphanie Charrin pour ses conseils et à Denis Clay pour son aide en cytométrie.

Un grand merci au Docteur Catherine Brenner pour m'avoir accueillie au sein de son équipe à Versailles puis à Châtenay-Malabry. Merci d'avoir partagé tes connaissances scientifiques et ton expérience. Merci pour ton soutien, ton écoute, ta confiance et tes conseils!

Je remercie le Docteur Christophe Lemaire pour l'apprentissage de la biologie cellulaire et l'encadrement de mes manip. Je remercie également le Docteur Ossama Sharaf-el-Dein pour son aide technique en biologie cellulaire. Merci à Grégory, Le Ha et Cindy. Mes remerciements vont également à Claire ; merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur importantes pour l'équilibre de l'équipe! « And last but not least » merci à Cécile pour son aide scientifique et techniques. Merci surtout pour ton soutien moral tout au long de ma thèse! Ça y est j'y suis arrivé, maintenant c'est ton tour !

Je tiens à remercier le Docteur Rodolphe Fishmeister pour m'avoir accueillie à l'U769 et le Docteur Renée Ventura-Clapier pour m'avoir accueillie dans son équipe. Un grand merci également à tous les membres de l'U769 pour l'ambiance chaleureuse et festive !

Merci au Docteur Lionel Larue pour ses nombreux conseils sur les mélanomes et son aide pour la rédaction de l'article WFA. Merci pour son soutien au projet PBG qui a permis le lancement d'une étude *in vivo*. Merci à Elodie Belloir et Christophe Alberti pour leur participation à cette étude.

Merci au Professeur Shazib Pervaiz pour son aide et ses conseils en matière d'espèces activées de l'oxygène (EAO) et d'antioxydants. Merci également de m'avoir accueillie dans sa « famille » d'étudiants le temps d'un congrès ! Merci à Serena Seah pour ses conseils techniques sur les EAO, sa fraîcheur et sa bonne humeur !

Une place dans mes remerciements revient à l'auteur et humoriste Jorge Cham pour ses « PhD Comics » qui apportent du réconfort à tous les thésards de la planète !

Un grand merci à Audrey et Matthieu, mes « acolytes du vendredi soir », pour leur soutien inconditionnel ! Merci et pardon aussi au gens que je n'ai pas assez vus et soutenus pendant ces trois ans et demi.

Merci Ariane (Docteur Chagier) pour ton soutien depuis mon M2. J'espère avoir été à la hauteur !

Merci également à Thi-Chien pour m'avoir montré ce qu'était la force et le courage.

En fait, merci aux gens qui ont cru en moi depuis le début...

Je finirai donc par remercier ma mère, Virginie Vignac et ma sœur, Fabienne Mayola pour m'avoir supportée (au sens propre comme au sens figuré) toutes ses années (oui 26 ans déjà !) et plus particulièrement pendant ma thèse ! Thanks for everything, your support, patience, energy, advice and love.

Etude des mécanismes de mort cellulaire et de résistance des cellules cancéreuses pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques : modèle du mélanome

ADRESSE DU LABORATOIRE :

Service de Biochimie et Biologie Moléculaire
INSERM U1004, Institut André Lwoff – IFR89
Université Paris-Sud XI, PRES Universud-Paris
Hôpital Universitaire Paul Brousse
12-14 avenue Paul Vaillant Couturier
94800 Villejuif

MOTS CLES : apoptose, nécrose, mitochondrie, résistance, stress oxydant, stress du réticulum endoplasmique, mélanome

Résumé

L'apoptose est une mort cellulaire programmée nécessaire à l'homéostasie tissulaire au cours du développement. Les cellules cancéreuses acquièrent la capacité à échapper à l'apoptose. Restaurer la capacité des cellules tumorales à mourir est une stratégie thérapeutique qui permettrait de lutter contre le cancer. Il est donc important d'identifier de nouvelles cibles au sein de la signalisation apoptotique et de tester de nouvelles molécules.

La mitochondrie, intégrateur central des signaux de mort cellulaire et actrice de l'exécution de l'apoptose, est une cible de choix pour développer des thérapies anti-tumorales. L'ANT (Adenine Nucleotide Translocase) est la protéine majoritaire de la membrane interne mitochondriale. Elle possède une fonction de transporteur ATP/ADP, en condition physiologique, et suite à un stimulus apoptotique, acquiert une activité de pore létal. Ainsi, il est intéressant d'inhiber la fonction transporteur et d'activer la fonction pore d'ANT pour induire l'apoptose. Il existe quatre isoformes d'ANT : ANT1, 2, 3 et 4. Nous avons étudié le rôle d'ANT4, récemment identifiée, dans la signalisation apoptotique. Notre étude montre le rôle anti-apoptotique d'ANT4 dans des cellules cancéreuses et l'intérêt d'ANT comme cible thérapeutique anti-cancéreuse.

Une augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques, l'adaptation aux stress cellulaires et l'activation de voies de survie sont les mécanismes les plus fréquemment décrits pour expliquer la chimiorésistance du mélanome. A l'aide de modèles cellulaires, nous

avons étudié la capacité de deux nouvelles molécules : Withaférine A (WFA) et Plumbagine (PBG) à stimuler l'apoptose et déterminé les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons montré la capacité de WFA à induire spécifiquement la voie mitochondriale de l'apoptose de cellules de mélanome par un mécanisme dépendant de la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) qui déclenchent la voie mitochondriale et de la diminution du niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. En revanche, PBG induit une mort apoptotique et une mort nécrotique des cellules de mélanomes. Dans les deux cas, PBG agit par l'augmentation des EAO suite au déclenchement d'un stress du reticulum endoplasmique. WFA et PBG sont donc deux molécules pro-oxydantes capables d'induire la mort des cellules de mélanome en tirant partie de leur vulnérabilité au stress oxydant.

Nos travaux ont participé à la mise en évidence d'une cible thérapeutique anti-cancéreuse potentielle et de deux agents capables d'induire la mort cellulaire dans un contexte de chimiorésistance.

Study of cell death and resistance mechanisms in cancer cells for the development of new therapeutic approaches : melanoma model

KEYWORDS : apoptosis, necrosis, mitochondria, resistance, oxydative stress, endoplasmique reticulum stress, melanoma

Abstract

Apoptosis is a programmed cell death process necessary for tissue homeostasis during development. Cancer cells acquire the capacity to evade apoptosis. Restoring tumor cells ability to die is a therapeutic strategy against cancer. It is therefore important to identify new therapeutic targets within the apoptotic signaling and to test new molecules.

Mitochondrion being a central integrator of cell death signals and a key player in apoptosis execution, it is a target of choice to develop new anticancer therapies. ANT (Adenine Nucleotide Translocase) is the main protein of the inner mitochondrial membrane. It presents a ADP/ATP transporter function in physiological conditions and acquire a lethal pore activity upon apoptotic stimulus. It is thus interesting to inhibit the transporter function and

activate ANT pore function in order to induce apoptosis. There are four isoforms: ANT1, 2, 3 and 4. We studied the role of the recently discovered ANT4 in apoptotic signaling. Our study emphasize ANT4 anti-apoptotic role in cancer cells and ANT potential as an anticancer therapeutic target.

Increase in anti-apoptotic proteins, adaptation to cellular stress and activation of survival pathways are the main mechanisms responsible for chemoresistance. Using cellular models we studied the ability of two molecules: Withaferin A (WFA) and Plumbagin (PBG) to stimulate apoptosis and determined the molecular mechanisms involved. We showed WFA capacity to specifically induce the mitochondrial pathway of apoptosis in melanoma cells through reactive oxygen species (ROS) generation leading to mitochondrial pathway activation and the decrease in anti-apoptotic protein Bcl-2 expression level. However, PBG is responsible for apoptosis and necrosis induction in melanoma cells. In both cases PBG acts through an increase in ROS following endoplasmic reticulum stress. WFA and PBG are thus two pro-oxidant molecules able to induce the death of melanoma cells by taking advantage of their vulnerability to oxidative stress.

Our work took part in the demonstration of a potential anticancer target and two agents able to induce cell death in a context of chemoresistance.

Liste des abréviations

AC	Adénylate Cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
AMPC	Adénosine Monophosphate cyclique
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ARN	Acide ribonucléique
ASK1	Apoptosis-Signal-regulating Kinase 1
Asp	Aspartate
ATF6	Activating Transcription Factor 6
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
Bak	BCL2-Antagonist/Killer
Bax	BCL2-Associated X protein
BCC	Basal Cell Carcinoma
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
Bcl-xL	BCL2-like 1
bFGF/FGF-2	basic Fibroblast Growth Factor
Bid	BH3 Interacting Domain death agonist
Bim	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BH	Bcl-2 Homology
BSO	Buthionine SulfOximine
Ca ²⁺	Calcium
CARD	CAspase Recrutment Domain
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CED	CEll Death abnormality
cIAP 1, 2	cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1, 2
CHOP	C/EBP homologous protein
CREB	C-AMP Responsive Element-Binding
CsA	Cyclosporine A
CSCs	Cancer Stem Cells
CypD	Cyclophiline D

Cyt <i>c</i>	Cytochrome <i>c</i>
DAMPs	Damage/Danger-Associated Molecular Patterns
DED	Death Effector Domain
DD	Death Domain
DFF40/CAD	DNA Fragmentation Factor 40/ Caspase Activated-DNase
DFF45/ICAD	DNA Fragmentation Factor 45/ Inhibitor of CAD
DIDS	4,4'-DiIsothiocyanatostylbene-2,2'-DiSulfonate
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DR	Death Receptor
DUOX	DUal OXidase
EAO	Espèces Activées de l'Oxygène
eIF2	eukaryotic Initiation Factor 2
EndoG	Endonucléase G
Erk	Extracellular signal-Related Kinases
ET-1	Endothéline-1
FADD	Fas Associated Death Domain
FLIP	FLice-Inhibitory Protein
GPx	Glutathion Péroxydase
Grp78/BiP	Glucose Receptor Protein 78kDa
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-transférase
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HMGB1	High Mobility Group Box 1
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IFN- α	Interféron- α
I κ B	Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
IKK- β	Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells kinase β
IL	Interleukines
IMS	Intermembrane Space
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphate
IP3R	Inositol-1,4,5-trisphosphate Receptor
IRE1	Inositol-Requiring Enzyme 1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	kiloDalton

KO	Knock-Out
MAPK	Mitogen Associated Protein Kinase
MC1R	Melanocortin-1-Receptor
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia sequence 1
Mek	Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase
MEM	Membrane Externe Mitochondriale
MIM	Membrane Interne Mitochondriale
MITF	Microphthalmia-associated Transcription Factor
ML-IAP	Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein
MLS	Mitochondrial Localization Sequence
MMPs	Métalloprotéases
MMSCs	Malignant Melanoma Stem Cells
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH	β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NCCs	Neural Crest Cells
Nec	Nécrostatines
NF-kB	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NOD/SCID	Non-Obese Diabetic/Severe Combined Immuno-Deficiency
NOXs	NADPH oxydases
O_2^-	anion superoxide
$\cdot OH$	radical hydroxyle
Omi/HtrA2	HtrA serine peptidase 2
PARP	Poly ADP-Ribose Polymérase
PERK	Pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase
PBG	Plumbagine
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PMM	Perméabilisation des Membranes Mitochondriales
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTP	Pore de Transition de Perméabilité
RGP	Radial Growth Phase
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SCF	Stem cell factor
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase

Smac/Diablo	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with LOw pI
SOD	Superoxide Dismutase
RE	Réticulum Endoplasmique
RIP	Receptor-Interacting Protein
RYR	Récepteur à la Ryanodine
SCPs	Schawnn Cells Precursors
t-Bid	Bid tronqué
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TG	Thapsigargine
TM	Transmembranaire
TN	Tunicamycine
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRADD	TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF2	TNF-receptor-associated factor 2
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRP 1, 2	Tyrosinase-related protein-1, 2
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultraviolet
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VGP	Vertical Growth Phase
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WNT	Wingless-type MMTV integration site family
WFA	Withaférine A
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
XBP1	X box-Binding Protein 1
z-VAD-fmk	Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluorométhylkétone
α -MSH	α -Melanocyte Stimulating Hormone
$\Delta\Psi_m$	Potentiel transmembranaire mitochondrial

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1 : LES TROIS PRINCIPAUX TYPES DE MORT CELLULAIRE : APOPTOSE, AUTOPHAGIE ET NECROSE.	15
FIGURE 2A : LES CASPASES HUMAINES	18
FIGURE 2B : STRUCTURE ET MODE D'ACTIVATION DES CASPASES	18
FIGURE 3A : LA VOIE DES RECEPTEURS DE MORT	21
FIGURE 3B : LA SIGNALISATION EN AVAL DES RECEPTEURS DE MORT	21
FIGURE 4A : LA VOIE MITOCHONDRIALE DE L' APOPTOSE	23
FIGURE 4B : L' ASSEMBLAGE DE L' APOPTOSOME	23
FIGURE 5 : NECROSE ET DECLENCHEMENT DE L'INFLAMMATION	27
FIGURE 6 : LA SIGNALISATION DE LA NECROSE PROGRAMMEE	30
FIGURE 7 : LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	33
FIGURE 8A : MECANISMES D'INDUCTION DE LA PMM	35
FIGURE 8B : LE PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE (PTP)	35
FIGURE 9A : PRODUCTION DES EAO MITOCHONDRIAUX	39
FIGURE 9B : LES ISOFORMES DE NADPH OXYDASE (NOXS)	39
FIGURE 10 : ADAPTATION AU STRESS OXYDANT, CANCEROGENESE ET CHIMIO-RESISTANCE	42
FIGURE 11 : CIBLER LES CELLULES CANCEREUSES PAR LE SYSTEME REDOX	44
FIGURE 12A : LA REPONSE UPR (« UNFOLDED PROTEIN RESPONSE »)	46
FIGURE 12B : LE STRESS RE ET LES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2	46
FIGURE 13A : LA FAMILLE DES INHIBITEURS D' APOPTOSE (IAPS)	50
FIGURE 13B : SCHEMA DE L'INTERACTION DE XIAP AVEC LES CASPASES 3 ET 9	50
TABLEAU 1 : LES INHIBITEURS DE BCL-2	51
FIGURE 14A : STRUCTURE DE LA PEAU	55
FIGURE 14B : STRUCTURE DE L' EPIDERME	55
FIGURE 15A : CARCINOME BASO-CELLULAIRE	59
FIGURE 15B : CARCINOME SPINO-CELLULAIRE	59
FIGURE 15C : MELANOME	59
FIGURE 16A : STRUCTURE ET FONCTION DU GENE CDKN2A (CYCLIN-DEPENDENT KINASE INHIBITOR 2A)	62
FIGURE 16B : ROLE DE MC1R (MELANOCORTIN-1-RECEPTOR)	62
FIGURE 17A : LA REGLE ABCDE	65
FIGURE 17B : LA PROFONDEUR DU MELANOME COMME OUTIL DE PRONOSTIC	65
FIGURE 18 : MIGRATION DES CELLULES DE LA CRETE NEURALE (NCCS)	67
FIGURE 19 : INTERACTION KERATINOCYTE-MELANOCYTES EN REPONSE AUX UV	70
FIGURE 20 : MUTATIONS ET DEREGULATIONS DANS LA TRANSFORMATION DES MELANOMES	73
TABLEAU 2 : SIGNATURE D'EXPRESSION GENIQUE DU MELANOME METASTATIQUE	78
FIGURE 21A : LES INHIBITEURS DE MAPK	83
FIGURE 21B : PET SCANS DE PATIENTS TRAITES PAR PLX4032	83
FIGURE 22 : VOIES DE SURVIE ET RESISTANCE A L' APOPTOSE	87
FIGURE 23 : MODIFICATIONS DES VOIES APOPTOTIQUES DANS LE MELANOME	89
FIGURE 24 : INTERACTIONS ENTRE LES SIGNALISATIONS ET O ₂ ⁻ DANS LES MELANOMES	93
FIGURE 25 : WITHA FERINE A (WFA)	95
TABLEAU 3 : CIBLES DIRECTES ET INDIRECTES DE WFA	99
FIGURE 26 : PLUMBAGINE (PBG)	101
TABLEAU 4 : CIBLES DIRECTES ET INDIRECTES DE LA PBG	103

SOMMAIRE

INTRODUCTION 14

PARTIE I : MORT CELLULAIRE ET RESISTANCE TUMORALE	14
I- Voies d'induction de la mort cellulaire	14
1. L'apoptose	14
a) Caractéristiques de l'apoptose	16
b) Voies d'induction de l'apoptose	19
c) Apoptose et pathologies	25
2. La nécrose	26
a) Les caractéristiques de la nécrose	26
b) La nécrose induite	28
3. La mitochondrie	31
a) Le rôle physiologique de la mitochondrie	31
b) Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire	31
c) La perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM)	32
d) Cibler la mitochondrie et ANT dans les cancers	36
II- Développement de tolérances et résistance tumorale	37
1. La tolérance au stress oxydant	37
a) Les espèces activées de l'oxygène (EAO)	37
b) EAO et mort cellulaire	40
c) EAO, cancérogenèse et résistance	40
2. La tolérance au stress du Réticulum Endoplasmique (RE)	45
a) Le stress du RE	45
b) La communication RE-mitochondrie	47
c) Stress RE et résistance	48
3. L'expression de protéines anti-apoptotiques	48
a) Les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs)	48
b) Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	51
PARTIE II : MODELE DE TUMEUR RESISTANTE : LE MELANOME	53
I- L'environnement et l'initiation du mélanome	53
1. L'organisation de la peau	53
a) L'épiderme	53
b) Le derme	56
c) L'hypoderme	57
2. Les cancers de la peau	58
a) Les carcinomes baso-cellulaire et spino-cellulaire	58
b) Le mélanome	60
3. Les mélanocytes : précurseurs des mélanomes	66
a) Le développement physiologique des mélanocytes	66
b) L'homéostasie épidermique	69
c) Le développement pathologique des mélanocytes : « mélanomagenèse »	71
II- Caractéristiques et thérapies du mélanome	74
1. Les caractéristiques du mélanome	74
a) La capacité métastatique	74
b) La résistance à la mort cellulaire	81
2. Nouvelles approches thérapeutiques pour le mélanome	94
a) La molécule Withaferine A (WFA)	94
b) La molécule Plumbagine (PBG)	100

OBJECTIFS 104

MATERIELS ET METHODES 105

I- Matériels	105
1) Produits	105
2) Lignées cellulaires	105
3) Construction des plasmides ANT3, 4 -V5	105
4) Souris	106
II- Méthodes	106

1) Fractionnement cellulaire	106
2) Mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire	106
a) Test BrdU	106
b) Test FDA	106
3) Mesure de l'apoptose et de la nécrose	107
a) Marquage Hoechst/iodure de propidium (IP)	107
b) Mesure de l'hypoploïdie (SubG1)	107
4) Préparation des échantillons pour la microscopie électronique	107
5) Analyse de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose	107
6) Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial	108
7) Mesure de la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale	108
8) Mesure de la respiration mitochondriale des EAO	108
a) Mesure de la consommation d'oxygène	108
b) Mesure des EAO intracellulaires	109
9) Immunofluorescence	109
10) Western blot	109
11) Transfections transitoires	110
12) Tests fonctionnels sur mitochondries isolées	110
a) Mitochondries seules	110
b) Système acellulaire mitochondries-réticulum endoplasmique	110
13) Étude <i>in vivo</i>	111
14) Statistiques	111

RESULTATS 112

I- Etude du rôle de la nouvelle isoforme d'ANT dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique	112
Article 1 : The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells	112
II- Sensibilisation à la mort cellulaire par deux nouvelles molécules dans un modèle de cancer particulièrement résistant : le mélanome	122
Article 2 : Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2	123
Article 3 : Plumbagin est capable d'induire la mort des cellules de mélanome par apoptose ou par nécrose suite à la production d'EAO et au déclenchement de la voie mitochondriale	155

DISCUSSION ET PERSPECTIVES 168

BIBLIOGRAPHIE 177

ANNEXE 201

Revue : The Adenine Nucleotide Translocase 2, a Mitochondrial Target for Anticancer Biotherapy.	201
---	-----

Introduction

PARTIE I : MORT CELLULAIRE ET RESISTANCE TUMORALE

La résistance à la mort cellulaire est une des caractéristiques que la cellule tumorale acquiert au cours de la cancérogenèse. Sensibiliser les cellules à la mort cellulaire est une des stratégies largement répandue pour détruire ces cellules. Mon travail de thèse repose sur la recherche de cibles et de molécules dans le but de sensibiliser des cellules à la mort. Pour ces raisons nous détaillerons ici les processus de mort cellulaire apoptotique et nécrotique. Nous étudierons le rôle de la mitochondrie, un élément central de la mort cellulaire et une cible privilégiée dans les thérapies anti-cancéreuses.

I- Voies d'induction de la mort cellulaire

La mort cellulaire « programmée », c'est-à-dire génétiquement contrôlée, est indispensable au développement des organismes pluricellulaires (Conradt 2009). Par l'élimination des cellules surnuméraires, l'homéostasie des tissus est garantie et la taille des organes est maîtrisée. Au cours de la vie adulte, la mort cellulaire programmée est indispensable à l'élimination de cellules potentiellement dangereuses (lymphocytes T auto-réactifs, cellules endommagées ou infectées).

Trois types principaux de mort cellulaire sont reconnus : apoptose, autophagie et nécrose (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). L'autophagie est un processus quelque peu différent de prime abord car il constitue un mécanisme de survie de la cellule à une carence en nutriments. L'auto-digestion de ses organites permet à la cellule de palier ses besoins en substrats. Lorsque la carence persiste, la cellule enclenche un processus de mort cellulaire (« autophagy-associated cell death »). (Hotchkiss, Strasser et al. 2009). L'apoptose et la nécrose ont longtemps été opposées. L'apoptose est généralement considérée comme une mort programmée, garantissant l'homéostasie tissulaire, alors que la nécrose est décrite comme une mort accidentelle non physiologique. Or, récemment, des voies régulées d'induction de la nécrose ont été décrites qui remettent en question cette dualité (Degterev, Huang et al. 2005). Apoptose et nécrose sont ainsi deux types de mort induite dont les dérégulations sont susceptibles d'entraîner des phénomènes pathologiques.

1. L'apoptose

La mort cellulaire apoptotique est impliquée dans l'élimination de cellules au cours du développement embryonnaire et foetal comme l'élimination des tissus inter-digitaux.

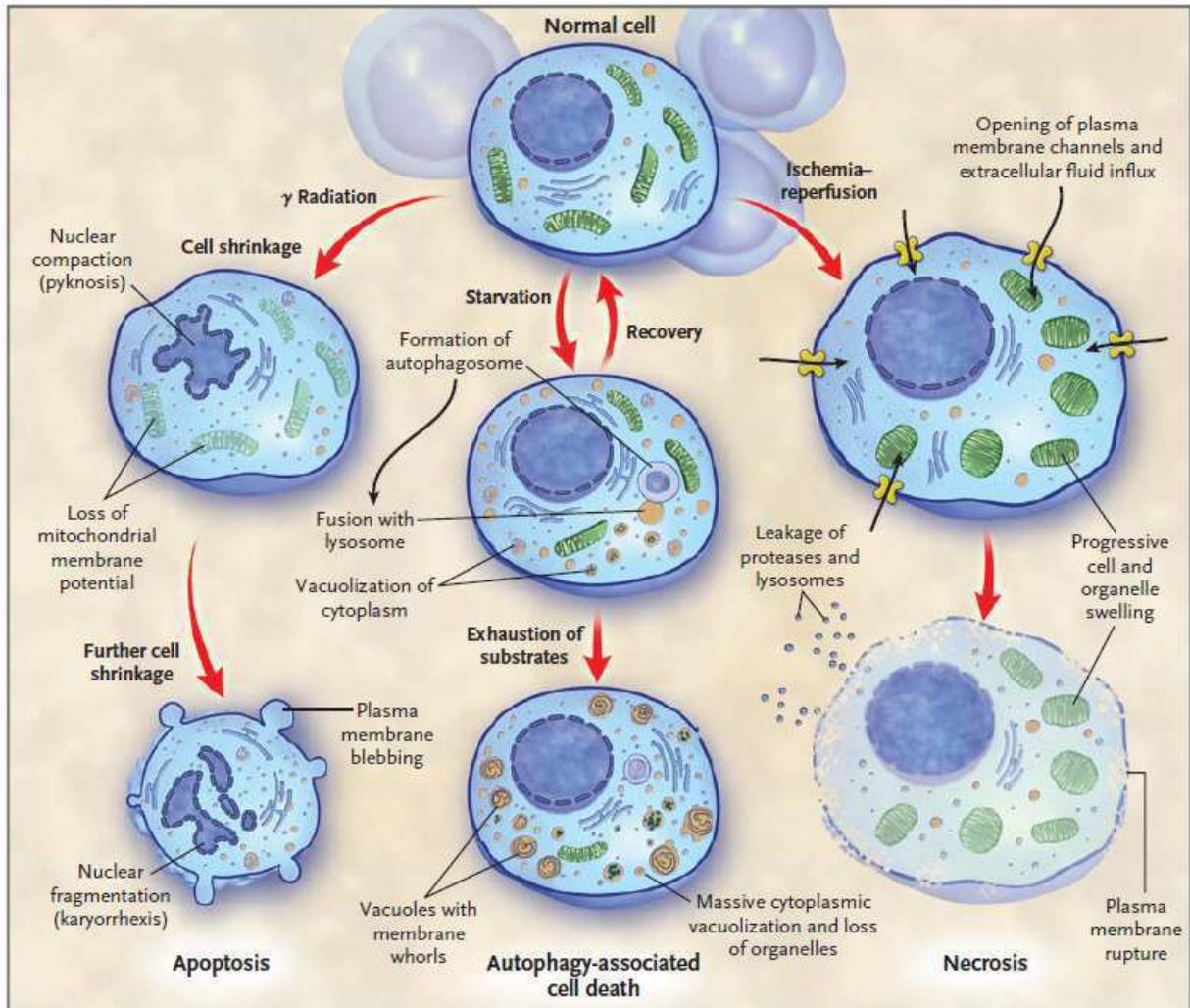


Figure 1 : Les trois principaux types de mort cellulaire : apoptose, autophagie et nécrose.

Changements morphologiques induits par ces trois types de mort cellulaire suite à divers stimuli, comme par exemple l'irradiation pour l'apoptose, le manque de substrats pour l'autophagie et l'ischémie-reperfusion pour la nécrose. L'apoptose est caractérisée par le rétrécissement de la cellule et le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. La nécrose à l'inverse fait intervenir une perméabilisation précoce de la membrane plasmique qui provoque une lyse de la cellule.

(D'après Hotchkiss et al., N Engl J Med, 2009)

L'apoptose est aussi responsable de l'élimination de cellules à l'âge adulte et notamment de cellules dont l'ADN est endommagé pour maintenir l'intégrité génomique et l'homéostasie cellulaire. (Conradt 2009). Ce processus, essentiel à la vie des organismes pluricellulaires, a été identifié au cours des années 60 et nommé « apoptose » par John F. R. Kerr et al en 1972 (Kerr, Wyllie et al. 1972). Il a été mis en évidence sur la base de caractéristiques morphologiques particulières.

a) Caractéristiques de l'apoptose

En 1962, Kerr observait une mort cellulaire particulière dans des lobes de foie de rat soumis à l'ischémie. L'observation histologique de ce phénomène qui différait de la nécrose, mort cellulaire déjà connue, lui a d'abord valu le nom de « shrinkage necrosis » (Kerr 1965; Kerr 2002). En effet, l'apoptose s'accompagne des changements morphologiques caractéristiques : arrondissement de la cellule avec rétraction des pseudopodes, réduction du volume cellulaire (pyknosis), condensation de la chromatine, fragmentation nucléaire (karyorrhexis), pas ou peu de modifications de la structure des organites cytoplasmiques, un « bourgeonnement » membranaire (« blebbing ») et une internalisation par les phagocytes (Fig. 1). Le terme « apoptose » est utilisé pour des événements de mort cellulaire qui font intervenir plusieurs de ces changements morphologiques. (Kroemer, Galluzzi et al. 2009). Différentes techniques permettent d'observer et de quantifier des phénomènes spécifiques de l'apoptose tels que l'intégrité de la membrane plasmique, l'exposition des phosphatidyl sérines sur la face externe de la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN (Galluzzi, Aaronson et al. 2009). L'apoptose est souvent considérée comme une mort caspases-dépendante, c'est-à-dire, nécessitant l'activation de la cascade protéolytique des caspases lors de la phase exécutive de l'apoptose. Il est vrai que les caspases différencient clairement l'apoptose de la nécrose notamment, car la déplétion en ATP, caractéristique de la nécrose, ne permet pas l'activation des caspases. Arrêtons nous ici sur une description des caspases bien qu'il existe une mort apoptotique caspase-indépendante que nous décrirons dans le paragraphe suivant (b. Voies d'induction de l'apoptose).

Les caspases sont des protéases possédant un résidu cystéine dans leur site actif et un résidu aspartate dans leur site de clivage (en anglais « cysteinyl-aspartate-cleaving proteases »). Comme toutes les familles de protéines impliquées dans le processus apoptotique, les caspases ont été conservées au cours de l'évolution des métazoaires (Degterev and Yuan 2008). Elles ont d'abord été étudiées chez *C. elegans* depuis la découverte du gène *ced-3* impliqué dans la mort cellulaire programmée au cours du développement (Yuan, Shaham et al. 1993). Des homologues de *ced-3* ont par la suite été identifiés dans d'autres espèces (CED-

3 like molecules). Chez les mammifères, il existe 14 caspases (dont 12 chez l'Homme) que l'on classe en trois sous-types : les caspases initiatrices et les caspases exécutrices (ou effectrices) apoptotiques ainsi que les caspases inflammatoires. Les caspases initiatrices sont en amont dans la cascade et, quand elles sont activées, elles activent à leur tour les caspases exécutrices. Ces caspases initiatrices sont capables de s'auto-activer en réponse aux stimuli pro-apoptotiques au sein de complexes multiprotéiques.

Toutes les caspases ont une structure conservée et sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs ou zymogènes appelés pro-caspases. Les caspases sont constituées de trois parties principales : un pro-domaine, de taille et de séquence variables, localisé à l'extrémité amino-terminale de la protéine, une grande sous-unité (environ 20 kDa) qui contient le site catalytique de l'enzyme et qui se situe au milieu de la molécule et une petite sous-unité (environ 10 kDa) localisée dans la partie carboxy-terminale (Fuentes-Prior and Salvesen 2004). Le pro-domaine peut être constituée de deux motifs différents : le motif CARD (pour « caspase recruitment domain ») et DED (pour « death effector domain ») qui permettent une interaction entre les caspases (Fig.2A). L'activation des pro-caspases nécessite le clivage du pro-domaine et un clivage entre la grande et la petite sous-unité. Ceci va permettre un réarrangement du site actif de la caspase en conformation active. Le site actif se trouve au niveau de la grande sous-unité mais celle-ci doit rester associée à la petite sous-unité pour exercer sa fonction catalytique (Fig.2B). Les caspases fonctionnent classiquement en hétérotétramères suite à la dimérisation de deux hétérodimères. En l'absence de tout stimulus apoptotique, les caspases initiatrices existent sous forme de monomères et les caspases effectrices sous forme de dimères de pro-caspases. (Taylor, Cullen et al. 2008). On note que toutes les caspases ne participent pas au processus apoptotique ; certaines, comme les caspases-1, 4, 5 et 12, sont activées lors de la réponse immunitaire innée et régulent l'inflammation (Fig.2A).

Si les caspases initiatrices ont comme substrats les caspases exécutrices, les caspases exécutrices ont, elles, des centaines de substrats qui vont contribuer à la destruction de la cellule apoptotique (Taylor, Cullen et al. 2008). La présence relativement fréquente des séquences peptidiques reconnues par les caspases dans les protéines humaines suggère l'existence d'une multitude de substrats pour ces protéases. A ce jour, plus de 800 substrats ont été identifiés et classés en fonction de leur importance dans la physiologie de la cellule (Fischer, Janicke et al. 2003). La fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes est l'une des caractéristiques des cellules en fin d'apoptose.

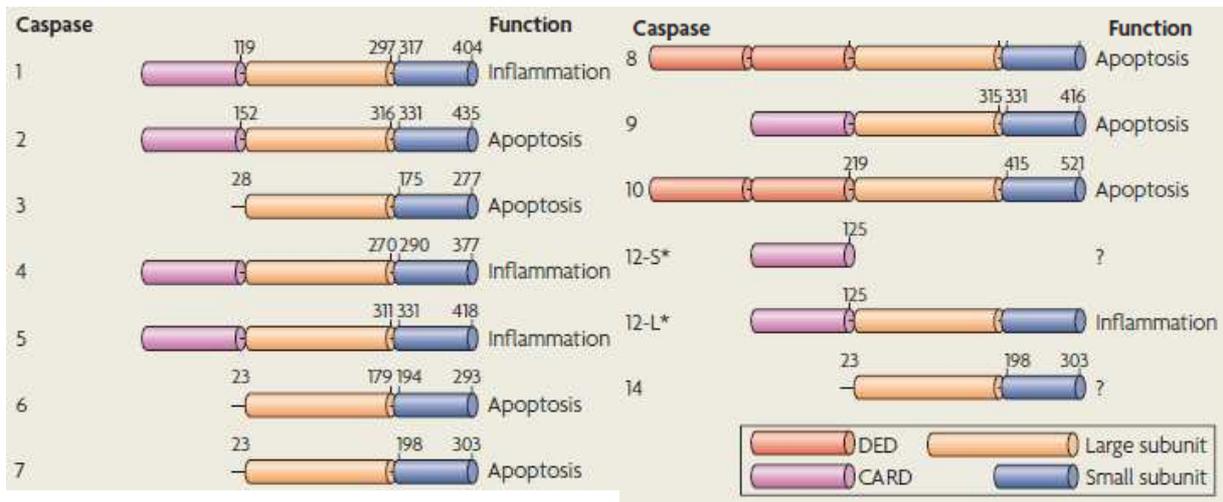


Figure 2 A : Les caspases humaines

Parmi les caspases, 7 sont impliquées dans l'apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10) et 4 dans l'inflammation (caspases 1, 4, 5 et 12). La caspase 14 semble impliquée dans le développement des kératinocytes. La caspase 12 a une forme longue active (L) et une forme courte inactive (S). (D'après Taylor et al. Nature Review Mol Cell Biol, 2008)

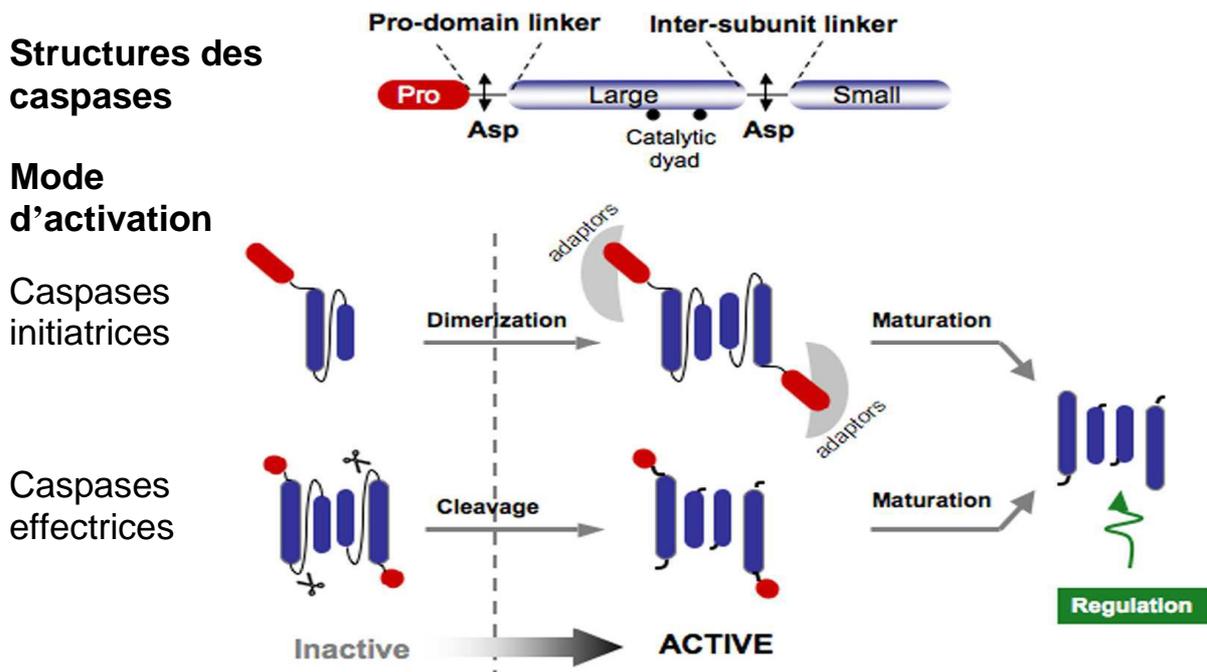


Figure 2 B : Structure et mode d'activation des caspases

Les pro-caspases initiatrices monomériques se dimérisent avant leur activation par clivage au niveau des résidus aspartate (Asp) présents entre le pro-domaine et la grande sous-unité et entre les deux sous-unités. Les pro-caspases effectrices dimériques sont activées par les mêmes clivages que les pro-caspases initiatrices. Les deux sous-unités restent associées.

(D'après Pop et Salvesen, J Biol Chem, 2009)

La fragmentation de l'ADN est généralement assurée par la nucléase DFF40 (DNA fragmentation factor)/CAD (caspase activated-DNase) qui coupe l'ADN génomique entre les nucléosomes pour générer des fragments de 180 paires de bases en fin d'apoptose (Samejima, Tone et al. 2001). Cette nucléase existe dans la cellule sous forme de complexe inactif, liée à une chaperonne inhibitrice, la DFF45/ICAD (inhibitor of CAD). Ce complexe est dissocié par l'action de la caspase 3 qui clive DFF45 en trois sites différents et permet à DFF40 de former des dimères qui sont alors actifs. D'autres événements, comme le clivage des lamines, expliquent la condensation nucléaire observée au cours de l'apoptose. La perte de la morphologie des cellules apoptotiques est la conséquence du clivage de protéines du cytosquelette (Fischer, Janicke et al. 2003). Un autre substrat des caspases est la poly (ADP-ribose) polymérase ou PARP. Cette protéine est une enzyme nucléaire très abondante qui catalyse la fixation de polymères d'ADP-ribose sur des protéines acceptrices. La PARP est recrutée en réponse à des lésions de l'ADN et devient active en se liant à l'ADN. Elle semble alors impliquée dans la réparation de l'ADN en synthétisant de longs polymères d'ADP-ribose (Dantzer, Schreiber et al. 1999). Chaque cycle d'ADP-rybosylation est couplé à la consommation d'une molécule de NAD^+ , elle-même métaboliquement équivalente à quatre molécules d'ATP. Au cours de l'apoptose, la PARP est clivée par les caspases effectrices -3 et -7 (Lazebnik, Kaufmann et al. 1994; Germain, Affar et al. 1999). Il en résulte que la PARP ne peut plus synthétiser de polymères d'ADP-ribose en réponse à des lésions de l'ADN. La réparation de l'ADN est alors compromise et l'arrêt de la poly ADP-rybosylation permet également de préserver les stocks d'ATP qui sont nécessaires au déroulement de l'apoptose (Fischer, Janicke et al. 2003).

b) Voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases : une phase d'induction ou d'initiation, une phase d'exécution et une phase de dégradation. La phase d'initiation de l'apoptose est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra- ou extracellulaire) est transmis aux caspases initiatrices par des molécules adaptatrices. Ces caspases interviennent dans l'exécution de l'apoptose et conduisent à la dégradation de la cellule comme nous venons de le voir. (Kroemer, Galluzzi et al. 2007)

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque).

- Voie des récepteurs de mort (Voie extrinsèque)

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques, de type cytokines, sur des récepteurs de surface appelés récepteurs de mort. Ces

récepteurs de mort appartiennent à la superfamille des récepteurs du Tumor Necrosis Factor (TNFR) et incluent des récepteurs tels que le récepteur Fas, les récepteurs de TNF (TNFR-1, TNFR-2) et les récepteurs du TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) DR-4 et DR-5 (Ashkenazi 2002). La fixation d'un ligand sur un récepteur de mort induit son activation suite à sa trimérisation (Fig. 3A).

La signalisation du récepteur de mort activé est médiée par sa région cytoplasmique qui possède une séquence conservée appelée Death Domain (DD). L'activation du récepteur conduit au recrutement de protéines adaptatrices au niveau du DD. Ces protéines adaptatrices appelées Fas Associated Death Domain (FADD) ou TNF Receptor Associated Death Domain (TRADD) possèdent leur propre DD par lequel elles sont recrutées au niveau des récepteurs activés. Les protéines adaptatrices possèdent également un second domaine d'interaction protéique appelé Death Effector Domain (DED). Le domaine DED des protéines adaptatrices FADD ou TRADD interagit alors avec le domaine DED des caspases initiatrices, les pro-caspases-8 et -10. Ces caspases initiatrices sont sous forme de zymogène et sont recrutées par les protéines adaptatrices au niveau des récepteurs de mort. Le complexe ainsi formé est appelé Death Inducing Signaling Complex (DISC) (Boatright and Salvesen 2003) (Fig. 3A). La formation du DISC augmente la concentration locale des caspases et permet le rapprochement des pro-caspases initiatrices -8 et -10 qui sont alors en mesure de s'activer par auto-clivage (Salvesen and Dixit 1999). La caspase 8 activée déclenche la phase d'exécution par l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7. C'est principalement au niveau de la formation du DISC que la voie extrinsèque est régulée. En effet, il existe une isoforme de la caspase 8 appelée Flice-inhibitory protein (FLIP). La protéine FLIP contient 2 domaines DED mais pas de site catalytique. Elle agit en entrant en compétition avec les caspases-8 et -10 et en empêchant leur recrutement au niveau du DISC (Krueger, Baumann et al. 2001) (Fig3B). Une activation directe des caspases effectrices par les caspases -8 et -10 est décrite dans des types cellulaires particuliers tels que les thymocytes appelés cellules de type I (Scaffidi, Fulda et al. 1998; Ozoren and El-Deiry 2002). Dans les cellules de type I, l'activation de la voie extrinsèque conduit à l'exécution de l'apoptose sans intervention de la mitochondrie dans la signalisation apoptotique (Fig3B). Dans les autres types cellulaires, les cellules de type II, le signal provenant des récepteurs activés nécessite une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose pour déclencher la cascade d'activation des caspases (Fig3B). Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré, dans ces cellules, par une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) appelée Bid (BH3 interacting domain death agonist).

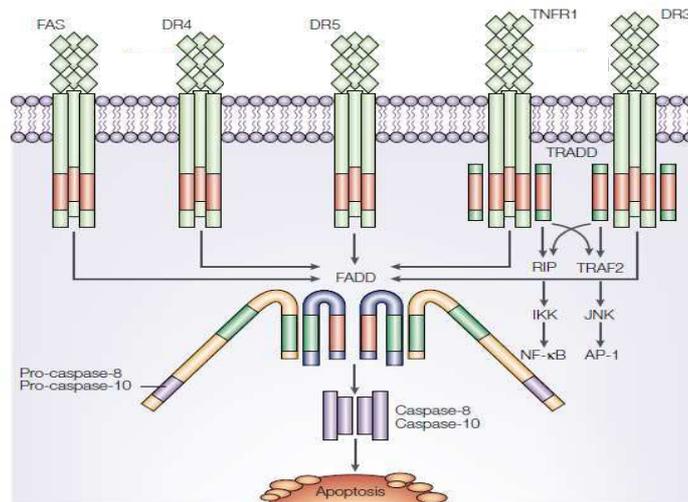
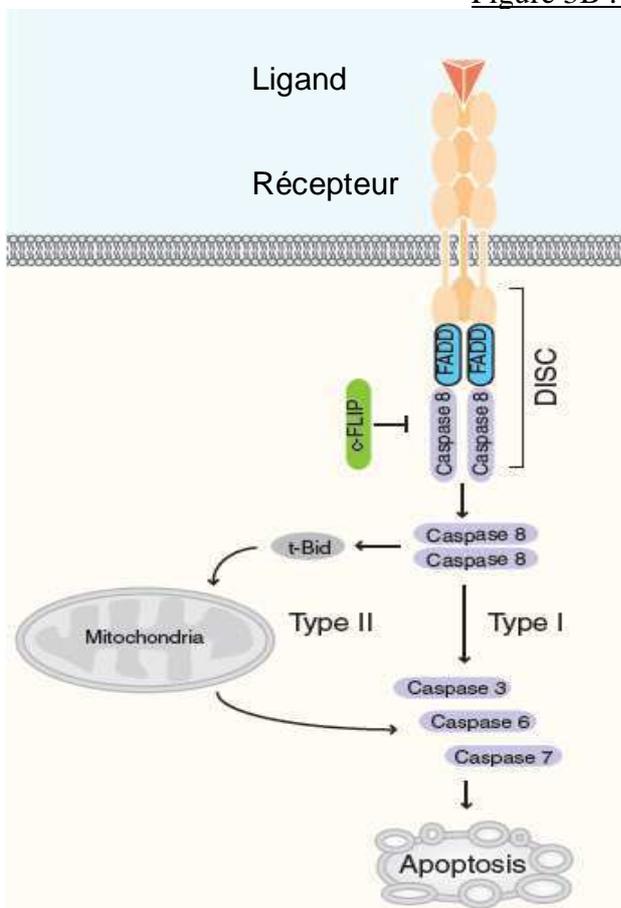


Figure 3A : La voie des récepteurs de mort

Après fixation de Fas ligand et TRAIL sur les récepteurs Fas, DR4 et DR5, le DISC (Death Inducing Signaling Complex) est formé via l'adaptateur FADD. Lors de la fixation du TNF sur TNFR1 et son homologue DR3, la formation du DISC est médiée par l'adaptateur TRADD. Les caspases-8 et 10 sont alors recrutées et auto-activées. D'autres complexes impliquent RIP (Receptor-interacting protein) et TRAF2 (TNFR-associated factor 2) pour activer les voies NF-κB et JNK. Les domaines de mort (DD) sont représentés en rouge et les Death Effector Domain (DED) en vert. (D'après Ashkenazi, Nat Rev Cancer, 2002)

Figure 3B : La signalisation en aval des récepteurs de mort



Suite à la fixation du ligand sur un récepteur de mort, le complexe DISC permet l'activation des caspases initiatrices -8 et -10. On note que la protéine c-FLIP peut entrer en compétition avec les pro-caspases. Dans les cellules de type I on a alors activation des caspases exécutrices -3, -6 et -7 qui mène à la mort de la cellule. Dans les cellules de type II la voie mitochondriale est déclenchée via le clivage de Bid en t-Bid. La cascade des caspases post-mitochondriales est activée et aboutit à la mort de la cellule. (D'après Wilson et al, Nat Immunol, 2009)

En effet, la caspase 8 activée clive Bid au niveau N-terminal de la protéine permettant l'exposition de son domaine BH3. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à Bax (BCL2-associated X protein) ou à d'autres protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 et induit l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Luo, Budihardjo et al. 1998).

- Voie mitochondriale (Voie intrinsèque)

La voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des altérations de l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseurs de tumeurs ou de protéines virales. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kroemer 2003). Au cours de l'apoptose mitochondriale, de l'eau et différents solutés pénètrent dans la mitochondrie provoquant son gonflement et l'altération de la membrane externe conduisant au relargage dans le cytosol de protéines mitochondriales localisées dans l'espace intermembranaire. L'altération de la membrane externe de la mitochondrie est généralement associée à une modification de la perméabilité de la membrane interne conduisant alors à des variations du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\psi_m$). Les protéines de l'espace intermembranaire relarguées dans le cytosol jouent un rôle central dans l'exécution du programme apoptotique de la voie mitochondriale (Saelens, Festjens et al. 2004).

Le déclenchement de la voie mitochondriale dépendante des caspases se fait après relargage du cytochrome *c* (cyt *c*) depuis la mitochondrie (Liu, Kim et al. 1996). Le cyt *c* est synthétisé sous forme de précurseur cytoplasmique qui est incapable de participer à l'induction de l'apoptose. Le précurseur est importé dans la mitochondrie où il subit une maturation. Le cyt *c* est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial où il exerce sa fonction physiologique de transporteur d'électrons entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Ravagnan, Roumier et al. 2002). Au cours de l'apoptose, seule une partie du cyt *c* serait relâchée dans le cytosol dans un premier temps, c'est-à-dire la fraction soluble de l'espace intermembranaire de la mitochondrie. La fraction de cyt *c* restant associée avec la membrane interne de la mitochondrie permettrait à la cellule de continuer à synthétiser de l'ATP, nécessaire à la réalisation de l'apoptose (Ott, Robertson et al. 2002; Lartigue, Medina et al. 2008). Le relargage du cyt *c* participe alors à l'activation de la cascade des caspases en activant une caspase initiateur, la caspase 9 (Fig. 4A et B). L'activation de la caspase 9 se fait au sein d'un complexe multiprotéique. Ce complexe appelé « Apoptosome » est constitué de cyt *c*, de protéines Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1), d'ATP et de procaspase 9 (Fig.4B).

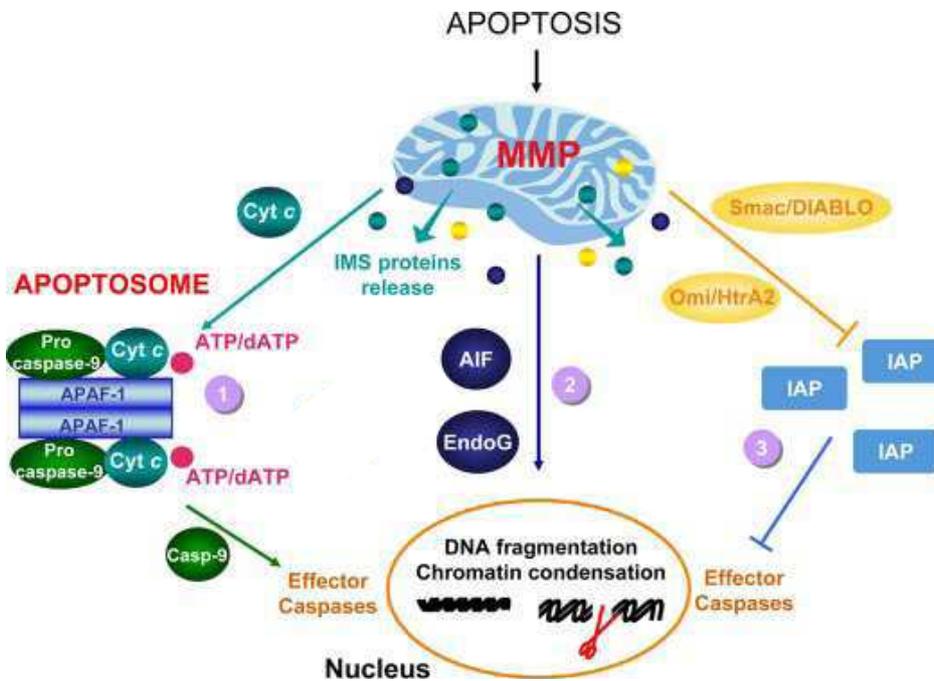


Figure 4A : La voie mitochondriale de l'apoptose

L'activation de la mitochondrie consécutive à divers stimuli va induire le relargage de facteurs apoptogènes hors de l'espace intermembranaire (IMS) responsable de l'activation de la voie des caspases (1) directement via la formation de l'apoptosome et (3) indirectement par l'inhibition des inhibiteurs de caspases (IAP). Une voie indépendante des caspases (2) permet aussi d'induire la fragmentation de l'ADN et l'exécution de l'apoptose.

(D'après Kroemer, Galluzzi & Brenner, *Physiol Rev.* 2007)

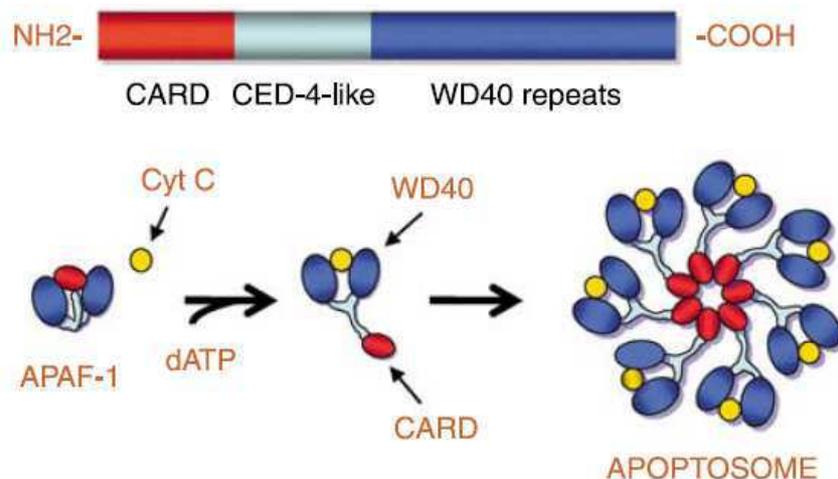


Figure 4B : L'assemblage de l'apoptosome

Suite à la fixation du *cyt c* sur le domaine homologue à CED-4 (CED-4-like, bleu clair) et de l'échange de l'ADP en ATP au domaine WD40 (bleu foncé) d'Apaf1. Un changement de conformation permet de recruter la caspase 9 au domaine CARD (rouge) d'Apaf-1. L'apoptosome est formé de 7 unités Apaf-1-*cyt c*.

(D'après Fadeel, Ottosson & Pervaiz, *CDD*, 2008)

La formation de l'apoptosome débute par la fixation du *cyt c* au niveau des motifs WD40 présents sur Apaf-1. Cette fixation induit un changement de conformation de Apaf-1 et expose son domaine CARD (Caspase Recruitment Domain) (Li, Nijhawan et al. 1997). Apaf-1 est toujours inactif jusqu'à la fixation de l'ATP qui permet la stabilisation de la nouvelle conformation et l'oligomérisation de sept unités Apaf-1/*cyt c*/ATP (Riedl and Salvesen 2007). Cette nouvelle conformation en heptamère autorise le recrutement de procaspase 9 via une interaction entre les domaines CARD des protéines Apaf-1 et les domaines CARD des procaspase 9 (Fig.4B) (Li, Nijhawan et al. 1997). L'apoptosome est alors formé et les monomères de caspase 9, du fait de leur proximité, peuvent s'activer par auto-clivage. L'apoptosome est désormais actif ce qui lui permet de recruter et d'activer les caspases effectrices -3 et -7.

Parmi les facteurs apoptogènes relargués hors de la mitochondrie au cours de l'activation de la voie mitochondriale caspase-dépendante se trouvent les protéines Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP Binding protein with Low pI) et Omi/HtrA2 (Fig.4A). Ces protéines sont en fait des inhibiteurs des IAPs (Inhibitor of Apoptosis) qui se lient au niveau des domaines BIR (Baculovirus IAP Repeat) des IAPs et inhibent ainsi leurs activités anti-apoptotiques (Verhagen, Ekert et al. 2000; Martins, Iaccarino et al. 2002). Nous décrirons les IAPs et leur rôle dans un paragraphe ultérieur.

D'autres facteurs apoptogènes sont relargués qui ne vont pas activer la cascade des caspases, mais une voie caspases-indépendante : AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et EndoG (Endonucléase G) (Fig.4A).

Le facteur AIF a été identifié et cloné il y a plusieurs années (Susin, Lorenzo et al. 1999). Le précurseur d'AIF (67 kDa) est synthétisé dans le cytoplasme puis importé dans la mitochondrie grâce à sa séquence de localisation mitochondriale (MLS) (Susin, Lorenzo et al. 1999; Otera, Ohsakaya et al. 2005). Une fois importé à la mitochondrie, la séquence MLS est excisée par une peptidase mitochondriale générant une protéine mature de 62kDa. AIF a d'abord été considéré comme une protéine soluble de l'espace inter-membranaire (Susin, Lorenzo et al. 1999). AIF est en fait enchassé dans la membrane interne de la mitochondrie via sa région N-terminale (Otera, Ohsakaya et al. 2005) où il exerce une activité NADH oxydase (Miramar, Costantini et al. 2001). Après activation de la voie intrinsèque impliquant une augmentation du calcium intracellulaire, AIF est clivé par la calpaïne-I (une protéase calcium dépendante) et peut ainsi s'exporter vers le cytosol, puis vers le noyau (Norberg, Gogvadze et al. 2008). Le transport vers le noyau pourrait se faire grâce à une séquence de localisation nucléaire (Modjtahedi, Giordanetto et al. 2006). Dans le noyau, l'AIF induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments

d'environ 50 kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité de séquence (Ye, Cande et al. 2002). De plus, l'AIF amplifierait sa propre libération une fois dans le cytosol (Susin, Lorenzo et al. 1999).

EndoG est une nucléase mitochondriale non-spécifique de 30 kDa très conservée chez les eucaryotes (Li, Luo et al. 2001). Elle est codée par un gène nucléaire et est importée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. L'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose conduit à la libération d'EndoG dans le cytosol puis à sa translocation dans le noyau. Elle digère l'ADN en l'absence d'activité caspase et en l'absence de la nucléase caspase-dépendante (van Loo, Schotte et al. 2001). EndoG pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire (Widlak, Li et al. 2001) mais elle peut également générer des fragments oligonucléosomiques (Samejima, Tone et al. 2001).

Nous reviendrons sur le rôle de la mitochondrie dans le paragraphe 3.

c) Apoptose et pathologies

Le dérèglement des mécanismes de régulation de la mort cellulaire apoptotique est impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies. Ces dérèglements peuvent conduire à un excès ou à un défaut d'apoptose et caractérisent différents types de pathologie.

L'excès d'apoptose intervient dans le développement d'anomalies congénitales du développement et de certaines maladies neurodégénératives chroniques comme l'amyotrophie spinale, la sclérose latérale amyotrophique, la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Thompson 1995). De même, un excès d'apoptose est à l'origine de certaines pathologies provoquées par des infections virales comme le SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) dans lequel le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) induit l'apoptose des lymphocytes T auxiliaires nécessaires pour activer les lymphocytes T cytotoxiques (Gougeon, Olivier et al. 1991; Petit, Arnoult et al. 2003). A l'inverse, un défaut d'apoptose a été observé dans le développement de maladies auto-immunes résultant de l'apparition de lymphocytes auto-réactifs qui n'ont pas été éliminés par apoptose au cours de la sélection clonale lymphocytaire (Straus, Sneller et al. 1999; Rieux-Laucat, Fischer et al. 2003). De même, un défaut ou un blocage dans l'exécution de l'apoptose ont pu être identifiés dans les pathologies virales, les syndromes lymphoprolifératifs et surtout dans de nombreux cas de cancers (Thompson 1995).

La cancérogenèse est un phénomène multi-étapes, ces étapes consistant en des altérations génétiques successives capables d'induire la transformation de cellules normales en cellules malignes. Ces cellules tumorales possèdent les caractéristiques suivantes : indépendance vis-

à-vis des facteurs de croissance, insensibilité envers les signaux inhibiteurs de croissance, potentiel répliatif illimité, angiogenèse, invasion ainsi qu'un échappement à la mort cellulaire apoptotique (Hanahan and Weinberg 2000). En effet, l'analyse moléculaire des mutations somatiques présentes dans les tumeurs a révélé que de nombreux gènes agissant sur les voies de signalisation et d'exécution de l'apoptose sont affectés par des mutations. La résistance des cellules tumorales à l'apoptose contribue à leur accumulation, leur potentiel métastatique, leur résistance aux agents cytotoxiques, et favorise ainsi la progression tumorale (el-Deiry 1997; Plati, Bucur et al. 2008).

L'apoptose semble un moyen sûr d'éliminer des cellules cancéreuses. Nous nous sommes ainsi intéressés à induire l'apoptose en nous attachant particulièrement à l'étude de la voie mitochondriale. Cependant, l'intérêt pour la nécrose a été relancé récemment et l'une des molécules que j'ai utilisées induit une mort cellulaire aux caractéristiques nécrotiques. Nous allons ainsi considérer la nécrose et son utilisation potentielle en thérapie.

2. La nécrose

La nécrose a longtemps été caractérisée par l'absence des modifications cellulaires caractéristiques de l'apoptose ou de l'autophagie. Elle est considérée comme une mort incontrôlée et non souhaitable car la nécrose déclenche une réponse immunitaire inflammatoire. Cependant de récentes études révèlent l'existence d'une nécrose induite physiologique dont les dérégulations sont pathologiques. De plus, la nécrose peut être déclenchée et constituerait un moyen efficace d'éliminer des cellules tumorales *in vivo*.

a) Les caractéristiques de la nécrose

La nécrose est caractérisée par une augmentation du volume de la cellule (oncosis), un gonflement des organelles et une rupture précoce de la membrane plasmique avec perte du contenu intracellulaire (Kroemer, Galluzzi et al. 2009) (cf Fig.1). Le processus nécrotique est mis en évidence en mesurant plusieurs paramètres caractéristiques tels que la perméabilisation des membranes plasmiques et la déplétion en ATP. Les cellules en cours de nécrose voient leur $\Delta\psi_m$ chuter et leurs membranes mitochondriales se perméabiliser comme les cellules en apoptose. Une différence importante avec l'apoptose, outre les changements morphologiques, est l'absence d'activation de la cascade des caspases, la mort par nécrose faisant généralement suite à un traumatisme comme un stress mécanique, chimique ou des températures extrêmes. La nécrose intervient lors de phénomènes d'ischémie/reperfusion et notamment au cours de greffes hépatiques (Jaeschke and Lemasters 2003).

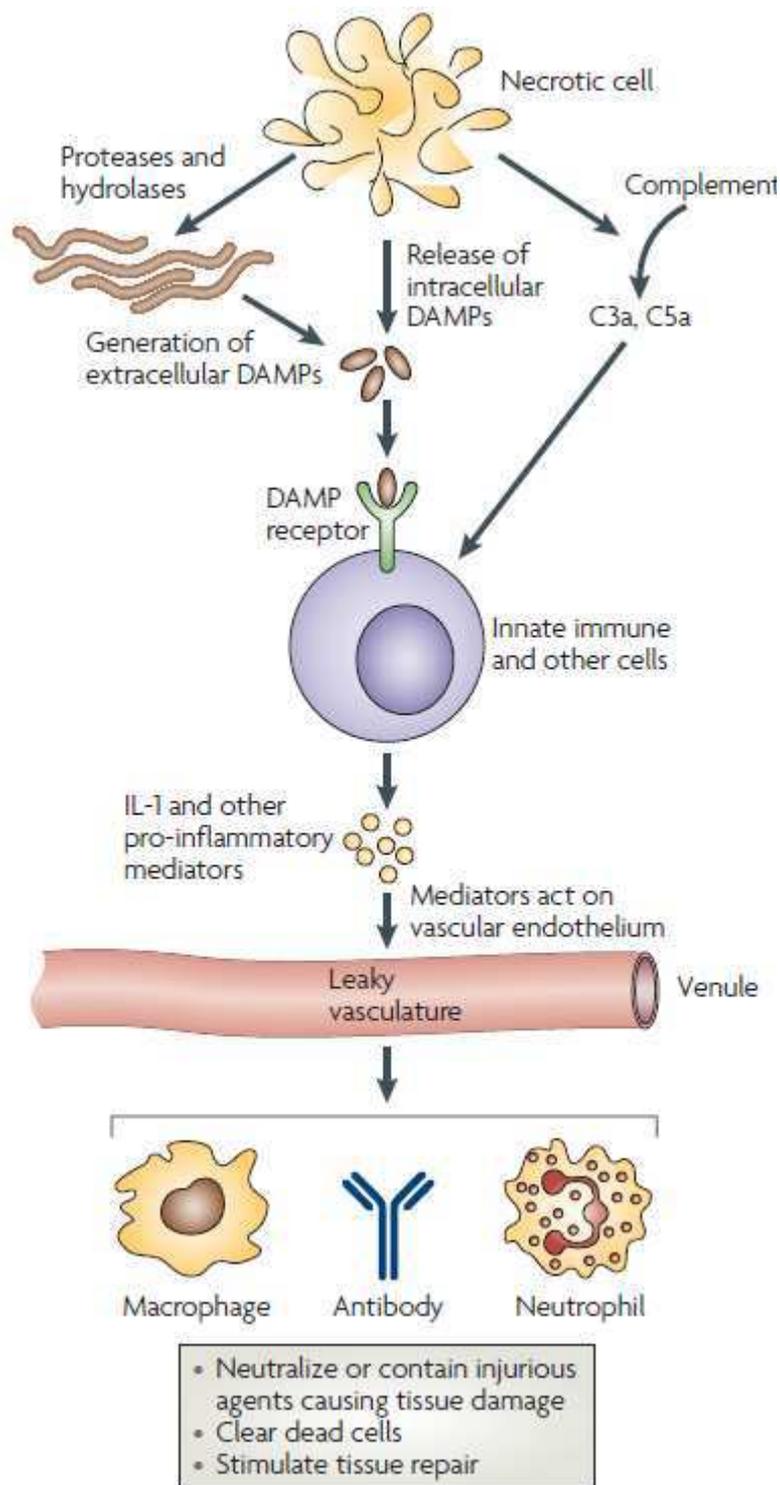


Figure 5 : Nécrose et déclenchement de l'inflammation

Les cellules nécrotiques activent le complément et relarguent des protéases et des DAMPs (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns). Les DAMPs sont repérés par les cellules de l'immunité innée résidentes du tissu qui vont déclencher une réponse inflammatoire. Les cellules immunitaires circulantes et les anticorps solubles vont, par la circulation, atteindre les cellules nécrotiques, neutraliser les dommages tissulaires, phagocyter les cellules mortes et stimuler la réparation des tissus. (D'après Kono & Rock, Nat Rev Immunol, 2008)

A ce caractère de mort accidentelle s'ajoute le déclenchement d'une réponse immunitaire inflammatoire. En effet, la perméabilisation de la membrane plasmique suivie de la lyse de la cellule en nécrose va permettre le relargage de molécules intracellulaires : les DAMPs (Damage/Danger-Associated Molecular Patterns) (Poon, Hulett et al. 2010) (Fig.5). Ces DAMPs comme la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1) vont se lier à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques). Ces cellules vont alors sécréter des cytokines pro-inflammatoires (TNF, Interleukines (IL)-1, IL-6 et IL-8) responsables de la maturation des cellules dendritiques, de l'activation de l'immunité adaptative et de l'angiogenèse (qui va permettre la cicatrisation) (Fig.5) (Raucci, Palumbo et al. 2007). Les cellules nécrotiques provoquent donc une réponse pro- inflammatoire alors que les cellules en apoptose produisent, en général, des cytokines anti-inflammatoires. Or les cellules en apoptose tardive (aussi appelée nécrose secondaire) présentent une perméabilisation de la membrane plasmique. Ces cellules, comme les cellules nécrotiques, vont déclencher une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et une réponse immunitaire. Certaines études ont cependant mis en évidence l'induction d'une réponse immunitaire inflammatoire en présence de cellules apoptotiques précoces (c'est-à-dire avec des membranes cytoplasmiques intactes) traitées par un agent chimiothérapeutique ou des rayons UV (Coutant, Perrin-Cocon et al. 2002; Lauber, Bohn et al. 2003; Elward, Griffiths et al. 2005; Olofsson, Andersson et al. 2008). L'apoptose serait donc, comme la nécrose, susceptible de déclencher une inflammation *in vivo*. Il est intéressant de se demander si la nécrose n'est pas une mort tout autant souhaitable que l'apoptose, notamment dans les traitements chimiothérapeutiques visant l'élimination de cellules tumorales.

b) La nécrose induite

Plusieurs informations mettent en évidence une programmation du déclenchement et du déroulement du processus nécrotique (Golstein and Kroemer 2007). Tout d'abord, la nécrose intervient au cours du développement pour induire la mort cellulaire des chondrocytes et contrôler ainsi la croissance des os (Roach and Clarke 2000). La nécrose est impliquée dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte et notamment au niveau de l'épithélium intestinal (Barkla and Gibson 1999).

De nombreuses études décrivent la nécrose comme une mort cellulaire par défaut. En effet, l'inhibition d'événements essentiels au déroulement des processus apoptotiques et/ou autophagiques, résulte en l'induction d'une mort cellulaire nécrotique. Selon les modèles utilisés il faut inhiber simultanément des protéines intervenant dans la perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM) et des protéines essentielles au déroulement de

l'autophagie (Shimizu, Kanaseki et al. 2004) ou bien inhiber uniquement l'activité des caspases (utilisation du z-VAD, inhibiteur global des caspases) (Chautan, Chazal et al. 1999) pour induire la nécrose. Il est intéressant de noter que ce dernier exemple se réfère à la suppression par nécrose des tissus interdigitaux pendant le développement en présence de z-VAD avec la même structuration spatio-temporelle que l'apoptose. Une déplétion en ATP peut également favoriser un basculement vers une mort nécrotique car l'ATP est nécessaire à l'activation de la cascade des caspases (Leist, Single et al. 1997). La présence d'une voie nécrotique lors de la suppression des voies apoptotiques et autophagiques reflète son émergence potentiellement antérieure au cours de l'évolution comme voie ancestrale de mort cellulaire chez les eucaryotes (Golstein and Kroemer 2005).

Les études portant sur une signalisation spécifique de la nécrose ont été principalement réalisées dans les modèles cellulaires L929 (lignée de fibrosarcome de souris) et Jurkat (lignée leucémique lymphoblastique T humaine). Elles ont permis de faire émerger le concept de « nécroptose », c'est-à-dire une mort cellulaire programmée avec les caractéristiques morphologiques nécrotiques et l'intervention de constituants de la voie apoptotique des récepteurs de mort (Fig.6) (Degterev, Huang et al. 2005; Hitomi, Christofferson et al. 2008). En effet, la nécroptose est induite par la fixation des ligands TNF- α , TRAIL et FasL sur les récepteurs de morts. L'équipe du Pr. Junying Yuan, qui a découvert la nécroptose, a également mis en évidence le rôle central de la kinase RIP1 (Receptor-interacting protein 1) grâce à un criblage de molécules capables d'inhiber la nécroptose : les nécrostatines (Nec). La nécrostatine-1 (Nec-1) et aussi les Nec-3 et 5 sont des inhibiteurs de la kinase RIP1 (Degterev, Hitomi et al. 2008). D'autres équipes ont révélé l'intervention de la kinase RIP3 dans la voie nécroptotique (Cho, Challa et al. 2009; He, Wang et al. 2009; Zhang, Shao et al. 2009). Ces deux kinases sont activées par phosphorylation en aval des récepteurs de mort et vont interagir au sein d'un complexe multi-protéique. Ce complexe diffère du complexe DISC, activé dans la voie apoptotique extrinsèque, car il fait intervenir un partenaire supplémentaire: RIP3 (Fig.6). FADD et caspase 8 sont présents dans ce complexe, mais leur rôle dans la voie d'induction de la nécroptose n'est pas connu pour l'instant (Cho, Challa et al. 2009). Les intervenants situés plus en aval dans la signalisation nécroptotique ne sont pas encore clairement identifiés. Les espèces activées de l'oxygène (EAO) jouent un rôle (Lin, Choksi et al. 2004), mais l'importance de leur rôle semble varier selon les lignées testées. La mitochondrie est altérée lors d'une mort cellulaire nécrotique, mais son rôle est peu décrit dans l'exécution du processus de nécroptose (Xu, Huang et al. 2006).

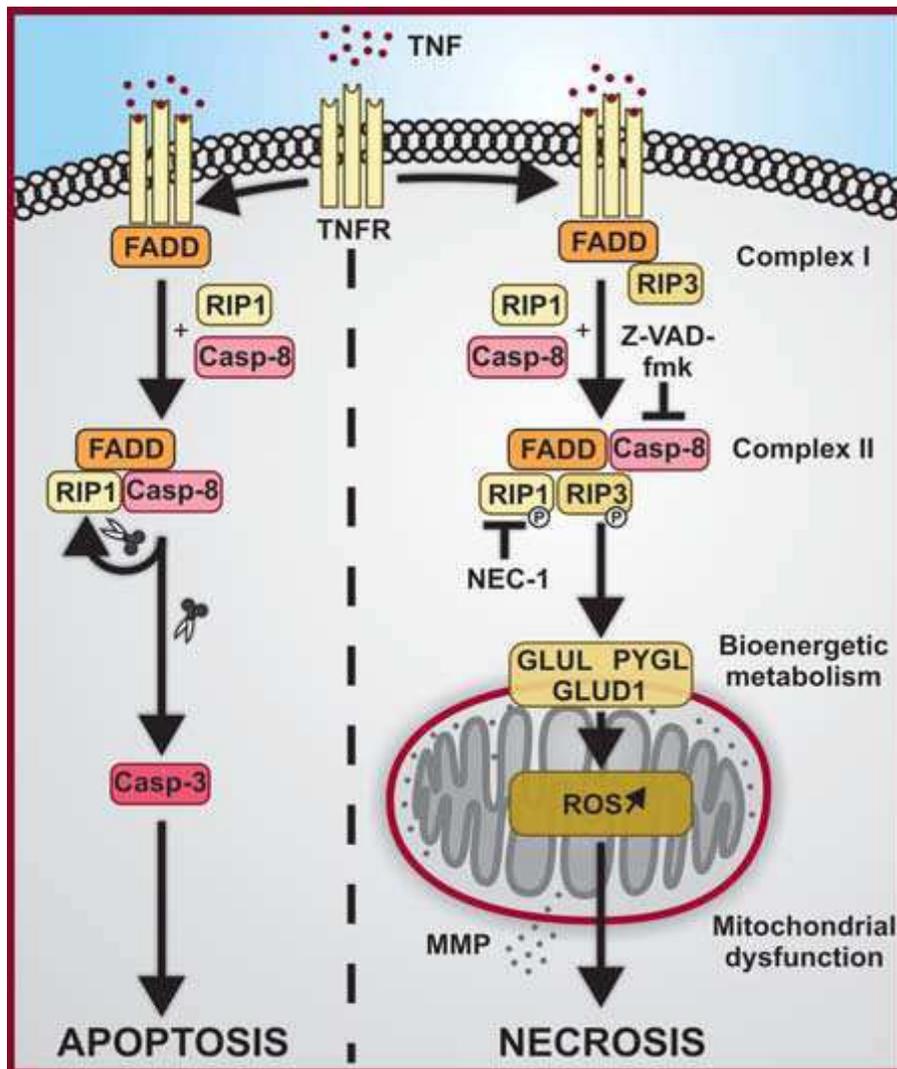


Figure 6 : La signalisation de la nécrose programmée

La signalisation actuellement connue pour l'exécution de la nécrose programmée a de nombreuses caractéristiques communes avec la voie extrinsèque de l'apoptose. En aval du TNFR il y a formation d'un complexe multi-protéique impliquant FADD, RIP1, RIP3 et la caspase 8. RIP3 peut ensuite interagir avec des enzymes métaboliques (GUL1, PYGL et GLUD1) et augmenter leur activité catalytique produisant ainsi plus de substrats pour la chaîne respiratoire. Cela mène à une surproduction d'EAO (espèces activées de l'oxygène) mitochondriales qui vont induire la PMM et la mort de la cellule.

(D'après Galluzzi, Kepp & Kroemer, J Mol Cell Biol, 2009)

La nécroptose est un type de mort cellulaire qui a été récemment impliqué dans la survenue de maladies neurodégénératives (Lin and Beal 2006) et dans la défense de l'organisme contre les infections virales (Cho, Challa et al. 2009). Il s'agit donc d'un processus physiologique important dont il sera intéressant d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires. L'étude de la nécroptose permet de mettre en avant l'intérêt de la nécrose en physiologie et également dans l'induction de la mort cellulaire en chimiothérapie.

Apoptose et nécrose sont deux types de mort intéressants dans le but d'éliminer des cellules tumorales. Toutes deux ont en commun des événements mitochondriaux lors de l'induction de la mort cellulaire par des molécules que nous étudierons ci-dessous.

3. La mitochondrie

a) Le rôle physiologique de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite cellulaire majeur constitué d'une membrane externe, d'un espace intermembranaire, d'une membrane interne et d'une matrice. La mitochondrie joue un rôle primordial dans la physiologie de la cellule en générant l'énergie nécessaire à toutes les réactions biochimiques de la cellule. Cette énergie dérive de la production d'ATP par phosphorylation oxydative au sein de la chaîne respiratoire. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire et crée ainsi un $\Delta\psi_m$. Le retour des protons dans la matrice ne peut se produire qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthétase. L'ATP formé est ensuite transporté par l'adénine nucléotide translocase (ANT) dans l'espace intermembranaire en échange d'une molécule d'ADP. Puis l'ATP passe dans le cytosol au travers de canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC).

b) Le rôle de la mitochondrie dans la mort cellulaire

En dehors de son rôle métabolique, il est apparu depuis une dizaine d'années que la mitochondrie joue un rôle clé dans l'apoptose (Brenner and Kroemer 2000; Kroemer and Reed 2000). Ce rôle ne se limite pas à une simple perte de fonction qui priverait la cellule d'énergie, mais la mitochondrie participe à l'intégration et à la propagation des signaux de mort activés par des facteurs endogènes et exogènes. De façon générale, la voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress (rayonnements UV ou γ , dommages à l'ADN, déprivation en facteurs de survie et augmentation du calcium (Ca^{2+}) ou des EAO), l'action d'oncoprotéines, de protéines virales ou des agents chimiothérapeutiques

(Decaudin, Marzo et al. 1998; Mates and Sanchez-Jimenez 2000; Ravagnan, Roumier et al. 2002; Kroemer 2003; Deniaud, Brenner et al. 2004; Knudson and Brown 2008). Le Ca^{2+} et les EAO sont également des signaux inducteurs de la voie mitochondriale lors de la nécrose (Zamzami, Larochette et al. 2005). L'intégration de ces différents stimuli par la mitochondrie va aboutir à une perméabilisation membranaire associée à une chute du $\Delta\psi_m$.

Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer l'origine des perturbations membranaires conduisant au relargage des protéines de l'espace intermembranaire ont été décrites. Elles impliquent la rupture de la membrane externe mitochondriale ou bien la formation de canaux affectant les membranes externe et interne (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).

c) La perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM)

- Perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MEM)

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie permet d'expliquer le relargage des protéines apoptogènes de l'espace intermembranaire. Ce phénomène implique des protéines de la famille Bcl-2 (Fig.7) : Bax et Bak. Les membres de la famille Bcl-2 possèdent des séquences hautement conservées appelées domaines BH (pour Bcl-2 homology) (Adams and Cory 1998). Les membres anti-apoptotiques (ex : Bcl-2, Bcl-X_L) possèdent 4 domaines BH (BH1, 2, 3 et 4), les membres pro-apoptotiques à multi-domaines (ex : Bax, Bak) possèdent 3 domaines BH (BH1, 2 et 3) (Fig.7). Il existe également des membres pro-apoptotiques avec un seul domaine BH : les « BH3-only » (ex : Bid, Bad) (Fig.7). Certaines protéines de la famille Bcl-2 présentent dans leur séquence un domaine transmembranaire en C-terminal qui leur permet de s'insérer dans la MEM. C'est le cas de Bak qui, en condition normale, se localise dans la MEM. Bax, quant à lui, se trouve dans le cytosol en l'absence de stimulus apoptotique. Lors de l'induction de l'apoptose, Bax est relocalisé à la MEM et s'associe à Bak pour former des pores membranaires (Fig.8A) (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). L'oligomérisation de Bax et Bak est facilitée par l'action de certains BH3-only comme t-Bid et Bim (Korsmeyer, Wei et al. 2000; Letai, Bassik et al. 2002). Dans de nombreux modèles d'induction de l'apoptose, les protéines Bax et Bak sont indispensables à la PMM (Wei, Zong et al. 2001). Cependant la formation de pores Bax/Bak est controversée. Une autre explication pour la PMM et la sortie des molécules apoptogènes consisterait en une déstabilisation de la bicouche lipidique que forme la MEM par les protéines Bax et Bak (Fig.8A) (Basanez, Sharpe et al. 2002). Certaines études ont montré que Bax est capable d'interagir avec les membres du PTP (Pore de transition de perméabilité) ANT et VDAC à l'aide de protéines recombinantes (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).

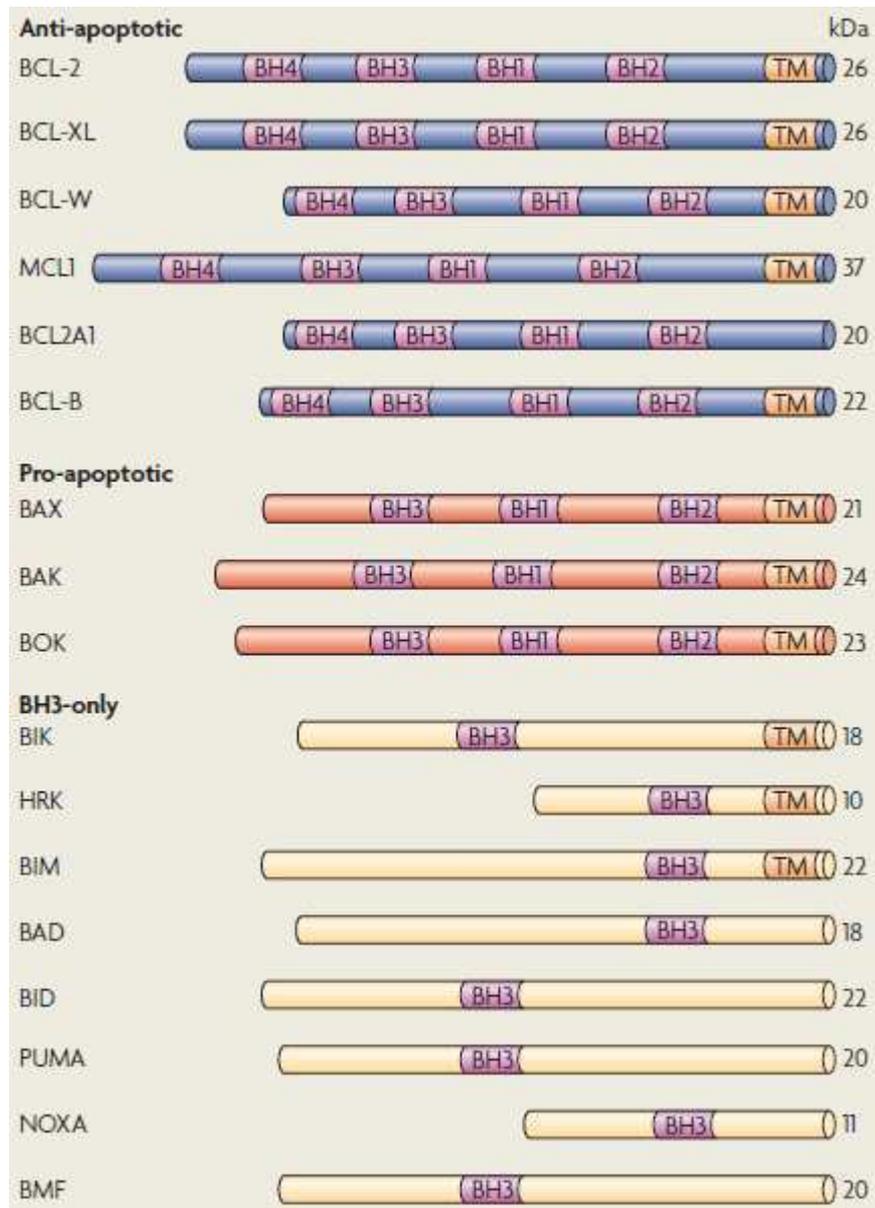


Figure 7 : Les protéines de la famille Bcl-2

Chez les mammifères, les membres de la famille Bcl-2 sont divisés en trois groupes. Les anti-apoptotiques (bleu) contiennent quatre domaines BH (violet) et possèdent presque tous un domaine transmembranaire (TM, en orange). Les pro-apoptotiques (rouge) n'ont pas de domaine BH4 et s'associent à la membrane externe mitochondriale par leur domaine TM. Les « BH3-only » (jaune) regroupent des protéines pro-apoptotiques qui ne présentent qu'un domaine BH3. (D'après Taylor, Cullen & Martin, Nat Rev Mol Cell Biol, 2008)

Cependant, les expériences en liposomes et mitochondries isolées montrent que Bax peut induire une PMM et une sortie de cyt *c* indépendante des composants du PTP (Eskes, Antonsson et al. 1998). L'action de Bax peut donc être PTP dépendante ou indépendante, ces deux possibilités étant non exclusives. La porine VDAC (hors du PTP) a également un rôle dans la perméabilisation des MEM. En effet, le blocage de VDAC à l'aide d'un anticorps spécifique empêche le relargage de cyt *c* Bax- dépendant (Shimizu, Matsuoka et al. 2001). De plus, Bax et Bak induisent l'ouverture de VDAC en protéoliposomes. Ce rôle pro-apoptotique de VDAC serait assuré par l'isoforme VDAC1. Il a ainsi été montré qu'une surexpression de VDAC1 suffit à induire l'apoptose dans divers types cellulaires (Zaid, Abu-Hamad et al. 2005). VDAC1 assurerait ce rôle pro-apoptotique en servant de récepteur pour Bax à la MEM (Fig.8A) (Pastorino, Shulga et al. 2002).

- Perméabilisation de la membrane interne mitochondriale (MIM)

Deux mécanismes sont susceptibles de coexister ; un processus Bax/Bak-dépendant qui implique la perméabilisation de la MEM et un processus PTP-dépendant qui implique une perméabilisation de la MIM. Ces deux mécanismes aboutissant au final à la perméabilisation des deux membranes mitochondriales et à la chute du $\Delta\Psi_m$. Le PTP est responsable du phénomène de transition de perméabilité qui a été décrit comme la perméabilisation de la MIM aux solutés de masse moléculaire inférieure à 1,5 kDa. Il a été identifié par Zoratti et Szabo en 1992 par des expériences d'électrophysiologie (Szabo and Zoratti 1992). Ce PTP est un canal non sélectif de « haute conductance » pouvant être formé par des protéines transmembranaires résidant au niveau de la membrane interne et au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Crompton 1999). Les différentes études réalisées ont permis de définir une composition minimale du PTP constitué par l'association de l'ANT, de VDAC et de la cyclophiline D, une protéine de la matrice (Fig.8B) (Szabo, De Pinto et al. 1993; Szabo and Zoratti 1993; Zoratti and Szabo 1995; Crompton, Virji et al. 1998). L'ouverture du pore peut être induite par différents effecteurs physiologiques comme le calcium, la protéine Bax et également par des inducteurs de mort (Crompton 1999).

L'ouverture du pore augmente la perméabilité de la membrane interne mitochondriale vis-à-vis de protéines de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. Ceci entraîne une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, un déséquilibre chimique entre le cytoplasme et la matrice mitochondriale, ainsi qu'un découplage de la phosphorylation oxydative, provoquant alors un gonflement osmotique pouvant conduire à la rupture de la membrane externe (car la MIM a une surface plus grande que la MEM) (Marzo, Brenner et al. 1998; Marzo, Brenner et al. 1998).

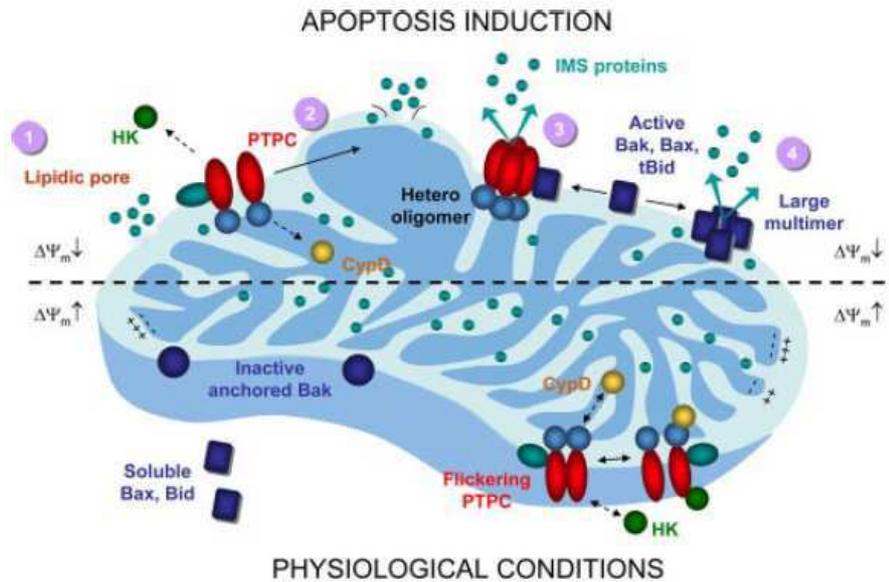


Figure 8A : Mécanismes d'induction de la PMM

En conditions physiologiques, le potentiel transmembranaire ($\Delta\psi_m$) est élevé, les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid...) sont dans leur état inactif et le PTP s'ouvre et se ferme permettant ainsi les échanges de métabolites entre le cytosol et la matrice. La PMM induit le relargage des protéines apoptogènes intermembranaires, la chute du $\Delta\psi_m$ et conduit à la mort de la cellule. La PMM s'explique par : (1) la formation de pores suite à la déstabilisation des lipides de la MEM, (2) l'ouverture prolongée du PTP conduisant au gonflement matriciel et à la rupture de la MEM, la formation de pores (3) par l'association de protéines pro-apoptotiques avec des membres du PTP (exemple : pores Bax/VDAC), (4) par l'association de protéines pro-apoptotiques entre elles (exemple : pores Bax/Bak).

(D'après Kroemer, Galluzzi & Brenner, *Physiol Rev.* 2007)

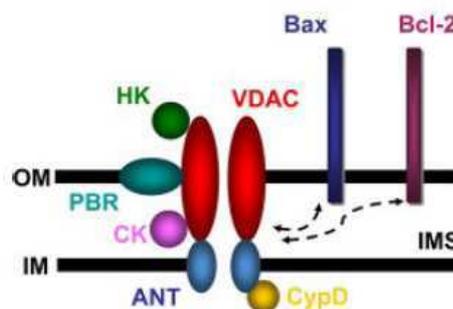


Figure 8B : Le pore de transition de perméabilité (PTP)

De nombreuses études posent l'hypothèse d'une constitution minimale impliquant VDAC, ANT et CypD. Les protéines créatine kinase (CK), hexokinase (HK) et peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) s'associent au PTP selon le tissu et le type cellulaire. Les protéines Bcl-2 et Bax régulent l'ouverture du PTP. (D'après Kroemer, *Physiol Rev.* 2007)

d) Cibler la mitochondrie et ANT dans les cancers

L'une des caractéristiques du cancer étant le développement d'un défaut des voies de signalisation apoptotiques (Hanahan and Weinberg 2000), de nombreuses thérapies ont pour but d'induire l'apoptose pour éliminer les cellules cancéreuses (Galluzzi, Larochette et al. 2006; Fulda, Galluzzi et al. 2010). La majorité des voies de signalisation converge vers la mitochondrie pour déclencher une perméabilisation de ses membranes, faisant de la mitochondrie une cible de choix dans les traitements anti-cancéreux (Brenner and Kroemer 2000 ; Fulda, Galluzzi et al. 2010). En effet, cibler la mitochondrie en stimulant la PMM est une stratégie qui permet d'amener à l'apoptose des cellules tumorales (Galluzzi, Larochette et al. 2006; Ralph and Neuzil 2009).

ANT (Adenine nucleotide translocase), protéine majeure de la MIM, est un régulateur important de la PMM dépendante du PTP (Belzacq, Vieira et al. 2002; Halestrap and Brenner 2003). De plus, ANT peut basculer d'une fonction vitale (translocation ATP/ADP) à un rôle létal (formation d'un pore) ce qui lui confère un rôle central dans la PMM (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Chez l'Homme, il existe quatre isoformes d'ANT codées par quatre gènes homologues ANT1, 2, 3 et 4 (68 à 88% d'homologie) (Marzo, Brenner et al. 1998; Marzo, Brenner et al. 1998). L'expression des isoformes d'ANT dépend du type de tissu et du statut physiopathologique suggérant qu'elles peuvent réguler différemment la PMM au cours de l'apoptose (Doerner, Pauschinger et al. 1997). Chez la souris, qui ne possède que deux isoformes d'ANT (ANT1 et 2), une étude par invalidation des deux isoformes dans le foie conclut que l'ANT est dispensable à la PMM PTP-dépendante déclenchée par différents inducteurs (Fas, TNF- α , le ionophore calcique A23187) (Kokoszka, Waymire et al. 2004). Cependant, la situation semble plus complexe chez l'Homme et plus particulièrement dans les cellules cancéreuses humaines. Les isoformes ANT1 et ANT3 participent à la formation de pores létaux conduisant à une apoptose mitochondriale (Bauer, Schubert et al. 1999; Zamora, Granell et al. 2004). Ces isoformes pro-apoptotiques d'ANT sont capables d'interagir avec diverses protéines pour former des pores létaux qui interviennent dans la signalisation apoptotique suite au traitement par des molécules chimiothérapeutiques et qui permettent même la régression tumorale *in vivo* (Bauer, Schubert et al. 1999; Zamora, Granell et al. 2004; Zamzami, Larochette et al. 2005; Jang, Choi et al. 2008). ANT2 est la seule isoforme surexprimée dans des tissus présentant un taux de prolifération élevé et capables de régénération comme le foie, les lymphocytes (Doerner, Pauschinger et al. 1997; Giraud, Bonod-Bidaud et al. 1998), certaines lignées cellulaires cancéreuses et également dans des tissus tumoraux (Lunardi and Attardi 1991; Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). Cette

isoforme a été décrite pour présenter un rôle anti-apoptotique et son extinction par ARN interférence mène à une augmentation de la mort cellulaire induite par des agents chimiothérapeutiques (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). L'extinction d'ANT2 est également capable de contrecarrer l'effet anti-apoptotique associé à la surexpression de la protéine Bcl-2 dans des cellules HeLa et cela, même après un traitement par une molécule ciblant le PTP (la Lonidamine, voir (Ravagnan, Marzo et al. 1999)) (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). Il semblerait donc intéressant d'induire une diminution de l'expression d'ANT2 afin de sensibiliser des cellules tumorales à la chimiothérapie (Belzacq, Vieira et al. 2003; Sharaf El Dein, Mayola et al. 2011). L'isoforme ANT4 récemment identifiée (Dolce, Scarcia et al. 2005), est exprimée au niveau du foie, du cerveau et des testicules. Cette isoforme a été peu étudiée et j'ai pu prendre part à la caractérisation de son rôle dans des cellules cancéreuses (Gallerne, Touat et al. 2010). Avant cette étude, le rôle d'ANT4 dans la mort cellulaire n'était pas connu. Par une surexpression stable d'ANT4 dans des lignées cancéreuses (HeLa et Hct), nous avons pu mettre en évidence l'effet anti-apoptotique de l'isoforme ANT4 après traitement ciblant le PTP (Lonidamine, voir (Ravagnan, Marzo et al. 1999)) et la voie des MAP kinases (Staurosporine, voir (Beyaert, Vanhaesebroeck et al. 1993)).

ANT présente, chez l'Homme, un rôle central dans la transition de perméabilité mitochondriale et l'induction de la mort cellulaire. Ses isoformes ANT2 et 4 inhibent l'apoptose tandis que ANT1 et 3 induisent l'apoptose et cela sur des cellules cancéreuses traitées. Ajouté au fait que l'expression d'ANT2 est augmentée dans des tissus tumoraux, le potentiel d'ANT et surtout d'ANT2 comme cible thérapeutique semble une piste à explorer. L'intérêt de cibler ANT2 en chimiothérapie est débattu dans une récente revue à laquelle j'ai collaboré (Sharaf El Dein, Mayola et al. 2011). En effet, il serait intéressant de développer des molécules capables de cibler cette isoforme afin de contourner la résistance à la PMM qui peut apparaître après chimiothérapie.

II- Développement de tolérances et résistance tumorale

1. La tolérance au stress oxydant

a) Les espèces activées de l'oxygène (EAO)

Les espèces activées de l'oxygène (EAO) sont des radicaux libres, neutres ou chargées, qui est instable en raison de la présence d'un électron non-apparié sur sa couche externe (Gutteridge 1994). L'instabilité des radicaux libres les rend très réactifs avec d'autres molécules environnantes. Les réactions de transfert d'électrons qu'ils produisent (réactions

d'oxydoréduction ou réactions redox) conduisent souvent à la formation d'un nouveau radical, ce phénomène pouvant se propager par des réactions en chaîne. Les réductions mono-électroniques successives de l'oxygène donnent naissance à différentes EAO : l'anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$). Au sein de la cellule, tous les processus utilisant de l'oxygène dans les différents compartiments subcellulaires sont capables de produire des EAO. (Carriere, Galinier et al. 2006) Dans les cellules, les effets des EAO varient beaucoup en fonction de la nature chimique, du niveau de production ou encore du site subcellulaire producteur d'EAO. En effet, il a été décrit qu' $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $\cdot OH$ ont des demi-vies et des réactivités très différentes et des études chez la levure montrent que les réponses cellulaires dépendent spécifiquement de la nature de l'agent oxydant utilisé (Higgins, Alic et al. 2002; Thorpe, Fong et al. 2004). Cela signifie que des oxydants différents mettent en jeu des fonctions cellulaires spécifiques à chacun et engendrent des réponses cellulaires différentes, soulignant la grande complexité du système redox à l'échelle cellulaire. L'existence de nombreuses sources de production d'EAO dans la cellule ajoute un niveau supplémentaire de complexité. La mitochondrie représente le site majeur de production cellulaire d'EAO (80% de $O_2^{\cdot-}$). Au niveau de la MIM, les électrons sont transférés le long de la chaîne respiratoire au cours de réactions d'oxydoréduction jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H_2O . L'énergie ainsi libérée (sous forme d'un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne) est alors utilisée par l'ATP synthétase pour synthétiser l'ATP (Mitchell and Moyle 1967). Une proportion significative de l'oxygène (2 % à 6 %) échappe à la réduction complète en H_2O et subit une réduction mono-électronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire pour donner naissance à $O_2^{\cdot-}$ (Fig.9A) (Turrens 2003). Cette production est absolument indissociable du processus respiratoire. Les EAO sont également produits par des complexes NADPH oxydases (NOXs). La famille des NOXs est constituée par les NOX1 à 5 ainsi que DUOX1 et 2 (Fig.9B). Ces complexes transfèrent des électrons au travers de membranes (cytoplasmique principalement mais aussi mitochondriale et du réticulum) avec l'oxygène comme accepteur d'électrons et la génération d' $O_2^{\cdot-}$ (Bedard and Krause 2007). Afin de limiter la concentration en EAO, plusieurs systèmes antioxydants, localisés en différents sites, prennent en charge $O_2^{\cdot-}$ et ses dérivés (Gutteridge 1994; Gutteridge and Halliwell 2000). En effet, les cellules sont équipées de systèmes antioxydants qui agissent de différentes façons. Ils inhibent la formation des EAO (la séquestration des métaux de transition empêche la réaction de Fenton et la production de $\cdot OH$), les métabolisent grâce à des enzymes (superoxyde dismutase (SOD), catalase et glutathion peroxydase) ou à des piègeurs de radicaux libres (glutathion, vitamine C, vitamine E, coenzyme Q).

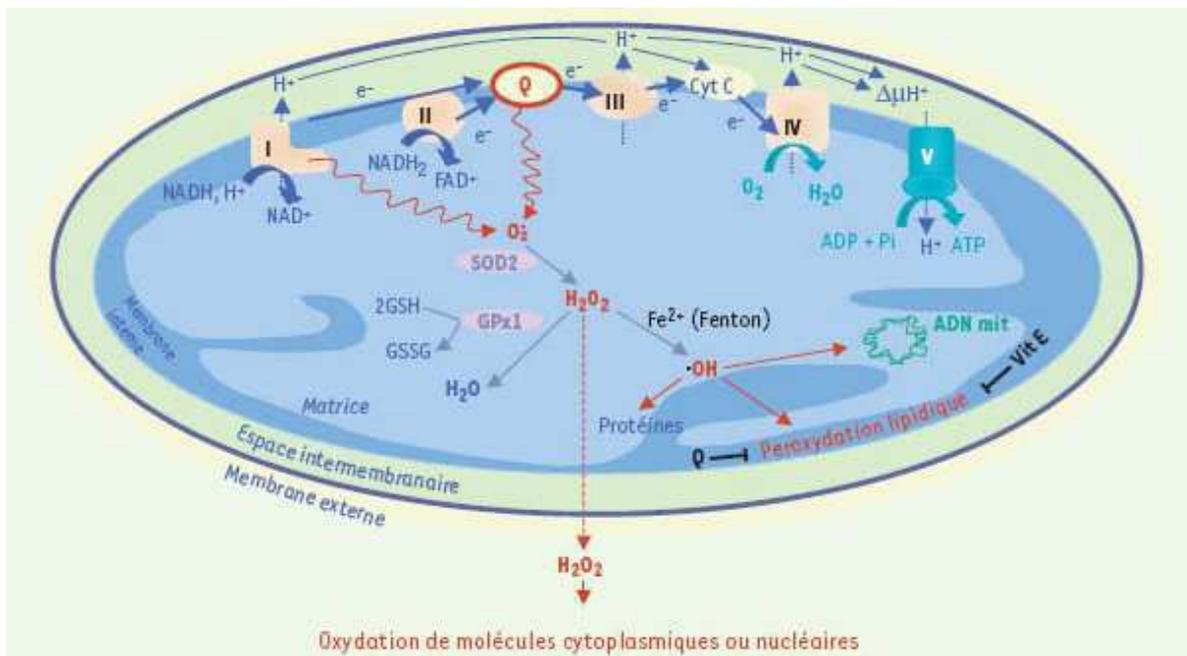


Figure 9A : Production des EAO mitochondriaux

La fuite d'e⁻ induit la production d'O₂⁻ par le complexe I et le coenzyme Q. O₂⁻ est métabolisé par la SOD mitochondriale (SOD2 ou MnSOD) en H₂O₂. H₂O₂ est décomposé en H₂O par la glutathion peroxydase, en ·OH par le Fe²⁺, ou bien il diffuse dans le cytoplasme. Le ·OH oxyde les protéines, l'ADN ou induit la peroxydation lipidique. (D'après Carrière et al, M/S, 2006)

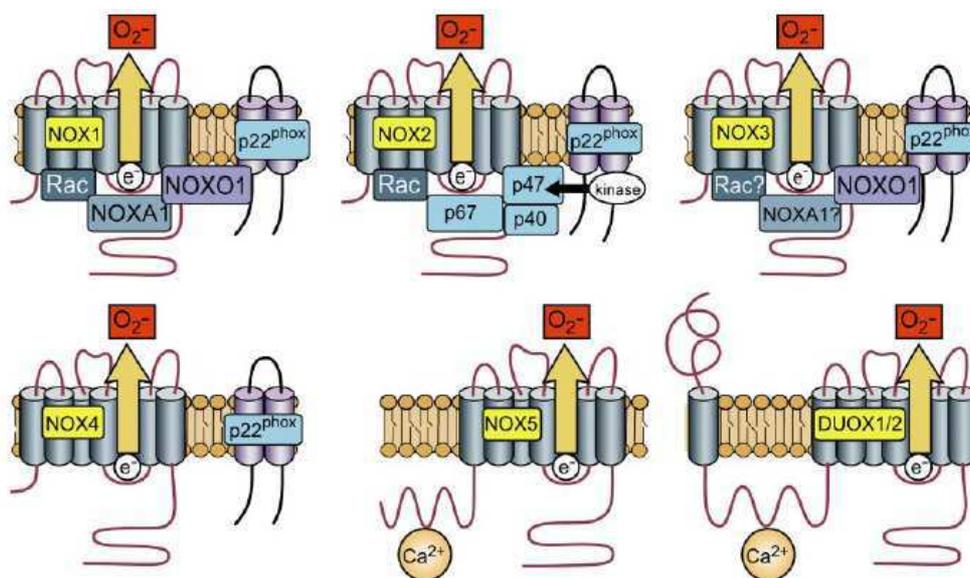


Figure 9B : Les isoformes de NADPH oxydase (NOXs)

Les NOXs diffèrent par leurs mécanismes d'activation. NOX1 nécessite p22^{phox}, NOXO1, NOXA1 et Rac. NOX2 a besoin de p22^{phox}, Rac, p67 et p47 phosphorylé. NOX3 requiert p22^{phox}, NOXO1, NOXA1 et Rac selon les espèces. NOX4 nécessite p22^{phox}. Les NOX5, DUOX1/2 sont activés par le calcium. (D'après Bedard & Krause, Physiol Rev., 2007)

Ils peuvent aussi réparer les dommages oxydatifs (par le glutathion et la thiorédoxine réduite, des molécules capables de réduire les résidus cystéine préalablement oxydés par les EAO).

b) EAO et mort cellulaire

L'état redox d'une cellule dépend de la balance entre sa production d'EAO et sa capacité à contenir leur toxicité (Oberley, Zhong et al. 2000). Une dérégulation de cette balance peut mener à une accumulation d'EAO et à un stress oxydant. Les altérations qui s'en suivent touchent majoritairement les acides nucléiques, les protéines et les lipides et sont principalement attribués à l'action du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (Pervaiz and Clement 2002). Les dommages cellulaires massifs induits par les EAO ont longtemps été associés à une mort de la cellule par nécrose. Néanmoins, le stress oxydant est également à l'origine du déclenchement de l'apoptose. A titre d'exemple, des concentrations d' H_2O_2 supérieures à $500\mu\text{M}$ déclenchent de la nécrose alors que des concentrations entre 25 et $500\mu\text{M}$ d' H_2O_2 déclenchent l'apoptose (Hampton and Orrenius 1997; Clement, Ponton et al. 1998). Les EAO peuvent en effet induire la mort cellulaire et interviennent au niveau de la mitochondrie (Ravagnan, Roumier et al. 2002). Une accumulation d'EAO cytosoliques et mitochondriaux peut induire une PMM (Ueda, Masutani et al. 2002). Inversement une PMM peut résulter en une production accrue d'EAO mitochondriaux. Les EAO constituent donc une cause et/ou une conséquence de la PMM. (Petit, Lecoœur et al. 1995; Zamzami, Marchetti et al. 1995) La PMM et l'ouverture du PTP ont été impliqués dans le mécanisme « Reactive Oxygen Species (ROS)-induced ROS-release » (RIRR) (Zorov, Filburn et al. 2000; Zorov, Juhaszova et al. 2006). De nombreuses études ont montré que les EAO, tout comme le Ca^{2+} , induisent l'ouverture du PTP (Crompton 1999). Des cibles des EAO au niveau du PTP ont d'ailleurs été identifiées (Le Bras, Clement et al. 2005). Par exemple, Halestrap a mis en évidence une altération de la liaison de l'ATP ou de l'ANT en présence d'agents oxydants (t-butyl hydroperoxide ou t-BHP et diamide) (Halestrap, Woodfield et al. 1997). Une oxydation au niveau du résidu cystéine 56 de l'ANT est responsable d'une PMM et de l'apoptose dans différents modèles (cellules, mitochondries isolées et ANT purifié en liposome) (Costantini, Belzacq et al. 2000; Vieira, Belzacq et al. 2001). VDAC est également une cible des EAO et O_2^- induit le relargage de cyt *c* par VDAC en cellules et en protéoliposomes (Madesh and Hajnoczky 2001).

c) EAO, cancérogenèse et résistance

Une génération d'EAO est observée dans des cellules normales suite à différents stimuli (cytokines, facteurs de croissance) et aussi dans des cellules cancéreuses à des doses

submicromolaires. Dans des conditions physiologiques, les EAO jouent un rôle de second messenger capable de promouvoir la croissance des cellules en culture (Burdon 1995; Burdon 1996). Les EAO sont majoritairement générées par la mitochondrie, mais dans le cas des EAO impliqués dans les voies de prolifération, ils sont préférentiellement produits par les NOXs (Sauer, Wartenberg et al. 2001). On note que l'expression de NOX4 est augmentée dans le cancer du pancréas (Vaquero, Edderkaoui et al. 2004), du sein (Graham, Kulawiec et al.) et dans les mélanomes (Brar, Kennedy et al. 2002; Yamaura, Mitsushita et al. 2009) et qu'elle est associée soit à la transformation tumorale soit à la résistance des cellules. L'action des EAO peut entraîner une perte/un gain de fonction ou un changement de fonction pour leurs cibles dans les voies de signalisation. Ces cibles peuvent être des récepteurs, des protéines kinases ou phosphatases, des facteurs de transcription... (Burdon 1995). On sait par exemple que l'activation des récepteurs de facteurs de croissance EGF, NGF, PDGF induit une augmentation transitoire des EAO via une activation de la petite GTPase Rac1 qui est membre de plusieurs complexes NOX. Il est également connu que les kinases p38 et JNK voient leur activation fortement augmentée en présence d'un stress oxydant. NF- κ B est le premier facteur de transcription pour lequel il a été montré un effet direct des EAO. En effet, l' H_2O_2 induit l'augmentation de la dégradation de son inhibiteur I κ B ou bien l'activation d'IKK α selon le type cellulaire étudié. (Droge 2002) Le stress oxydant interagit également avec la signalisation calcique et un relargage de Ca^{2+} peut être déclenché par l' H_2O_2 (Sauer, Diedershagen et al. 1997; Volk, Hensel et al. 1997). Ceci serait dû à une régulation directe des canaux calciques comme IP3R et RYR qui peuvent subir des modifications par des agents oxydants (Kaplan, Ferris et al. 1994; Eu, Sun et al. 2000). Ainsi les EAO sont capables d'influer sur de nombreuses voies de signalisation. Ce rôle est possible si le stress oxydant reste modéré, on parle alors de milieu « pro-oxydant ». Ce milieu favorise la survie et également la transformation tumorale (Fig.10) (Burdon 1996 ; Pervaiz and Clement 2007). Plusieurs équipes ont montré le lien entre milieu pro-oxydant et cancérogenèse par la mise en évidence de l'activité suppresseur de tumeurs de la SOD mitochondriale (MnSOD ou SOD2) (Zhao, Kinningham et al. 2001; Weydert, Roling et al. 2003; St Clair, Zhao et al. 2005). En plus de favoriser la prolifération et la cancérogenèse le milieu pro-oxydant serait aussi anti-apoptotique. Une augmentation de la concentration d' O_2^- dans des cellules cancéreuses entraîne une inhibition de l'apoptose induite par Fas et par des molécules chimiothérapeutiques (Clement and Stamenkovic 1996; Pervaiz, Ramalingam et al. 1999).

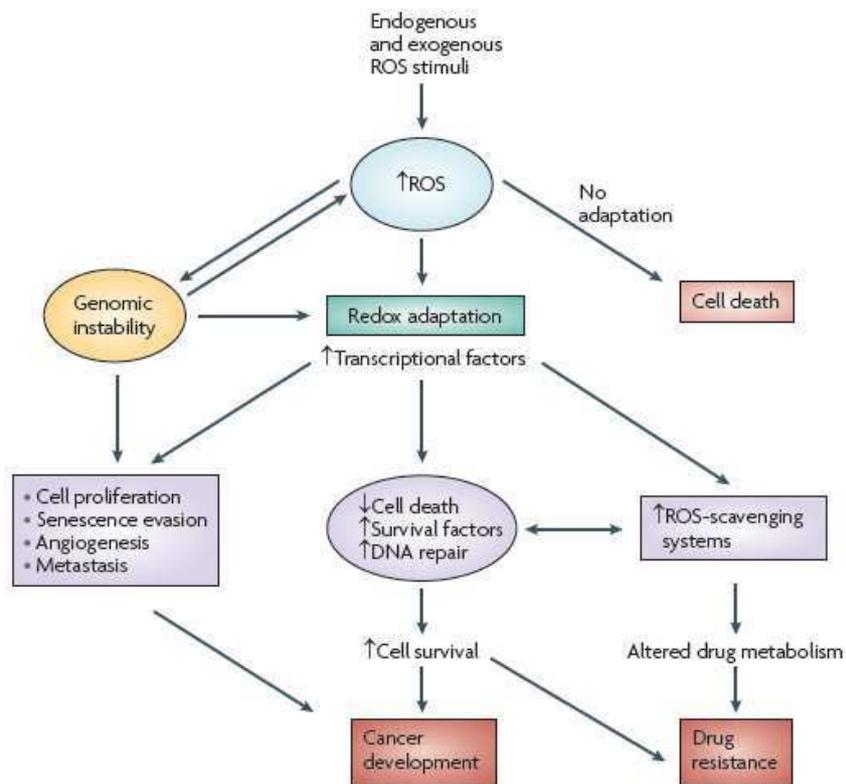


Figure 10 : Adaptation au stress oxydant, cancérogenèse et chimio-résistance

Un stress oxydant persistant dans certaines cellules cancéreuses induit une réponse adaptative avec activation de facteurs de transcription comme NF- κ B et Nrf2 (NF-E2-related factor 2) qui augmentent l'expression des enzymes antioxydantes (SOD, GPx) et de Bcl-2 et Mcl-1, et inhibition des caspases... Les mutations provoquées par l'instabilité génomique induite par les EAO participent au maintien de la réponse adaptative au stress. Cette adaptation active des voies de prolifération, d'échappement à la sénescence, d'angiogenèse et de diffusion métastatique. Tout ceci permet le développement tumoral ainsi que la mise en place d'une résistance aux agents chimiothérapeutiques.

(D'après Trachootham et al 2009, Nat Rev Drug Discovery)

Inversement la diminution des $O_2^{\cdot -}$ par surexpression de la SOD cytoplasmique (Cu/ZnSOD ou SOD1) ou par l'inhibition de Rac1 permet de sensibiliser des cellules cancéreuses à plusieurs molécules (daunorubicin, étoposide, staurosporine...) (Pervaiz, Ramalingam et al. 1999; Pervaiz, Cao et al. 2001). Ce rôle anti-apoptotique des EAO les implique dans la résistance aux chimiothérapies (Fig.10). La résistance des cellules cancéreuses est liée à une action anti-apoptotique des EAO et également à une adaptation du système antioxydant de ces cellules au stress oxydant. Ainsi les agents chimio-thérapeutiques qui, pour la plupart, entraînent une production d'EAO (comme mécanisme d'action ou de façon indirecte) peuvent être rendus inefficaces par une activation des antioxydants cellulaires (Pervaiz and Clement 2004). Cependant, en connaissant les particularités du système redox des cellules cancéreuses, il est alors possible de développer des stratégies pour cibler plus spécifiquement ces cellules lors des chimiothérapies (Fig.11) (Verrax, Taper et al. 2008).

Le stress oxydant intrinsèque des cellules cancéreuses les rend plus vulnérables (1) à un stress oxydant supplémentaire et (2) à une déplétion du système antioxydant (Fig.11) (Trachootham, Alexandre et al. 2009). En ce basant sur ce principe, des molécules génératrices d'EAO comme l'arsenic trioxide et le ménadione sont déjà utilisées en chimiothérapie et le disulfiram est actuellement en tests cliniques de phase I/II pour différents cancers (Wondrak 2009). L'activation du système antioxydant pouvant mener à une résistance de ces cellules, il semble important d'associer à la chimiothérapie des molécules qui inhibent les antioxydants cellulaire, comme le buthionine sulfoximine (BSO) qui déplete les cellules en glutathion (GSH) (Fig.11) (Trachootham, Alexandre et al. 2009).

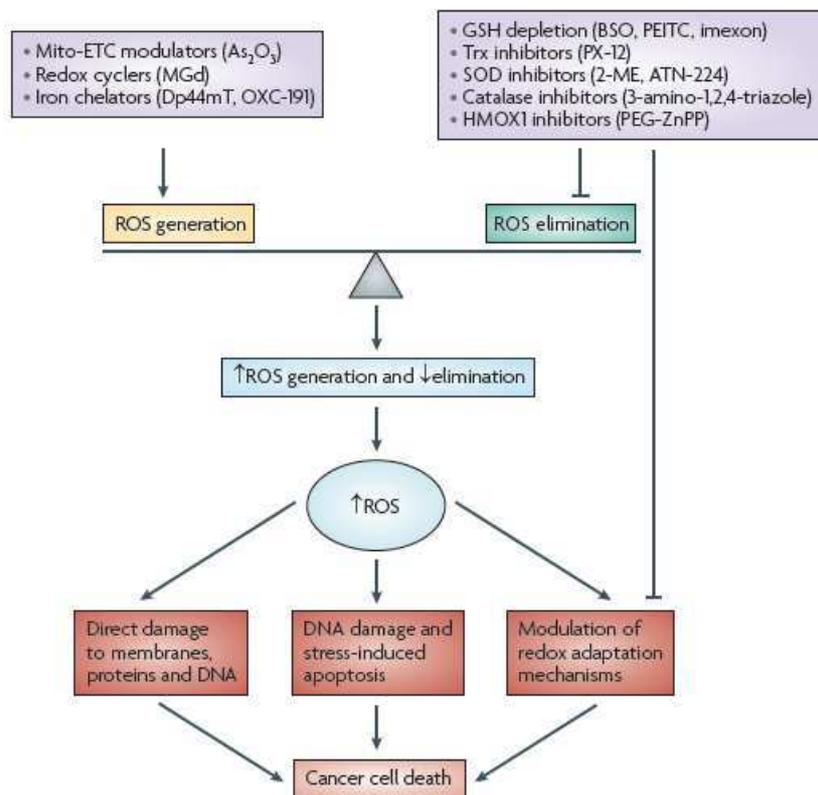


Figure 11 : Cibler les cellules cancéreuses par le système redox

Le taux d'EAO intracellulaires est le résultat de la production et de l'élimination des EAO. Les agents qui augmentent la génération d'EAO (modulateurs de la chaîne respiratoire, cycleurs redox, chelateurs de Fer) ou qui inhibent les systèmes antioxydants (inhibiteurs du GSH, des Trx, des SOD, de la catalase, de la HMOX1 (heme-oxygenase 1)) permettent une accumulation d'altérations suffisantes pour éliminer les cellules cancéreuses.

(D'après Trachootham et al 2009, Nat Rev Drug Discovery)

2. La tolérance au stress du Réticulum Endoplasmique (RE)

Le Ca^{2+} occupe un rôle de second messager indispensable à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques dans la cellule (Clapham 1995; Berridge, Bootman et al. 2003; Rizzuto and Pozzan 2006). Une surcharge calcique va induire une PMM principalement par l'ouverture du PTP, phénomène impliqué dans les voies de mort apoptotique et nécrotique (Giorgi, Romagnoli et al. 2008; Lemasters, Theruvath et al. 2009). La réserve de Ca^{2+} intracellulaire est majoritairement localisée dans le réticulum endoplasmique (RE). Le RE est également le site de l'assemblage des protéines, de modifications post-traductionnelles et de l'acquisition des conformations tertiaires et quaternaires des protéines nouvellement synthétisées et destinées à être membranaires ou secrétées. Le stockage du Ca^{2+} intracellulaire par le RE lui permet de réguler la concentration cytoplasmique en calcium. Depuis quelques années le rôle du RE est étudié dans le déclenchement d'un stress cellulaire conduisant, dans certains cas, à l'induction de l'apoptose. Après induction d'un stress du RE, plusieurs voies de signalisation sont déclenchées qui sont rassemblées sous le terme réponse UPR (pour « unfolded protein response »). Le but de ces signaux est de supprimer ce stress, mais lorsque la réponse UPR ne le permet pas, la cellule entre en apoptose. (Szegezdi, Logue et al. 2006; Ron and Walter 2007). La mort cellulaire induite suite à un stress du RE implique une communication inter-organelle entre le RE et la mitochondrie.

a) Le stress du RE

La réponse UPR est médiée par trois récepteurs transmembranaires (Fig12A): ATF6 (activating transcription factor 6), PERK (pancreatic ER kinase (PKR)-like ER kinase) et IRE1 (inositol-requiring enzyme 1). En l'absence de tout stress, ces récepteurs sont maintenus inactifs par leur interaction avec la protéine chaperonne Grp78/BiP (glucose-regulated protein 78kDa). Lors d'un stress du RE, Grp78 se dissocie des récepteurs ce qui va les activer et ainsi déclencher la réponse UPR. ATF6 va migrer au Golgi où il est clivé en sa forme active. Il va ensuite aller au noyau et induire la transcription des gènes des chaperonnes du RE : Grp78, Grp 94, PDI (protein disulfide isomerase) ainsi que les facteurs de transcription CHOP et XBP1 (X box-binding protein 1). PERK, quant à lui, va alors s'homodimériser, s'auto-phosphoryler et aller phosphoryler eIF2 (eukaryotic initiation factor 2). Ceci conduit à une inhibition de la traduction sauf pour certains ARNs avec des régions régulatrices spécifiques comme pour celui d'ATF4. ATF4 va activer des voies de survie et aussi des voies pro-apoptotiques.

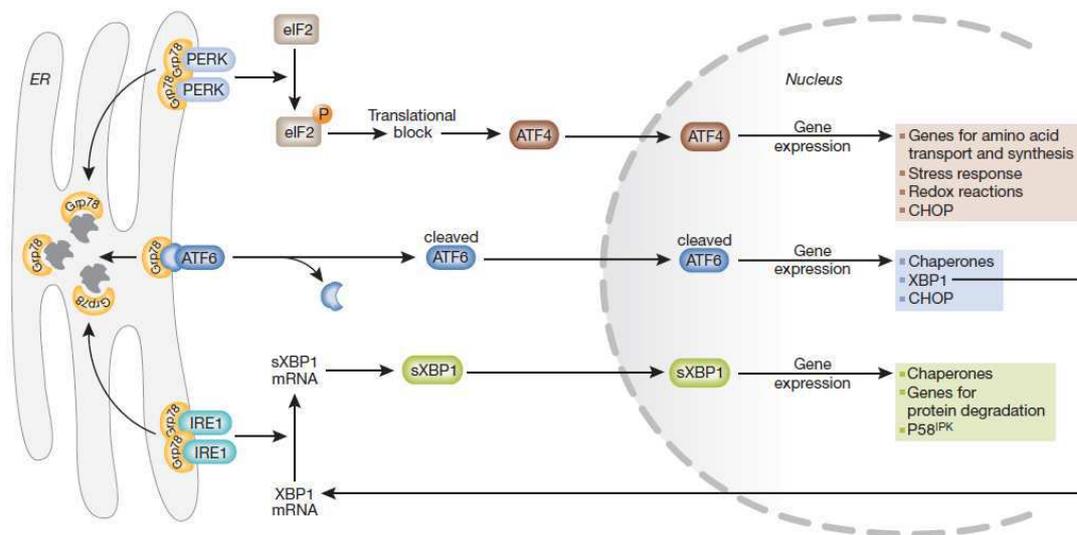


Figure 12A : La réponse UPR (« unfolded protein response »)

L'agrégation de protéines mal repliées dissocie Grp78 des récepteurs de stress RE (PERK, ATF6 et IRE1) permettant ainsi leur activation. Les voies mises en place font intervenir ATF4, CHOP et XBP1 et résultent en l'inhibition de la traduction et l'expression de chaperonnes pour remédier au stress initial. (D'après Szegezdi et al, EMBO Rep., 2006)

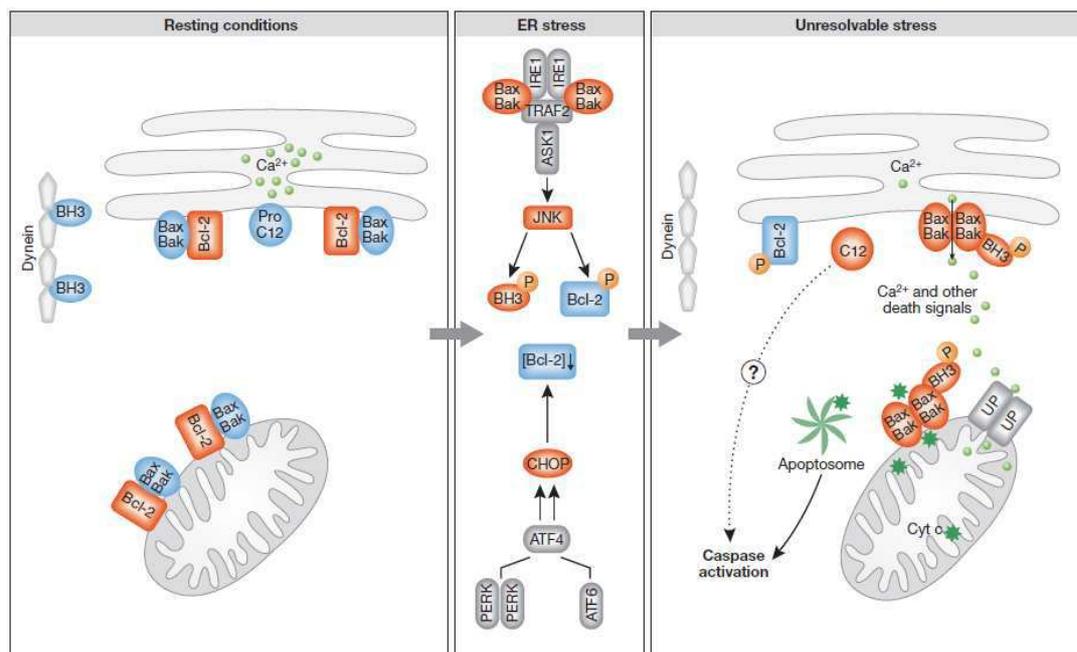


Figure 12B : Le stress RE et les protéines de la famille Bcl-2

En l'absence de stress, les protéines de la famille Bcl-2 sont inactives au niveau des membranes. La réponse au stress du RE active les récepteurs PERK, ATF6 et IRE1. Lorsque le stress ne peut être supprimé, la réponse pro-apoptotique prend le dessus. La voie IRE1 aboutit à l'activation de Bim et l'inhibition de Bcl-2. Les voies PERK et ATF6 permettent l'inhibition de l'expression de Bcl-2. Dans ces conditions, Bax et Bak vont faciliter le relargage de Ca^{2+} hors du RE. Cet influx de Ca^{2+} va déclencher la PMM.

(D'après Szegezdi et al, EMBO Rep., 2006)

Une de ses cibles, la protéine CHOP (C/EBP homologous protein), qui est peu ou pas exprimée dans des conditions normales, va être fortement induite en réponse à un stress du RE. L'augmentation de son expression conduit à un arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose. En l'absence de Grp78, IRE1 va cliver l'ARNm de XBP1. La protéine XBP1 synthétisée à partir de cet ARNm va induire la synthèse de nouvelles chaperonnes. IRE1 activé va aussi recruter TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2). Le complexe IRE1-TRAF2 permet l'activation de la MAPKKK ASK1 (apoptosis-signal-regulating kinase) conduisant à l'activation de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase). La formation d'un complexe IRE1-TRAF2 conduit à une activation par clivage de la caspase 4 activant la cascade des caspases via l'activation de la caspase initiateur mitochondriale (caspase 9). (Szegezdi, Logue et al. 2006)

Chacune des trois voies de réponse au stress du RE a une composante pro-survie (expression de chaperonnes pour IRE1 et ATF6, inhibition de la traduction pour PERK) et une composante pro-apoptotique (expression de CHOP pour ATF6 et PERK, activation de JNK pour IRE1). Lors d'un stress du RE prolongé, c'est-à-dire lorsque la composante pro-survie de la réponse UPR n'est pas capable de remédier au stress, la signalisation apoptotique dominera (Fig.12B). Cette signalisation est initiée par les protéines CHOP et JNK, exprimée et activée par la composante pro-apoptotique de la réponse UPR. CHOP peut induire une diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 et ainsi augmenter la proportion de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. JNK mène deux actions pro-apoptotiques : (1) phosphoryler et ainsi inhiber l'interaction de Bcl-2 avec Bax et Bak (2) phosphoryler des BH3-only (comme Bim) permettant une amplification de leur potentiel pro-apoptotique (Fig.12B) (Szegezdi, Logue et al. 2006).

b) La communication RE-mitochondrie

Le relargage massif de Ca^{2+} du RE est crucial dans le déclenchement de l'apoptose consécutif à un stress prolongé du RE (Demaurex and Distelhorst 2003; Orrenius, Zhivotovsky et al. 2003; Rizzuto, Pinton et al. 2003). Cette signalisation calcique, outre le fait de déclencher l'activation de protéases, permet de déclencher la phase mitochondriale de l'apoptose (Le Bras, Rouy et al. 2006). En effet, l'interaction RE-mitochondrie a été récemment mise en évidence par la visualisation de microdomaines où le RE et les mitochondries sont en contact étroit via des complexes multi-protéiques. On parle de MAM pour « mitochondria-associated membrane » (Pinton, Giorgi et al. 2008; Csordas, Varnai et al.). Le relargage du Ca^{2+} impliqué dans cette communication est effectuée via des canaux calciques du RE : le récepteur de la ryanodine (RYR), le récepteur de l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3R) et la

pompe SERCA (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase) (Hajnoczky, Csordas et al. 2000; Clapham 2007; Luciani, Gwiazda et al. 2009). L'ouverture des canaux calciques IP3R et SERCA est hautement régulée par les membres de la famille Bcl-2 localisés à la membrane du RE (Foyouzi-Youssefi, Arnaudeau et al. 2000; Oakes, Opferman et al. 2003). Des études sur cellules invalidées pour Bax et Bak ou surexprimant Bcl-2 ont montré que Bax et Bak facilitent la fuite de Ca^{2+} du RE par IP3R1 et la pompe SERCA. Bak et Bax, en liant Bcl-2, empêchent sa fixation aux pompes et son inhibition de la sortie de Ca^{2+} (Kuo, Kim et al. 1998; Scorrano, Oakes et al. 2003; Oakes, Scorrano et al. 2005). Le stress du RE peut être induit par des molécules comme la tunicamycine (inhibiteur de la N-glycosylation), la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA), A23187 (ionophore calcique)... et peut sensibiliser des cellules cancéreuses à la mort (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). Ces molécules peuvent induire une apoptose mitochondriale médiée par l'ouverture du PTP et déclenchée par un influx de Ca^{2+} impliquant une interaction entre IP3R (à la membrane du RE) et VDAC (à la MEM) (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). En effet, les MAMs seraient constitués, entre autres, de VDAC et IP3R interagissant via la chaperonne grp75 (Giorgi, De Stefani et al. 2009; Hayashi, Rizzuto et al. 2009).

c) Stress RE et résistance

Plusieurs études ont mis en évidence une activation de la voie UPR dans les tumeurs (Ma and Hendershot 2004). Certains éléments de la voie comme XBP1 et ATF6 sont activés, d'autres comme CHOP ou les chaperonnes du RE sont surexprimés dans des cancers du sein, du foie, de l'estomac ou encore de l'œsophage (Fernandez, Tabbara et al. 2000; Song, Park et al. 2001; Chen, Ding et al. 2002; Shuda, Kondoh et al. 2003). De plus, la réponse UPR est activée dans des lignées de cancer du sein et dans des modèles animaux (fibrosarcome, glioblastome, adénocarcinome de l'œsophage...). Ce stress prolongé devrait sensibiliser les cellules tumorales à la mort cellulaire. Or les observations *in vivo* montrent que l'activation du stress RE favorise le développement des tumeurs et l'acquisition d'une résistance à la mort cellulaire (Ma and Hendershot 2004). Une étude a mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de l'expression d'une chaperonne du RE (BiP) et l'agressivité de tumeurs du sein (Fernandez, Tabbara et al. 2000).

3. L'expression de protéines anti-apoptotiques

a) Les inhibiteurs de l'apoptose (IAPs)

Les IAPs ont d'abord été découverts chez les virus comme le baculovirus qui se servent de ces molécules pour inhiber l'apoptose de leurs cellules hôtes. Des homologues de ces

inhibiteurs de caspases, ont été retrouvés chez l'Homme (Deveraux and Reed 1999 ; Fesik and Shi 2001). Il s'agit de protéines mises en évidence pour leur capacité à empêcher le clivage des caspases nécessaire à leur activation. Les membres de cette famille sont : XIAP (X-linked IAP), cIAP1 (cellular IAP1), cIAP2 (cellular IAP2), Survivin, Livin ou ML-IAP (Melanoma IAP), Ts-IAP (Testis-specific IAP), NAIP (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) et BRUCE/Apollon (Fig. 13A). Cette famille se caractérise par la présence d'un motif peptidique conservé appelé BIR (Baculovirus IAP Repeats) qui peut être répété plusieurs fois et qui est nécessaire à la liaison et à l'inhibition des caspases (Fesik and Shi 2001).

Plusieurs études du laboratoire du Dr John C Reed ont montré que les IAPs non seulement inhibent l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices (Fig.13B) mais présentent également des spécificités d'inhibition pour certaines caspases qui sont propres à chaque IAP (Deveraux, Takahashi et al. 1997; Roy, Deveraux et al. 1997; Huang, Deveraux et al. 2000; Suzuki, Nakabayashi et al. 2001). Les IAPs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines mitochondriales Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 qui sont libérées dans le cytosol au cours de l'exécution de la voie intrinsèque de l'apoptose, se lient aux IAP et les inhibent (Vaux and Silke 2003).

En 2006, l'équipe du Pr Guy S. Salvesen publie deux articles qui suggèrent que seul XIAP serait en réalité capable d'inhiber directement les caspases. Les autres IAPs interagiraient avec les caspases sans les inhiber directement. Les études de c-IAP 1 et 2, plus proches analogues de XIAP, démontrant une inhibition directe des caspases, seraient un artefact de l'utilisation des étiquettes glutathione-s-transférase (tags GST). Les c-IAPs inactivent les caspases en induisant des dégradations protéiques via le système ubiquitine-protéasome (Eckelman and Salvesen 2006; Eckelman, Salvesen et al. 2006). Ils déclenchent en effet l'ubiquitination de protéines des complexes en aval du TNFR (RIP1 et TRADD) qui participent à l'activation de la caspase 8 (Gyrd-Hansen and Meier 2010). Sur la base d'études structurales, il semble que deux séquences présentes au sein du BIR de XIAP sont nécessaires pour inhiber les caspases. Il s'agit d'une séquence d'interaction IBM (IAP binding motif) et d'une séquence inhibitrice. Les autres IAPs, ne contenant pas ces séquences spécifiques, sont peu susceptibles d'inhiber directement les caspases (Eckelman, Salvesen et al. 2006).

Tous les IAPs ont un rôle anti-apoptotique, cependant leurs mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés. Certains IAPs (Survivin, XIAP, ML-IAP) ont été trouvés surexprimés dans des lignées cancéreuses et aussi dans des tumeurs où ils sont associés à un mauvais pronostic et une chimio-résistance.

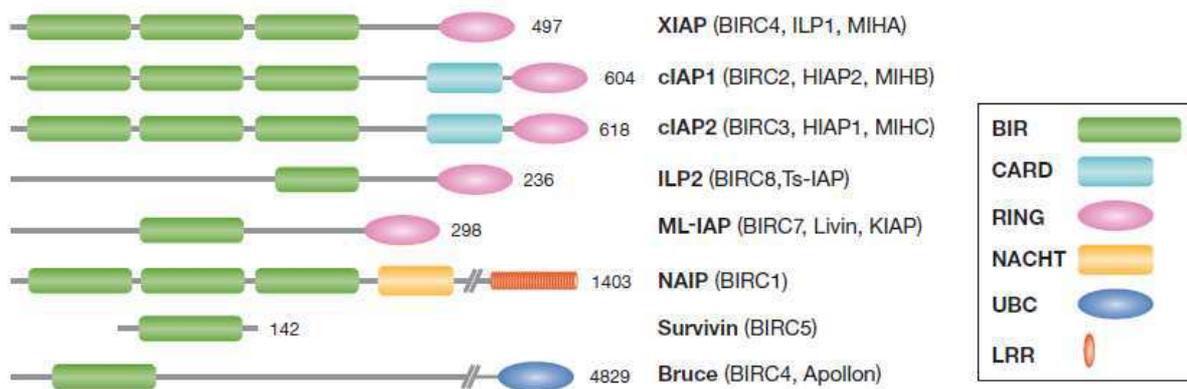


Figure 13A : La famille des inhibiteurs d'apoptose (IAPs)

Les IAPs présentent au moins un domaine BIR (baculovirus IAP repeat). Le domaine RING (really interesting new gene) code une E3 ligase et permet l'élimination des cibles par le système ubiquitine-protéasome. Le domaine CARD (Caspase-recruitment domain) intervient dans l'interaction avec les caspases. Le domaine UBC (ubiquitin-conjugation) de Bruce est retrouvé dans les enzymes de conjugaison à l'ubiquitine. NAIP présente un domaine NACHT qui ressemble au domaine d'oligomérisation de nucléotides des NTPases AAA+ et un domaine LRR (leucine-rich repeats) qui fonctionne comme « sensor » des pathogènes pour les TLRs (Toll-like receptors).

(D'après Eckelman, Salvesen & Scott, EMBO J, 2006)

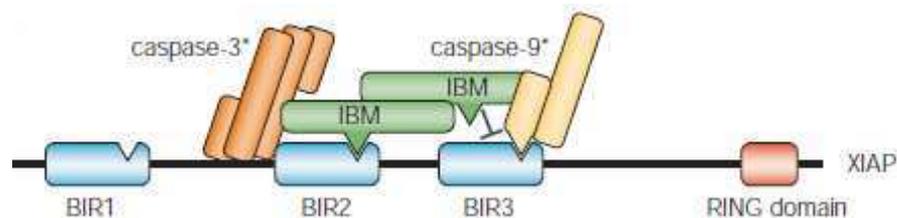


Figure 13B : Schéma de l'interaction de XIAP avec les caspases 3 et 9

Les antagonistes des IAPs inhibent les IAPs via leurs domaines IBM (IAP-binding motif). Ils sont directement en compétition avec la fixation de la caspase 9 sur le BIR3 et avec la fixation des caspases 3 et 7 au BIR2 de XIAP.

(D'après Vaux & Silke, Nat Rev Mol Cell Biol, 2005)

De nouvelles molécules appelées « Smac-mimetics » ont ainsi été développées pour inhiber la résistance induite par les IAPs. Ces molécules sont actuellement en cours de tests cliniques de Phase I (Gyrd-Hansen and Meier 2010).

b) Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2

Les membres de la famille Bcl-2 constituent les principaux régulateurs de l'apoptose. Comme nous l'avons vu précédemment (cf Fig.7), cette famille peut être divisée en deux groupes en fonction de leur activité : les protéines possédant une activité anti-apoptotique et les protéines possédant une activité pro-apoptotique. Ces régulateurs de l'apoptose participent à la décision d'entrée en apoptose ou de survie et ceci tout particulièrement au cours de l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. En effet, il a été montré que Bcl-2 et Bcl-x_L inhibent la PMM dans des protéoliposomes, des mitochondries isolées et des cellules. Dans ces mêmes systèmes, Bax et Bid favorisent l'ouverture du PTP. La PMM et la transduction des signaux de mort sont sous le contrôle direct des membres de la famille Bcl-2. (Marzo, Brenner et al. 1998; Zamzami, El Hamel et al. 2000; Brenner, Le Bras et al. 2003) Nous avons également vu qu'ils contrôlent la mort induite après un stress du RE et le relargage de Ca²⁺ (Oakes, Opferman et al. 2003). Plus récemment, divers travaux ont mis en avant le rôle de Bcl-2 dans la régulation du statut redox des cellules tumorales (Chen and Pervaiz 2009; Susnow, Zeng et al. 2009). Ces études font état d'une résistance au stress oxydant induit par traitement sur des cellules qui surexpriment Bcl-2. Il semble en effet que Bcl-2 augmente le niveau cellulaire de GSH et cela par une interaction directe (Amstad, Liu et al. 2001; Zimmermann, Loucks et al. 2007).

Ces rôles de Bcl-2 lui permettent, au sein de cellules cancéreuses, d'inhiber la PMM, le stress du RE et le stress oxydant induits par des agents thérapeutiques. Le déséquilibre du ratio Bax/Bcl-2 en faveur de Bcl-2 est d'ailleurs depuis plusieurs années associé à une chimio-résistance tumorale (Reed 1994; Reed 1996). Il est donc intéressant de cibler les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour contrer la chimio-résistance. Dans ce sens plusieurs molécules ont été développées et sont actuellement en cours de tests cliniques ou pré-cliniques (Tableau 1).

Tableau 1 : Les inhibiteurs de Bcl-2

Molécules	Protéines cibles	Sponsors	Stade
Apogossypol	Bcl-2, Bcl-X _L , Mcl-1	Burnham (NCI)	préclinique
HA-14	Bcl-2	Maybridge Chem	préclinique
Antimycin A	Bcl-2, Bcl-X _L	U of Washington	préclinique

BH3 Inhibitors	Bcl-X _L	Harvard U	préclinique
Oblimersen (G3139)	Bcl-2	Genta	phase III
Gossypol (AT-101)	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w, Mcl-1	Ascenta (NCI)	phase I/II
ABT-737 (ABT-263)	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w	Abbott	phase I
Obatoclox (GX15-070)	Bcl-2, Bcl-X _L , Bcl-w, Mcl-1	Gemin X	phase I

Abbréviations : NCI : National Cancer Institute, Maybridge Chem : Maybridge Chemicals Co. Ltd., U : University (D'après Kang & Reynolds 2009, Clin Cancer Res)

Le premier de ces agents, l'Oblimersen développé par Genta (Tableau 1) a été conçu pour cibler spécifiquement Bcl-2 au niveau de l'ARNm. Il s'agit d'un oligomère de 18 paires de bases, en antisens de la séquence codante de l'ARNm de Bcl-2 et qui conduit à la dégradation de celui-ci. Les molécules les plus récentes ciblent les protéines et sont appelées « BH3-mimetics ». Leur mode d'action imite celui des « BH3-only » en se fixant et en inhibant certaines protéines anti-apoptotiques et également en induisant la PMM par oligomérisation avec Bax ou Bak. Toutes ces molécules ont déjà montré des résultats prometteurs sur des modèles de lignées cellulaires cancéreuses et en xénogreffes sur souris. (Kang and Reynolds 2009)

De nombreuses protéines anti-apoptotiques sont susceptibles de contrer les effets des agents thérapeutiques. Il est donc important de déterminer leur niveau en vue de traitements combinatoires avec des molécules ciblées (anti-Bcl-2 ou anti-IAP).

Nous avons vu dans cette 1^{ère} partie que la mort cellulaire apoptotique et nécrotique constitue une arme dans l'élimination des cellules cancéreuses. Il est donc intéressant d'identifier des molécules capables d'induire l'une ou l'autre de ces deux morts.

De nombreuses molécules ont pour cible la mitochondrie et la protéine mitochondriale ANT est une cible prometteuse pour l'élaboration de nouvelles thérapies.

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes de tolérance aux stress et expriment des protéines anti-apoptotiques responsables de la chimiorésistance. Il est donc nécessaire d'étudier les mécanismes impliqués dans ce processus pour déterminer l'efficacité d'agents thérapeutiques putatifs.

PARTIE II : MODELE DE TUMEUR RESISTANTE : LE MELANOME

Le mélanome est un type de cancer particulièrement résistant à la mort cellulaire qui a servi de modèle d'étude à mes travaux de thèse. Il met en œuvre de nombreux mécanismes anti-apoptotiques qui lui confèrent une chimiorésistance intrinsèque. L'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques pour sensibiliser le mélanome à la mort cellulaire nécessite de contrer ou de contourner ces mécanismes de résistance. J'ai ainsi tenté de sensibiliser des cellules de mélanome et je présenterai à la fin de ce chapitre de nouvelles molécules qui semblent capables de contrecarrer la chimiorésistance.

I- L'environnement et l'initiation du mélanome

Intéressons d'abord nous aux origines du mélanome, c'est-à-dire non seulement au développement, à la fonction et à la transformation des mélanocytes mais également à son environnement au sein du tissu cutané. Cela nous permettra de mieux identifier les particularités de ce modèle et les mécanismes de résistance mis en place.

1. L'organisation de la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain. Sa superficie varie entre 1,2 et 2,2m² chez l'adulte moyen et son poids représente environ 7% de la masse corporelle totale. La peau recouvre entièrement la surface externe d'un individu et elle est le lieu principal des interactions avec l'environnement extérieur. Elle constitue ainsi une barrière dont le rôle est de protéger les tissus internes de l'organisme contre les blessures, les rayons ultraviolets (UV), les variations importantes de température, et d'empêcher l'intrusion d'agents pathogènes comme les virus et les bactéries. Elle contribue également à la perception sensorielle, la surveillance immunologique et la régulation de la température.

La peau est composée de 2000 milliards de cellules réparties en trois couches : l'épiderme (la couche superficielle), le derme (la couche moyenne) et l'hypoderme (la couche profonde) (Fig14A). Elle renferme des structures spécialisées comme les récepteurs sensoriels, les follicules pileux, les glandes sudoripares qui refroidissent le corps par évaporation et les glandes sébacées qui imperméabilisent la peau grâce à la sécrétion de sébum (Fig14A, page 44).

a) L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié squameux et kératinisé composé de quatre types cellulaires : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de

Merkel (Fig14B). Il ne contient aucun vaisseau sanguin ni lymphatique et dépend entièrement du tissu sous-jacent, le derme, pour l'apport en nutriments et l'élimination des déchets.

- Les kératinocytes

Les kératinocytes sont les cellules les plus abondantes de l'épiderme (Fig14B). La cohésion entre kératinocytes est assurée par des jonctions solides, les desmosomes. Le rôle principal des kératinocytes consiste à produire de la kératine, une protéine fibreuse qui confère aux cellules de l'épiderme leurs propriétés protectrices.

- Les mélanocytes

Chez l'homme, on dénombre 2000 mélanocytes par mm² au niveau de la face et 1000 à 1500/mm² sur le reste du corps. Ils sont très nombreux dans les régions chroniquement exposées à la lumière. Les mélanocytes sont des cellules épithéliales de forme étoilée qui synthétisent les pigments de mélanine (Fig14B). A mesure qu'elle est synthétisée, la mélanine s'accumule dans les mélanosomes, organites cytoplasmiques spécialisés qui permettent ensuite l'acheminement de la mélanine, le long des filaments d'actine, vers l'extrémité des prolongements des mélanocytes où la mélanine est transférée dans les mélanocytes adjacents. Les granules de mélanine s'accumulent alors sur la face du noyau des kératinocytes qui est tournée vers le milieu extérieur et forme ainsi une protection contre les effets néfastes des rayons UV.

- Les cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans ou macrophages intra-épidermiques sont également de forme étoilée (Fig14B). Elles trouvent leur origine dans la moelle osseuse avant de migrer dans l'épiderme. Leurs fins prolongements s'étendent entre les kératinocytes pour former un réseau plus ou moins continu. Les cellules de Langerhans sont spécialisées dans la présentation de l'antigène et permettent l'activation du système immunitaire lors d'affections de la peau et des muqueuses.

- Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel ou épithélioïdocytes du tact sont les cellules les moins nombreuses de l'épiderme. Elles sont néanmoins distribuées sur toute la surface corporelle, les zones les plus riches étant les zones non pileuses (lèvre, palais, paume des mains, plante des pieds).

Ces cellules de forme hémisphérique sont liées aux terminaisons des neurofibres sensibles (ou disques de Merkel) et aux kératinocytes voisins par des microvillosités qui s'insèrent dans des replis de la membrane de ces derniers. La structure formée par la cellule de Merkel et le disque de Merkel jouerait le rôle de récepteur sensoriel du toucher.

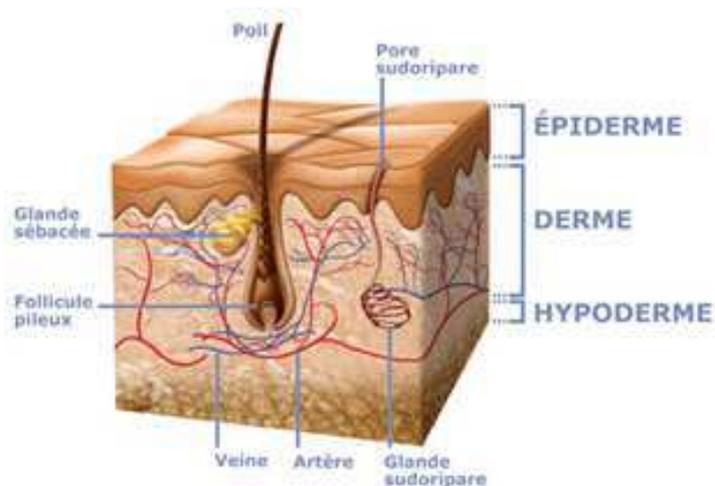


Figure 14A : Structure de la peau

La peau est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Elle contient des structures spécialisées, les poils et les glandes sudoripares. Ces structures prennent naissance dans le derme et traversent l'épiderme. Seul le derme est vascularisé.

Source : <http://www.bioderma.com/fr/>

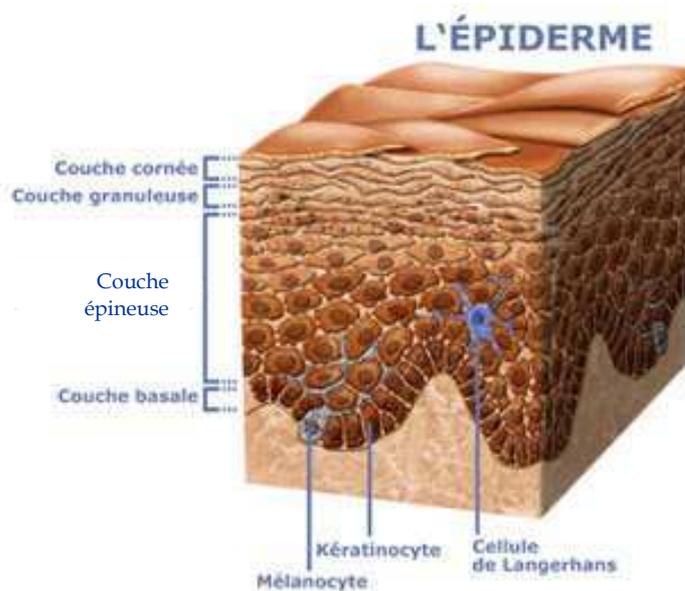


Figure 14B : Structure de l'épiderme

L'épiderme se subdivise en quatre couches principalement composées de kératinocytes. Les kératinocytes vont subir leur maturation en progression de couche en couche et produire la kératine essentielle à la fonction de protection de la peau. Les mélanocytes présents dans la couche basale fournissent la mélanine à plusieurs kératinocytes grâce à leurs prolongements. Les cellules de Langerhans sont les macrophages résidents de la peau.

Source : <http://www.bioderma.com/fr/>

Au sein l'épiderme, les cellules se répartissent en quatre ou cinq couches cellulaires selon le type de peau (fine ou épaisse) : la couche basale ou germinative (stratum basale ou germinativum), la couche épineuse (stratum spinosum), la couche granuleuse (stratum granulosum), la couche claire (stratum lucidum) et la couche cornée (stratum corneum) (Fig.14B).

Les kératinocytes de la couche basale, cellules cylindriques ou cubiques, établissent une liaison solide avec le derme sous-jacent par l'intermédiaire d'une membrane basale dont ils élaborent les principaux constituants (laminines, fibronectine, collagènes, etc...), et à laquelle ils sont rattachés par des contacts focaux et des hémidesmosomes. La couche basale se compose d'une seule épaisseur de cellules qui se renouvellent continuellement. Lorsqu'une de ces cellules se divise, une cellule fille va migrer dans les différentes couches supérieures de l'épiderme où elle effectue sa différenciation en kératinocyte mature. L'autre cellule fille reste dans la couche basale pour continuer à produire de nouveaux kératinocytes. Les cellules de la couche basale sont constituées de 10 à 25% de mélanocytes qui peuvent étendre leurs prolongements vers les kératinocytes de la couche épineuse. La couche basale contient également les cellules de Merkel.

La couche épineuse contient 8 à 10 épaisseurs de kératinocytes de forme polyédrique. On trouve également des granules de mélanine et des cellules de Langerhans.

La couche granuleuse est formée de 3 à 5 épaisseurs de kératinocytes qui commencent le processus de kératinisation. Ils vont s'aplatir et mourir (leurs noyaux et organites sont dégradés).

La couche claire constituée de quelques couches de kératinocytes aplatis et morts n'est présente que dans la peau épaisse (paume des mains, bout des doigts et plante des pieds).

La couche cornée se compose de 20 à 30 rangées et peut former jusqu'aux trois quarts de l'épiderme. La kératine et les membranes plasmiques épaisses des kératinocytes de la couche cornée protègent la peau contre les agressions de l'environnement et les déperditions d'eau.

b) Le derme

Le derme est 10 à 40 fois plus épais que l'épiderme. La fonction première du derme est de soutenir et d'assister l'épiderme. Ses fibres protéiques font de lui une véritable assise pour l'épiderme. Il prend en charge la nutrition de l'épiderme par diffusion. Il contient de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, des nerfs et des terminaisons nerveuses ainsi que diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme et plongeant dans le derme. Les fibroblastes, principal

type cellulaire du derme, sont essentiellement localisés dans le derme superficiel. Ils sont spécialisés dans la synthèse de deux types de fibres protéiques : les fibres de collagène (70% des protéines du derme) et les fibres d'élastine, constituants de la matrice extra-cellulaire. Les fibres de collagène confèrent au derme sa résistance aux tensions et aux tractions. Elles pénètrent dans le tissu graisseux de l'hypoderme, le traversent et vont s'attacher aux muscles. Les fibres d'élastine, quant à elles, donnent au derme ses propriétés élastiques. Elles participent également à la structure des vaisseaux et des tendons des muscles pilo-moteurs. Il existe en plus des fibroblastes des cellules immunitaires (macrophages, mastocytes, lymphocytes, etc...) dont l'augmentation témoigne d'un processus pathologique. Les cellules et les fibres du derme sont enveloppées dans une matrice formée d'un mélange de protéoglycanes et de glycoprotéines qui permet de capter l'eau et constitue ainsi un réservoir d'hydratation.

Le derme est composé de deux couches adjacentes:

- le derme superficiel (ou derme papillaire)

Le derme superficiel est situé à la jonction dermo-épidermique. Il correspond au tissu conjonctif des papilles dermiques, ces invaginations du derme qui permettent l'acheminement de l'oxygène et des nutriments aux couches internes de cellules épidermiques. Le derme papillaire est composé de fines fibres de collagène et d'élastine entrelacées qui permettent le passage de nombreux vaisseaux sanguins et neurofibres. Formant un tissu lâche, les cellules immunitaires peuvent circuler librement.

- le derme réticulaire (ou chorion)

Le derme réticulaire, plus profond, représente la majeure partie du derme (80% de son épaisseur) et constitue le tissu de soutien dermique. Il est composé de tissu conjonctif dense et irrégulier. Sa matrice extracellulaire comporte des fibres d'élastine épaisses et d'épais faisceaux de fibres de collagène enchevêtrées diversement orientées mais pour la plupart parallèles à la surface de la peau.

c) L'hypoderme

Couche la plus profonde de la peau, l'hypoderme est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui, selon les conditions de nutrition et les régions de la peau, contient plus ou moins de tissu adipeux. Il sert d'interface entre la peau et les structures mobiles sous-jacentes (muscles, tendons, ligaments,...) et protège aussi l'organisme contre les chocs. Il permet également la régulation de la température corporelle en servant d'isolant thermique et de réserve énergétique et protège les organes des blessures.

Source : Anatomie et physiologie humaine – 8^{ème} édition, E. N. Marieb et K. Hoehn.

2. Les cancers de la peau

De par son exposition permanente à l'environnement, la peau est l'organe le plus touché par les cancers (La Ligue Contre le Cancer, 2008)

Les cancers de la peau sont classés en trois sous-groupes : le carcinome baso-cellulaire (BCC pour Basal Cell Carcinoma), le carcinome spino-cellulaire (SCC pour Squamous Cell Carcinoma) et le mélanome. L'incidence globale est en constante évolution et devient alarmante : 2 à 3 millions de nouveaux cas chaque année dans le monde entier (Organisation Mondiale de la Santé OMS, 2010). En France, on compte entre 60000 et 80000 nouveaux cas de cancer de la peau par an (www.ligue-cancer.net/cancer_peau). De plus, le cancer de la peau est la forme la plus fréquente de cancer secondaire : une personne ayant ou ayant eu un cancer a plus de risques d'en développer un autre, généralement un cancer de la peau (<http://www.cancer.net/>).

a) Les carcinomes baso-cellulaire et spino-cellulaire

- Le carcinome baso-cellulaire

Le carcinome baso-cellulaire (Fig15A) est le cancer de la peau le moins dangereux et le plus fréquent : à lui seul, il représente environ 90% des cancers de la peau. Son nom est lié au fait qu'il se forme dans la couche la plus profonde de l'épiderme, la couche basale. Les kératinocytes de la couche basale prolifèrent et envahissent le derme et l'hypoderme. Les lésions cancéreuses apparaissent la plupart du temps dans les régions du visage exposées au soleil (Fig15A). Le carcinome baso-cellulaire croît à une vitesse relativement faible et il est en général détecté avant d'avoir eu le temps de former des métastases. La guérison est totale dans 99% des cas lorsqu'est effectuée une excision chirurgicale.

Source : Anatomie et physiologie humaine – 8^{ème} édition, E. N. Marieb et K. Hoehn.

- Le carcinome spino-cellulaire

Le carcinome spino-cellulaire (Fig15B), qui arrive au second rang sur le plan de la fréquence, est issu des kératinocytes de la couche épineuse. La lésion prend souvent naissance au niveau de la tête (cuir chevelu, oreilles, lèvres inférieur) ou sur les mains. Il survient habituellement chez les personnes âgées de plus de 50 ans. Le carcinome spino-cellulaire a tendance à croître rapidement et à envahir les ganglions lymphatiques adjacents s'il n'est pas excisé. Néanmoins son traitement par chirurgie et radiothérapie donne de grandes chances de rémission complète. Il arrive qu'il génère des métastases, mais cela reste très rare (moins de 1% des cas).

Source : Anatomie et physiologie humaine – 8^{ème} édition, E. N. Marieb et K. Hoehn.



Figure 15A : Carcinome baso-cellulaire

Le carcinome baso-cellulaire, cancer de la peau le plus fréquent, est du à la transformation et a l'invasion des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme. Il apparaît souvent sur les zones exposées au soleil.

Source : OMS (http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)



Figure 15B : Carcinome spino-cellulaire

Le carcinome spino-cellulaire est initié par des kératinocytes de la couche épineuse. La majorité des lésions se trouvent sur la tête ou sur les mains.

Source : OMS (http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)



Figure 15C : Mélanome

Le mélanome est le cancer de la peau le plus rare et le plus agressif. Il est du à la transformation et à la prolifération des mélanocytes. Son excision est la meilleure façon de le traiter.

Source : OMS (http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/index1.html)

b) Le mélanome

Le mélanome malin cutané (Fig15C) représente moins de 10% des cancers de la peau, cependant il est responsable de 90% des décès causés par un cancer cutané : c'est le plus agressif et le plus dangereux (Ibrahim and Haluska 2009; Garbe, Peris et al. 2010). En effet il produit des métastases en abondance et résiste aux chimio-, radio- et immuno-thérapies disponibles. Il touche aussi bien les jeunes adultes (cancer le plus fréquent chez les 20-30 ans) que les personnes plus âgées (OMS 2010).

Quatre sous-types de mélanomes sont identifiés sur des critères cliniques et histologiques : le mélanome superficiel extensif (SSM pour Superficial Spreading Melanoma), le mélanome nodulaire (NM pour Nodular Melanoma), le mélanome de Dubreuilh (LMM pour Lentigo Malignant Melanoma), le mélanome acral-lentigineux (ALM pour Acral Lentiginous Melanoma) (Garbe, Peris et al. 2010). Cette classification établie par Clark dans les années 70 (Clark, From et al. 1969) est toujours largement utilisée par les cliniciens et les chercheurs même si certaines équipes essayent d'établir un nouveau système de classification (Curtin, Fridlyand et al. 2005).

- Epidémiologie

Les mélanomes cutanés sont en constante progression dans les pays occidentaux : au cours des 50 dernières années le nombre de cas a doublé tous les 10 ans. L'incidence mondiale moyenne du mélanome est actuellement de l'ordre de 10 cas pour 100000 habitants mais celle-ci est 5 à 6 fois plus élevée en Australie, le pays le plus touché, avec 50-60 cas pour 100000 habitants. L'incidence aux Etats-Unis est de 10 à 25 cas pour 100000 habitants tandis qu'en Europe centrale on évalue l'incidence à 10-14/100000 et 6-10/100000 en Europe du sud. (Garbe, Peris et al. 2010). Dans tous les pays européens l'incidence est plus forte chez les femmes que chez les hommes tandis qu'en Australie et en Amérique du nord l'incidence est plus forte chez les hommes. En Europe, la France est parmi les pays d'incidence moyenne du mélanome. Les incidences les plus élevées (doubles de celles de la France) se situent dans les pays scandinaves et du nord de l'Europe (Danemark, Suède, Pays-Bas, Irlande et Autriche), les incidences les plus faibles dans les pays du sud de l'Europe (Italie, Espagne, Portugal, Grèce). Ce gradient nord-sud décroissant de l'incidence des mélanomes est lié aux différents phototypes cutanés et à la prédisposition génétique.

Source : Institut national de veille sanitaire (InVS), Rapport 2007

- Facteurs de risques

- Risques environnementaux

L'exposition aux rayons UV du soleil est la principale cause des cancers de la peau et en particulier du mélanome (Abdel-Malek, Kadarko et al. 2010). Le spectre des rayons UV comprend les UVB (longueur d'onde : 280-320nm) et les UVA (longueur d'onde : 320-400nm). La forme prédominante des UV qui arrivent jusqu'à l'atmosphère terrestre sont les UVA mais les UVB ont un pouvoir mutagène 100 fois plus élevé que les UVA. En effet, les UVB sont la principale cause de la formation de dimères de bases pyrimidines qui créent des distorsions dans la structure de l'ADN. Les UVA sont eux majoritairement responsable d'altérations de l'ADN liés à la production d'espèces activées de l'oxygène (EAO) qui peuvent induire des mutations et un processus de cancérogenèse si les mutations ne sont pas réparées. Ces altérations semblent occuper un rôle central dans la « mélanomagenèse » (transformation des mélanocytes en mélanomes) car ils seraient la cause des mutations somatique dans les gènes codant les protéines p16 et BRAF.

La fréquence de l'exposition au soleil et l'âge de survenue des coups de soleil influence le risque de survenue des mélanomes (Abdel-Malek, Kadarko et al. 2010). En effet, les coups de soleil dans l'enfance sont associés au développement des naevi pigmentaires (grains de beauté) qui sont de bons marqueurs de risque de mélanome. De plus, le risque est associé à une peau claire, des cheveux roux ou blonds et des yeux clairs. (Veierod, Adami et al. 2010) En effet, la pigmentation étant le principal mécanisme de protection contre les rayons UV, l'incidence des mélanomes (et des autres cancers de la peau) est inversement corrélée avec une concentration de mélanine élevée.

- Risques génétiques

Environ 5% des mélanomes interviennent dans un contexte familial avec au moins 2 personnes affectées (MacKie, Hauschild et al. 2009). La responsabilité des gènes de sensibilité identifiés par l'étude de ces familles est à associer avec les facteurs de risques phénotypiques (peau claire, cheveux roux ou blonds, yeux clairs et présence de nombreux naevi) qui révèlent la sensibilité aux rayons UV et la fréquence des expositions au soleil et aux rayons UV artificiels (MacKie, Hauschild et al. 2009).

Dans les années 60, le gène CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) (Fig.16A) a été associé à un risque élevé de formation d'un mélanome. Depuis, de nombreuses études ont montré que 25 à 50% des cas familiaux de mélanome présentent une mutation du gène CDKN2A. Le locus CDKN2A code pour deux protéines distinctes impliquées toutes deux dans la régulation du cycle cellulaire (p14^{ARF} et p16^{INK4A}) (Fig16A). Il s'agit d'un gène suppresseur de tumeurs car des mutations induisant l'inactivation des protéines codées par CDKN2A participent au mécanisme d'oncogenèse.

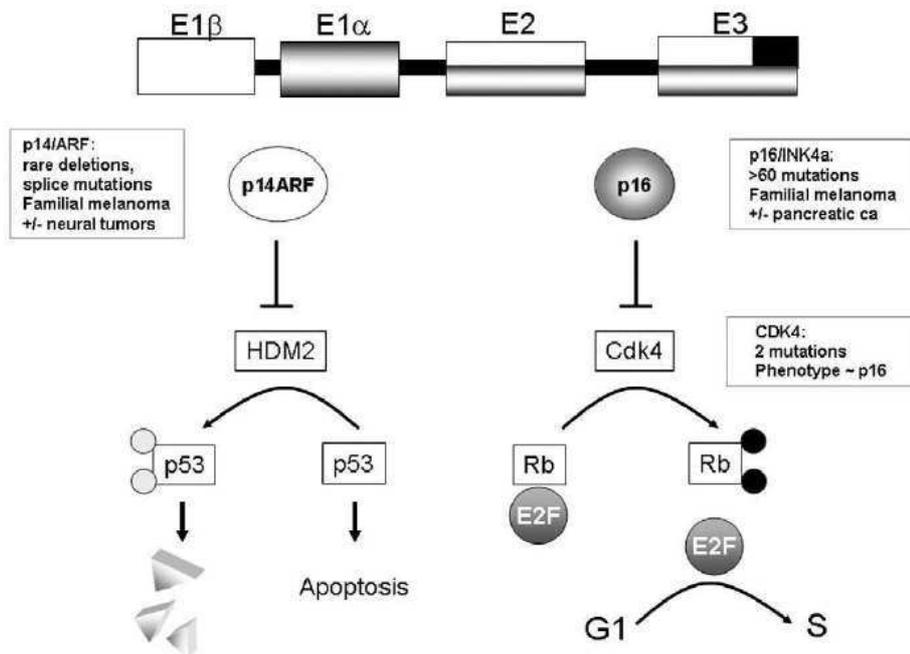


Figure 16A : Structure et fonction du gène CDKN2A (cyclin-dependant kinase inhibitor 2A)

Le locus CDKN2A, dont les mutations sont impliquées dans les mélanomes familiaux, code les protéines p14^{ARF} et p16^{INK4A}. En cas d'altération de l'ADN, p14^{ARF} déclenche l'apoptose via l'activation de p53 et p16^{INK4A} empêche l'entrée en phase S par l'action rétinoblastome (Rb).

(D'après Nelson & Tsao, Clinics in Dermatology, 2009)

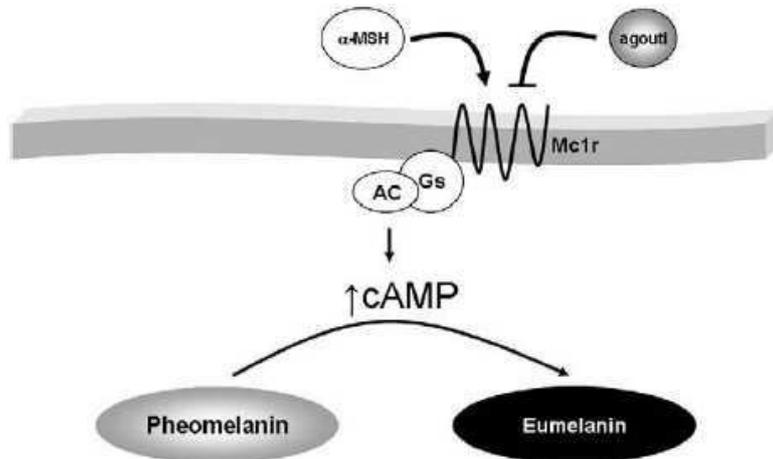


Figure 16B : Rôle de Mc1r (melanocortin-1-receptor)

Suite à la liaison de α -MSH sur son récepteur Mc1r couplé à une petite protéine G, l'activation de la voie AMP cyclique conduit à synthèse d'eumélanine à partir de phéomélanine. Les variants du gène MC1R augmentent l'accumulation de phéomélanine, moins photoréceptrice et associée à un risque plus élevé d'apparition de mélanome.

(D'après Nelson & Tsao, Clinics in Dermatology, 2009)

Les protéines p14^{ARF} et p16^{INK4A} sont issues de phases de lecture alternatives et d'épissage alternatif et synthétisées à partir de deux promoteurs différents. La protéine p16^{INK4A} a pour fonction d'inhiber la phosphorylation de Retinoblastome (Rb) par la Cdk4 (Cyclin-dependent kinase 4) (Fig.16A). Le rôle p16^{INK4A} est donc de garder Rb dans son état actif (déphosphorylé) permettant la fixation et l'inhibition par Rb du facteur de transcription E2F, ce qui empêche le passage de la cellule en phase S. La protéine p14^{ARF} inhibe l'ubiquitine ligase HDM2 qui est impliquée dans la dégradation de p53 (Fig.16A). Les mutations du gène CDKN2A provoquent donc l'inactivation de Rb et la dégradation massive de p53. Les cellules peuvent alors franchir la transition G1/S sans contrôle car il n'y a plus de régulation exercée normalement par Rb et E2F. De plus l'absence de p53 mène à une instabilité génétique car p53 permet la réparation des dommages à l'ADN et l'activation de l'apoptose si l'ADN ne peut être réparé. Une étude récente effectuée par le consortium international GeoMEL sur 385 familles à « haut-risque » (au moins trois membres diagnostiqués pour un mélanome) a montré que 39% de ces familles présentent une mutation du locus CDKN2A. Il est intéressant de noter que les fréquences de mutations varient selon la localisation géographique ; en Australie 20% des familles ont des mutations CDKN2A contre 45% en Amérique du nord et 57% en Europe. Les porteurs d'une mutation germinale du locus CDKN2A ne vont pas tous développer de mélanome. En moyenne la pénétrance des mutations CDKN2A est de 30% à l'âge de 50 ans et de 67% à l'âge de 80 ans. Les mutations du locus CDKN2A sont ainsi les mutations associées au plus fort risque de formation de mélanomes. Certains cas familiaux sont également dus à des mutations en aval de CDKN2A, dans les gènes CDK4 ou RB1. (Nelson and Tsao 2009)

Le récepteur melanocortin-1 (Mc1r) couplé à une protéine G, qui est présent à la surface des mélanocytes, joue un rôle clef dans la régulation de la pigmentation de la peau. Lors de la liaison de son ligand α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), secrété par les kératinocytes, la protéine G couplée à Mc1r active l'adénylate cyclase (AC) et la voie de l'AMPc (Fig.16B) qui aboutit à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (c-AMP responsive element-binding) induisant la transcription du gène MITF (microphthalmia-associated transcription factor). Mitf, facteur de transcription clef de la différenciation des mélanocytes, induit entre autre la production d'enzyme mélanogéniques dont la tyrosinase, tyrosine-related protein 1 (TRP1) and tyrosine-related protein 2 (TRP2). Ces enzymes permettent la synthèse des pigments de mélanine et plus particulièrement la production des eumélanines (pigments brun à noir) à partir des phéomélanines (pigments jaune à rouge) au sein des mélanosomes (Fig.16B). Les variants du gène MC1R entraînent une diminution de la production des eumélanines au profit de celle des phéomélanines, peu photoprotectrices, facilitant en cela la survenue d'altérations photo-induites. En effet, le phénotype des porteurs

d'un variant MC1R est communément une chevelure rousse associée à une très grande sensibilité au soleil. Il existe un grand polymorphisme du gène MC1R dans la population caucasienne : environ 30 variants ont été rapportés, parmi lesquels 9 sont associés à des pertes fonctionnelles. Des variants de MC1R ont été retrouvés en France chez 68 % des patients atteints de mélanome, contre 31 % dans un groupe contrôle. (Dalle, Martin-Denavit et al. 2006; Nelson and Tsao 2009)

- Prévention, diagnostic et pronostic

Au vu de la dangerosité du mélanome métastatique et du manque de traitements appropriés, la prévention du mélanome passe par des contrôles réguliers chez un dermatologue et un diagnostic précoce. Il est vrai qu'environ 90% des mélanomes est diagnostiqué au stade de tumeur primaire, sans preuve de métastases, et que le taux de survie à 10 ans est ainsi de 75-85%. (Garbe, Peris et al. 2010)

La règle « ABCD » mise au point par Friedman et al en 1985 est largement utilisée pour identifier les naevi susceptibles d'évoluer en mélanome (Friedman and Rigel 1985).

Les critères de la règle « ABCD » sont les suivants (Fig17A):

- A pour Asymétrie : les deux moitiés du grain de beauté n'ont pas la même forme.
- B pour Bord : les bords du grain de beauté sont irréguliers, et mal définis.
- C pour Couleur : la couleur varie d'une zone du naevus à l'autre
- D pour Diamètre : le diamètre est supérieur à 6 mm.

Cette règle s'est révélée très utile pour le diagnostic mais ne permet pas d'identifier tous les naevi suspects. En effet, les récents changements dans l'aspect d'un naevus constituent un critère crucial pour établir un diagnostic clinique du mélanome. Il a ainsi été ajouté la lettre « E » pour évolution à la règle « ABCD » (Fig17A). Une fois un mélanome identifié on établit un pronostic en tenant compte du système « TNM » institué par la commission AJCC (American Joint Commission on Cancer).

Le système « TNM » qui permet de déterminer le stade du mélanome repose sur les indications suivantes :

- T pour Tumeur : la tumeur est plus ou moins profonde (stades T0 à T4) et peut être non ulcérée (a) ou ulcérée (b). La profondeur est établie par la mesure de l'épaisseur de la biopsie de la tumeur, une technique que l'on nomme : mesure de Breslow (Fig17B) (Breslow 1970). Plus la tumeur est fine et meilleur est le pronostic car elle a moins de risque de métastaser (Fig17B).

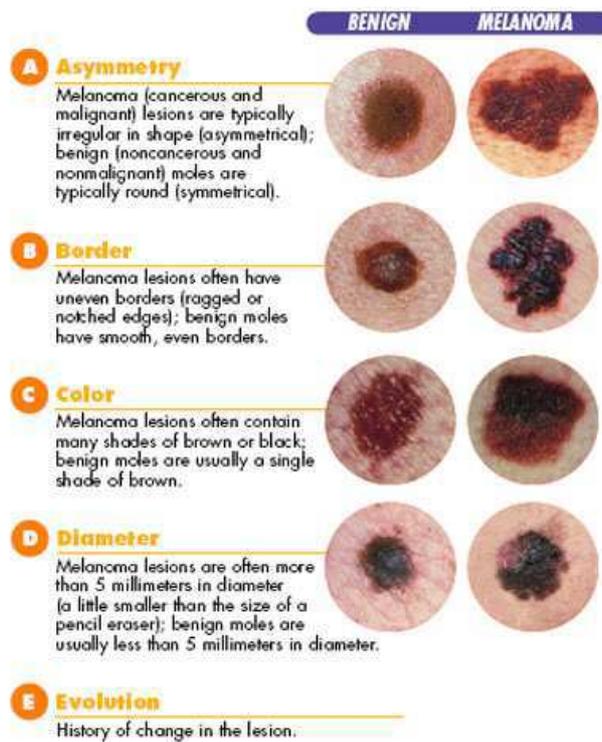


Figure 17A : La règle ABCDE

Les critères de diagnostic ABCDE aident à identifier un mélanome par son asymétrie (A), ses bords irréguliers (B), sa couleur hétérogène (C), son grand diamètre (D) et par son évolution au cours du temps (E).

Source : Philip A. Bryant Melanoma Foundation (<http://www.pab40foundation.org/facts.html>)

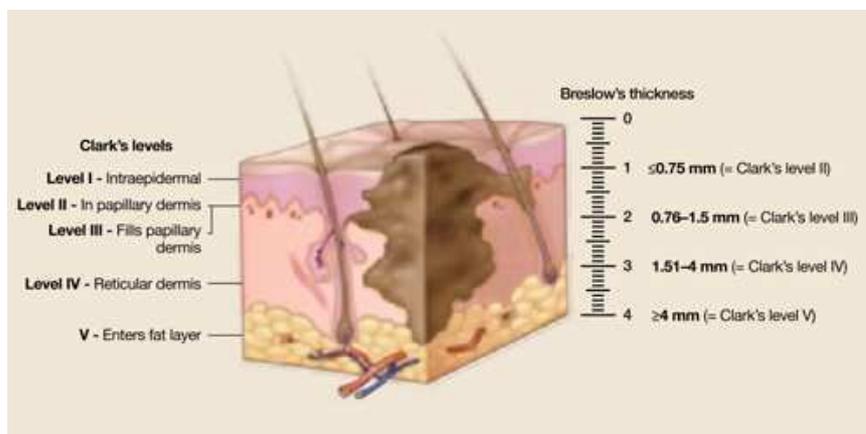


Figure 17B : La profondeur du mélanome comme outil de pronostic

Le pronostic clinique du mélanome permet d'établir un stade (ici stade de I à V selon l'échelle de Clark). La définition du stade est en fonction de la profondeur de la lésion qui est évaluée par la mesure de Breslow. Source : Lane, Dalton & Sanguenza 2007, Journal of Family Practice

- N pour Nodules lymphatiques : la dissémination de cellules de la tumeur aux nodules lymphatiques plus ou moins éloignés de la lésion (stades N0 à N3) est établie par une biopsie des nodules. Plus on retrouve des cellules de mélanomes dans des nodules éloignés plus le risque de métastases est grand.

- M pour Métastase : la présence de métastases plus ou moins distantes au niveau de la peau ou d'autres organes (stades M0-M1a à b) est recherchée pour déterminer la gravité du mélanome.

Source : « How is melanoma skin cancer staged ? », American Cancer Society, 2010

3. Les mélanocytes : précurseurs des mélanomes

Les mélanocytes, sont les cellules qui après transformation maligne donnent naissance aux mélanomes. L'approfondissement des voies de signalisation impliquées dans leur développement, leur fonction ainsi que leurs interactions avec le micro-environnement est essentiel à la compréhension de leur transformation tumorale et des caractéristiques intrinsèques des mélanomes.

a) Le développement physiologique des mélanocytes

- Les cellules de la crête neurale

Les mélanocytes sont issus de cellules à fort potentiel migratoire : les cellules de la crête neurale (NCCs pour Neural Crest Cells). Les NCCs sont des cellules ectodermiques de la région la plus dorsale du tube neural en formation. Lors de la fermeture du tube neural, les NCCs perdent le contact avec les autres cellules épithéliales et se détachent du tube neural après une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Ernfors 2010). Ce phénomène est induit par des signaux BMP (Bone Morphogenic Protein) et Wnt présents dans le tube neural dorsal et l'ectoderme qui recouvre le tube neural. En aval de ces facteurs la signalisation résulte en une diminution de l'expression des Cadhérines, une augmentation de l'expression de RhoB accompagnés d'une réorganisation du cytosquelette et des propriétés d'adhésion cellulaire rendant ainsi les cellules très motiles (Ernfors 2010). Ces signalisations résultent également en l'expression de facteurs de transcription spécifiques de la crête neurale qui vont permettre de définir les NCCs tels que Slug/Snail, Sox10, FoxD3 et Pax3 (Ernfors 2010). Les facteurs exprimés le plus précocement sont Sox10 et Pax3 qui sont présents dans la région dorsale du tube neurale avant la délamination et jouent un rôle important dans la détermination du lignage de la crête neurale. Sox10 est particulièrement responsable du maintien de la pluripotence des NCCs. En effet, en plus des mélanocytes, les NCCs génèrent de nombreux de types cellulaires allant des cellules gliales aux cellules du système nerveux périphérique (SNP)

en passant par les neurones entériques, les cellules musculaires lisses et les cellules du cartilage craniofacial (Ernfors 2010). La trajectoire qu'empreinte les NCCs est étroitement liée à leur devenir (Fig18). Un devenir de mélanocytes a été décrit pour les NCCs migrant sous l'éctoderme par une voie dorso-laterale tandis que les NCCs empreintant un trajet ventral deviendront des neurones et des cellules gliales du SNP (aussi appelées les SCPs pour Schwann cells precursors) (Fig18) (Ernfors 2010). Récemment Adameyko et al. ont mis en évidence un autre voie de migration des mélanoblastes (précurseurs des mélanocytes) en marquant la population Sox10+/Mitf+ dans l'embryon de poulet (Adameyko, Lallemand et al. 2009). Il a ainsi observé que de nombreux mélanoblastes étaient dérivées des SCPs (Fig18) ayant d'abord migré ventralement, puis le long des nerfs qui innervent la peau pour rejoindre l'épiderme.

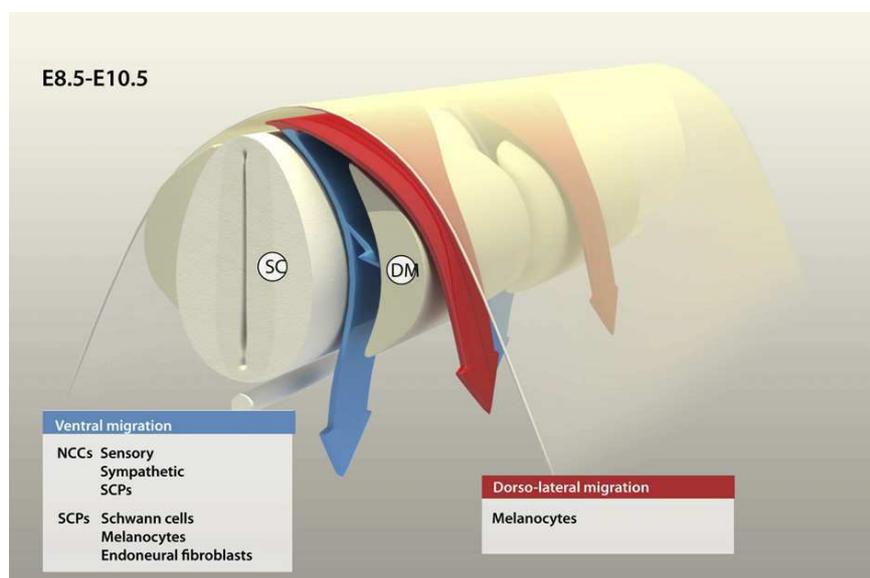


Figure 18 : Migration des cellules de la crête neurale (NCCs)

Les mélanocytes se différencient au cours d'une migration dorso-latérale et d'une migration ventrale avec les autres NCCs avant de rejoindre l'épiderme primitif le long des nerfs.

(D'après Enfors, Experimental Cell Res, 2010)

- La différenciation du lignage mélanocytaire

La différenciation des NCCs en mélanoblastes va s'effectuer entre la délamination et la migration pour rejoindre l'épiderme. Comme suite aux signalisations Wnt et BMP, Pax3 va induire l'expression du facteur de transcription FoxD3 (Forkhead Box protein D3) dans certaines NCCs (Thomas and Erickson 2008). FoxD3 tient une place importante à différentes étapes du développement précoce des mammifères. Sa régulation n'est pas entièrement élucidée mais il semble jouer un rôle central dans l'étape de spécification d'une NCC bipotente glie/mélanoblaste à un destin de mélanoblaste (Thomas and Erickson 2008). Diverses études

ont montré que son expression va réprimer la mélanogénèse. FoxD3 a une activité de répresseur transcriptionnel direct du gène *Mitf*, acteur crucial de la spécification et de la survie des mélanoblastes. L'expression de *Mitf* est induite précocément par les facteurs de transcription *Sox10* et *Pax3* dans les NCCs FoxD3 négatives (Thomas and Erickson 2008). La voie Wnt permet également d'activer l'expression de *Mitf*. En effet, β -caténine a été trouvé au niveau du promoteur de *Mitf* associé aux membres de la famille de facteurs de transcription LEF/Tcf et agissant de concert avec *Sox10* et *Pax3* pour réguler l'expression de *Mitf* (Larue, Kumasaka et al. 2003). Celui-ci va ensuite induire la transcription d'une cascade de gènes qui vont conférer aux cellules leurs caractéristiques de mélanocytes. En effet, *Mitf* contrôle l'expression de gènes clefs pour la synthèse de mélanine. Il va ainsi déclencher l'expression de *Dct* (dopachrome tautomerase/ tyrosinase-related protein-2) puis celle de *TRP-1* (tyrosinase-related protein-1) et enfin celle de la tyrosinase (Thomas and Erickson 2008). *Mitf* contrôle également la survie et la croissance des mélanocytes au cours de leur migration en induisant l'expression de protéines comme *Bcl-2* (anti-apoptotique), *Cdk2* (inducteur de la transition G1/S) et en inhibant *p21* et *p27* (inhibitrices de la transition G1/S) (Thomas and Erickson 2008). La plupart des études montrent à ce jour un rôle central de *Mitf* dans le développement des mélanocytes. Cette hypothèse avait été posée à la suite de l'étude d'une souris déficiente pour *Mitf* qui présentait une perte de pigmentation des poils, de petits yeux (microphthalmie) et une surdité précoce (Hodgkinson, Moore et al. 1993). Ces phénotypes (à l'exception de la microphthalmie) correspondent aux atteintes des patients souffrant des syndromes de Waardenburg type IIa et Tietz qui présentent des mutations du gène *Mitf*. L'analyse histologique des souris ayant révélé une absence de mélanocytes, on en conclut un rôle de *Mitf* dans le développement et la survie des mélanocytes (Cheli, Ohanna et al. 2010).

- Localisation dans l'épiderme : « cell homing »

Suite à leur migration, les mélanocytes cutanés vont rejoindre l'épiderme et les bulbes pileux. Le fait qu'ils retrouvent leur chemin jusqu'à l'épiderme constitue la notion de « cell homing », c'est-à-dire que certains signaux, les « homing factors », sont diffusés par les tissus d'accueil des mélanocytes (Ernfors 2010). Ceci permet également d'expliquer comment les mélanocytes issus des SCPs, qui migrent d'abord ventralement, vont pouvoir rejoindre leur place en migrant le long des fibres nerveuses qui innervent la peau. Ces facteurs incluraient l'Endothéline-3 (ET-3), le Stem cell factor (SCF, ligand de c-Kit), basic Fibroblast growth factor (bFGF ou FGF-2), le Hepatocyte growth factor (HGF) et la signalisation Wnt (Ernfors 2010). Tous ces facteurs sont déjà impliqués dans la régulation de la migration des mélanocytes et certaines études vont dans le sens des « homing factors » au moins concernant ET-3, SCF et HGF (Ernfors 2010).

Chez l'Homme, la migration des mélanocytes a lieu entre la 10^{ème} et la 14^{ème} semaine de développement embryonnaire (Costin and Hearing 2007). Les mélanocytes vont ainsi occuper leur rôle au sein de l'épiderme tout en conservant les caractéristiques de migration et de survie qu'ils ont acquises au cours de leur différenciation.

b) L'homéostasie épidermique

La pigmentation de la peau est la principale protection contre les rayons UV. Cette pigmentation résulte de la synthèse de la mélanine, dans les mélanosomes organites spécialisés des mélanocytes, et de son transfert aux kératinocytes. La mélanine joue le rôle d'un filtre qui limite la pénétration des UV dans l'épiderme. Elle est également capable de séquestrer les EAO induits par les UV qui risqueraient de provoquer une peroxydation lipidique ou encore des altérations de l'ADN et des protéines. Une exposition prolongée aux UV mène à la mort cellulaire du fait d'altérations de l'ADN non réparées. Or les mélanocytes qui présentent une faible capacité de prolifération jouent un rôle crucial au sein de l'épiderme. Leur survie et donc leur résistance à l'apoptose se doivent d'être assurées. Ce sont les kératinocytes qui vont assurer cette fonction. L'organisation de l'épiderme repose ainsi sur l'interaction symbiotique entre un mélanocyte et ses kératinocytes voisins qui forment une « unité mélanocytaire épidermique » (pour « epidermal melanin unit ») décrite la première fois en 1963 par Fitzpatrick et Breathnach (Fitzpatrick and Breathnach 1963).

L'exposition de la peau aux rayons UV, va induire la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines par les kératinocytes qui permettent une régulation paracrine des mélanocytes (Fig.19). (Haass, Smalley et al. 2004; Kadokaro, Kavanagh et al. 2005; Abdel-Malek, Kadokaro et al. 2010). Parmi les cytokines secrétées par les kératinocytes se trouvent : α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), Endothéline-1 (ET-1), Stem cell factor (SCF), Neural growth factor (NGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF ou FGF-2) et Hepatocyte growth factor (HGF) (Gilchrist, Park et al. 1996). L'ensemble de ces facteurs permet d'induire chez les mélanocytes : la division mitotique, la synthèse de mélanine et la formation de dendrites. Leurs rôles ne s'arrêtent pas là car ils favorisent la survie des mélanocytes en garantissant la stabilité génomique, en activant des voies de survie et en inhibant l'apoptose (Fig.19). En effet, la signalisation induite par la α -MSH a un rôle dans la réparation de l'ADN (Nucleotide Excision Repair) (Dong, Wen et al. 2010). De plus les signalisations α -MSH et ET-1 permettent la diminution des dommages induits par les EAO en inhibant leur production (Kadokaro, Kavanagh et al. 2005). Les cytokines secrétées par les kératinocytes sont responsables de l'activation de voies de signalisation pro-survie et anti-apoptotique : les voies Ras/Raf/Mek/Erk et PI3K/Akt (Kadokaro, Kavanagh et al. 2005). L'activation de ces voies se

fait de façon directe via un récepteur tyrosine-kinase (c-Kit : récepteur de SCF ; TRK-A : récepteur du NGF ; FGFR1 : récepteur de FGF-2 dans les mélanocytes et c-Met : récepteur du HGF) ou indirectement via la voie AMP cyclique (AMPC) pour les récepteur liés à une protéine G (MC1R : récepteur de α -MSH et ETBR : récepteur de ET-1 dans les mélanocytes) (Abdel-Malek, Kadarko et al. 2010). La signalisation AMPC induite via les récepteurs MC1R et ETBR ainsi que l'activation de voies MAP kinases (voies Erk et Akt) induisent une augmentation de l'expression et de l'activité du facteur de transcription Mitf. Un des gènes cible de Mitf code pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui est effectivement fortement exprimée dans la lignée mélanocytaire et contribue largement à la résistance des mélanomes à la mort cellulaire.

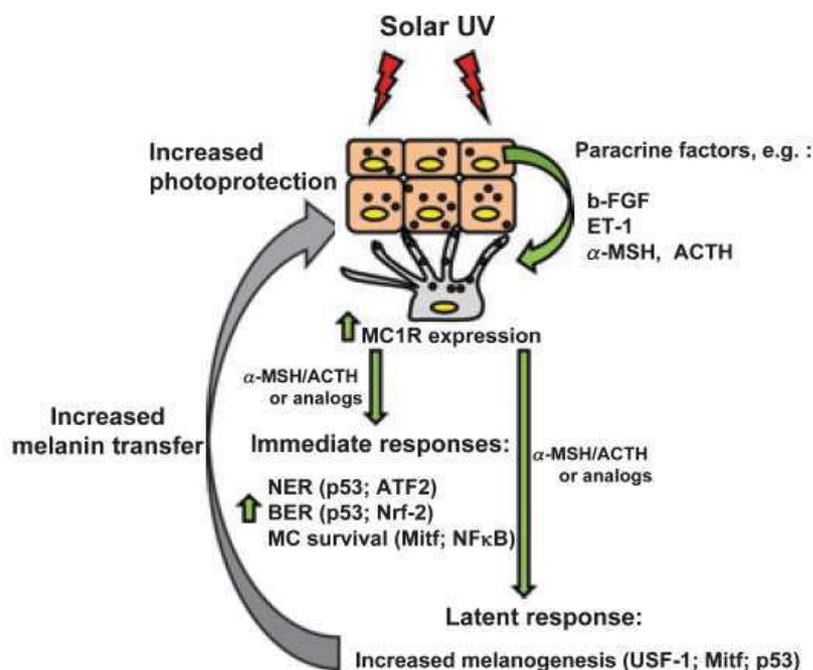


Figure 19 : Interaction kératinocyte-mélanocytes en réponse aux UV

Les rayons UVs induisent la sécrétion paracrine de facteurs tels b-FGF, ET-1, et ACTH (adrenocorticotrop hormone) par les kératinocytes. La réponse immédiate des mélanocytes implique l'activation des facteurs de transcription Mitf, ATF2, Nrf-2 et p53 ce qui mène à l'arrêt du cycle cellulaire, l'activation d'antioxydants et de la réparation de l'ADN et la régulation de l'apoptose pour préserver l'intégrité génomique et la assurer la survie. L'activation de ces facteurs de transcription mène à la 2^{ème} phase de la réponse avec l'activation de la mélanogénèse pour assurer la photoprotection de l'épiderme.

NER : « Nucleotide excision repair » ; BER : « Base excision repair » ; MC : mélanocyte

(D'après Abdel-Malek et al., Pigment Cell Melan Res, 2010)

D'autres protéines sont impliquées dans le maintien de l'architecture de l'épiderme comme les cadhérines qui ont un rôle central dans les jonctions inter-cellulaires. Les mélanocytes et les kératinocytes adjacents interagissent principalement via la E-cadhérine qui est une molécule critique dans la médiation du contrôle des mélanocytes par les kératinocytes. Les intégrines constituent une autre famille de protéines d'adhérence qui vont, elles, permettre aux mélanocytes de lier la matrice extracellulaire et ainsi finir d'assurer leur localisation au niveau de la couche basale de l'épiderme.

c) Le développement pathologique des mélanocytes : « mélanomagenèse »

La progression cancéreuse présente des caractéristiques identiques à celles du développement. Les mélanomes font preuve d'une forte prolifération et d'une importante motilité tout comme leurs précurseurs au cours de l'embryogenèse. Ceci est dû à l'addition de dérégulations et de mutations somatiques qui vont accentuer la prolifération et la résistance des mélanocytes tout en lui permettant d'échapper au contrôle des kératinocytes.

- La dérégulation de l'unité mélanocytaire épidermique

La dérégulation de l'homéostasie de l'épiderme a pour conséquence un déséquilibre de la balance de l'unité mélanocytaire épidermique (Haass and Herlyn 2005). Il en résulte une prolifération continue des mélanocytes qui peut mener au développement d'un mélanome.

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle critique des interactions cellule à cellule via la E-cadhérine dans la régulation des mélanocytes par les kératinocytes (Johnson 1999; Haass, Smalley et al. 2004; Haass and Herlyn 2005). L'expression de la E-cadhérine va de pair avec le maintien de l'homéostasie de la peau, tandis qu'une diminution de la E-cadhérine ou l'expression d'une autre isoforme semble jouer un rôle dans la progression tumorale (Hsu, Wheelock et al. 1996; Haass, Smalley et al. 2004). En effet, de nombreux mélanomes ont perdu l'expression de la E-cadhérine et exprime à la place la N-cadhérine. Ce changement d'isoforme est responsable d'un changement d'interactions des mélanocytes (Haass, Smalley et al. 2004). Ils n'interagissent plus avec les kératinocytes mais avec les fibroblastes et les cellules endothéliales vasculaires. La perte de la E-cadhérine semble donc être l'étape la plus critique dans la progression du mélanome. De plus l'augmentation de la N-cadhérine est lié à une activation de la voie de survie PI3-kinase (PI3K) (Li, Satyamoorthy et al. 2001). Le changement de cadhérine confère donc un avantage pour la prolifération et la résistance à l'apoptose du mélanome (Li, Satyamoorthy et al. 2001). Cet évènement pourrait être régulé par la famille de facteurs de transcription Snail qui contrôle la transition épithélio-mésenchymateuse, phénomène caractérisé par une perte de la E-cadhérine (Haass, Smalley et

al. 2004). Il a été montré que Snail est exprimé dans les mélanomes et pas dans les mélanocytes et que son niveau d'expression est corrélé avec la perte de la E-cadhérine.

La régulation de l'unité mélanocytaire épidermique a également une composante de signalisation paracrine. Lors de la perte d'interaction entre mélanocytes et kératinocytes le manque de facteurs de croissance (HGF, FGF-2, SCF...) pourrait être mortel pour les cellules de mélanome (Lazar-Molnar, Hegyesi et al. 2000). Les cellules qui acquièrent une signalisation autocrine sont celles qui survivront. On observe ainsi chez les cellules de mélanome une synthèse accrue de facteurs de croissance, d'endothélines 1 et 3 et du récepteur de ces endothélines (ETBR) (Saldana-Caboverde and Kos 2010). Les cellules de mélanomes sont donc indépendantes des kératinocytes pour leur survie. Le gène *Mitf*, responsable de la survie et de la différenciation des mélanocytes, joue aussi un rôle dans le développement du mélanome. En effet, il est surexprimé dans de nombreux mélanomes et est considéré comme un oncogène (Garraway, Widlund et al. 2005). Il est ainsi impliqué dans la survie et la progression dans le cycle cellulaire des mélanomes.

- Les mutations somatiques

Comme pour tout cancer, la progression tumorale du mélanome est associée à une succession de mutations somatiques. Ces mutations sont très souvent différentes des mutations germinales identifiées dans les cas familiaux de mélanome (Haluska, Tsao et al. 2006). De plus elles peuvent apparaître au niveau de lésions bénignes (naevi) et également sur de la peau « normale », on parle alors de mélanome *de novo* (Takata, Murata et al. 2010). Les mutations les plus fréquentes concernent les gènes codant des kinases de la voie de survie Ras/Raf/Mek/Erk (80% des tumeurs) (Fig.20) (Soengas and Lowe 2003; Uong and Zon 2010). Le reste des mutations est constitué par des mutations de la voie PI3K/Akt, du gène *CDKN2A* (mutations germinales très fréquentes dans les cas familiaux) et du gène *c-Kit* (Fig.20) (Soengas and Lowe 2003; Uong and Zon 2010). Il existe des mutations somatiques du gène *CDKN2A* mais elles sont peu fréquentes et apparaissent tardivement dans la progression du mélanome (Uong and Zon 2010). Certaines mutations du gène codant le récepteur *c-Kit* sont décrites mais elles sont surtout fréquentes au niveau des régions non exposées au soleil (muqueuses, paumes et plantes de pied) (Uong and Zon 2010). Les mutations de la voie de survie PI3K/Akt sont en fait localisées essentiellement dans le gène *PTEN* qui est un inhibiteur de l'activation d'Akt (Haluska, Tsao et al. 2006). *PTEN* est un gène suppresseur de tumeurs souvent altéré dans les gliomes et les mélanomes. Il est localisé dans la région chromosomique 10q23-24.

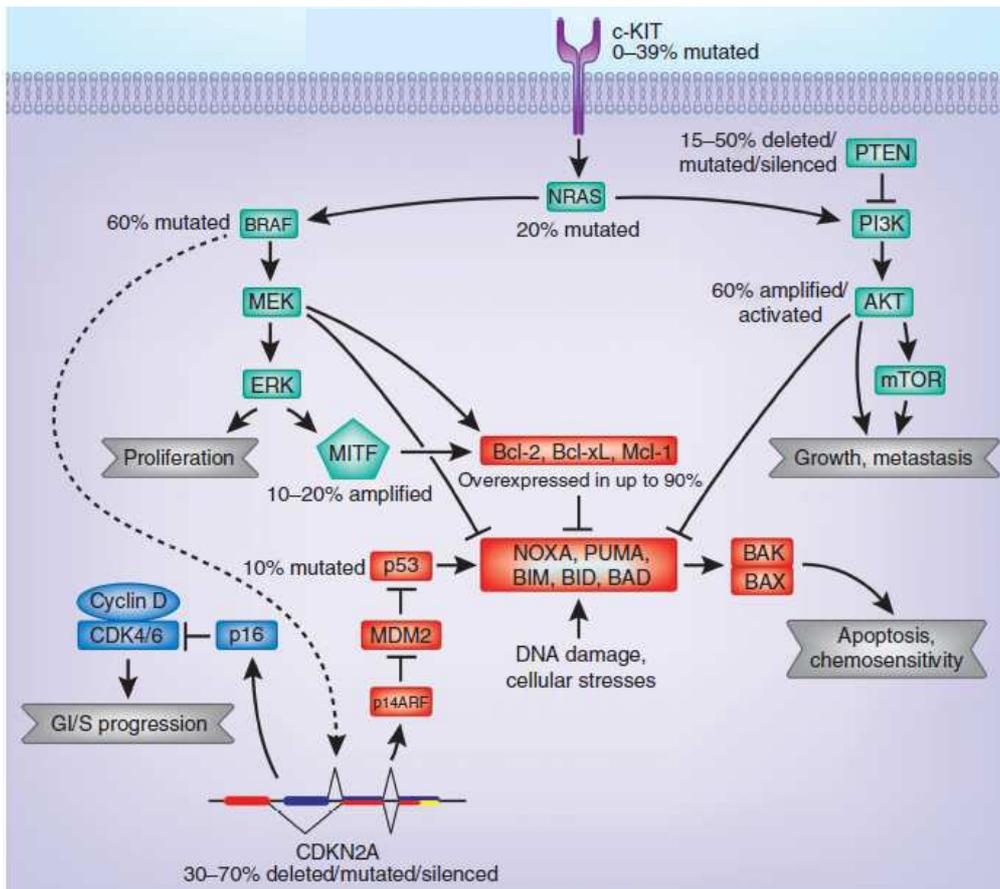


Figure 20 : Mutations et dérégulations dans la transformation des mélanomes

Schémas des réseaux de signalisation impliqués dans la transformation maligne des mélanocytes en mélanomes. En vert, les voies MAPK et PI3K/Akt, qui présentent la majorité des mutations, permettent la prolifération, survie et la progression des mélanomes. Les mutations du locus CDKN2A induisent la progression du cycle cellulaire (bleu) et l'inhibition du réseau p53/Bcl-2 impliqué dans le déclenchement de l'apoptose. Les protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 sont fortement exprimées ce qui contribue à l'inhibition de l'apoptose.

(D'après Hocker, Singh et Tsao, J Invest Dermatol, 2008)

Les mutations les plus fréquentes et les plus précoces impliquées dans la transformation du mélanocyte en mélanome touchent deux protéines de la voie Ras/Raf/Mek/Erk : Ras et Raf (Fig.20) (Haluska, Tsao et al. 2006; Solit and Rosen 2010). Il existe chez l'Homme une famille de gènes RAS, parmi lesquels : NRAS, HRAS et KRAS. NRAS est le plus souvent muté dans les mélanomes (<20% des mélanomes). Les altérations de NRAS induisent une activation constitutive de la voie de signalisation MAP kinase. D'autres mutations beaucoup plus fréquentes sont responsables de l'activation de la voie Ras. Il s'agit de mutations causant une activation constitutive de la protéine Raf (>60% des mélanomes). La protéine sérine thréonine kinase cytoplasmique Raf présente trois isoformes chez les mammifères : A-Raf, B-Raf et C-Raf codées par trois gènes différents : ARAF, BRAF et CRAF. B-Raf est la protéine kinase la plus souvent mutée dans les cancers (Greenman, Stephens et al. 2007) et elle se trouve mutée dans près de 60% des mélanomes (Davies, Bignell et al. 2002).

II- Caractéristiques et thérapies du mélanome

1. Les caractéristiques du mélanome

Le mélanome est connu comme l'un des cancers les plus agressifs (comme nous l'avons vu précédemment cf. I- 2. b)). L'origine de ces caractéristiques particulières est à rechercher dans les capacités des cellules dont les mélanomes sont issus ; les mélanocytes. Lors de leur différenciation, les précurseurs des mélanocytes doivent migrer depuis la crête neurale jusque dans l'épiderme primitif (voir paragraphe I- 3. a)). Cette migration va sélectionner les cellules les plus motiles et plus résistantes. Les mélanocytes présents dans l'épiderme sont le résultat de cette sélection. Ils présentent donc des capacités migratoires intrinsèques. De plus la résistance à la mort cellulaire, acquise lors de leur différenciation est accrue par l'interaction avec les kératinocytes (activation de voies pro-survie et anti-apoptotique cf. I- 3. b)). Ces particularités des mélanocytes sont amplifiées par la reprogrammation des voies de prolifération et de survie au cours de la transformation maligne de certains mélanocytes en mélanomes. Il en résulte une inefficacité des traitements par chimio, radio et immunothérapies actuellement disponibles (Soengas and Lowe 2003).

Nous nous intéresserons d'abord aux propriétés migratoires des cellules de mélanome (paragraphe a)) avant de nous attarder sur les mécanismes de résistance à la mort cellulaire spécifiques aux mélanomes (paragraphe b)). La partie 2. sera consacrée à de nouvelles approches thérapeutiques élaborées pour contrer l'agressivité des mélanomes.

a) La capacité métastatique

- Les métastases

Les métastases correspondent à la dispersion des cellules cancéreuses à partir du site primaire de la tumeur vers des organes distants. Elles sont responsables de plus de 90% de mort chez les patients atteints de tumeurs solides (Gupta and Massague 2006). L'expérience des cliniciens ainsi que les études in vivo ont démontré que les événements métastatiques sont rares et interviennent longtemps après l'identification de la tumeur primaire. En effet, un tel processus nécessite la sélection de traits particuliers. Les mécanismes de formation des métastases ne sont pas complètement élucidés, cependant ils reposent sur la capacité d'une petite population de cellules de la tumeur primaire à (1) perdre l'adhésion cellulaire, (2) augmenter leur motilité, (3) entrer et survivre au sein de la circulation, (4) sortir de la circulation et aller coloniser un nouveau site (Gupta and Massague 2006). La progression tumorale et la formation de métastases relève donc d'un processus séquentiel (Chambers, Groom et al. 2002; Steeg 2006). On considérait également que les gènes impliqués dans la formation de la tumeur primaire (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur) étaient activés/invalidés précocement tandis que les gènes impliqués dans la formation de métastases étaient activés tardivement (Poste and Fidler 1980). Plus récemment, un nouveau modèle présenté par les Dr René Bernards et Pr Robert A. Weinberg, propose que la capacité à métastaser serait acquise précocement au cours du développement tumoral (Bernards and Weinberg 2002). Le potentiel pour former des métastases serait déterminé par des mutations survenues pendant la formation de la tumeur primaire. Les auteurs expliquent que différentes voies de signalisation peuvent être altérées au cours de la cancérogenèse et qu'au sein de chaque voie un ensemble de gènes peuvent être touchés. Selon eux, la combinaison formée par les gènes touchés dans chaque voie détermine si une tumeur sera métastatique ou non. Ce modèle est en accord avec de nombreuses observations comme par exemple :

- le fait que certains oncogènes (Ras, Her-2 et Src) d'abord identifiés pour leur rôle dans la cancérogenèse participe également au profil métastatique (Chambers and Tuck 1993; Yu, Wang et al. 1994; Myoui, Nishimura et al. 2003)
- le fait que les protéases qui remodelent la matrice (comme urokinase plasmogen activator : uPA) et certaines métalloprotéases (MMPs) toutes impliquées dans la formation de métastase ont aussi un rôle dans les phases précoces de la formation tumorale (Egeblad and Werb 2002; Duffy 2004).

Cependant d'autres observations ne peuvent pas être expliquées par ce modèle. En effet, dans la majorité des cas la capacité à métastaser augmente avec la taille de la tumeur primaire, la taille des tumeurs étant largement utilisée comme marqueur de pronostic (Engel, Eckel et al. 2003). De plus, certains gènes ont été décrits pour contrôler uniquement l'étape de métastase

sans affecter la croissance des tumeurs primaires. Il s'agit des « metastasis-suppressor genes ». La perte de ces gènes joue un rôle critique dans la formation de métastases (Shevde and Welch 2003; Steeg 2003). Il est ainsi possible que, dans certains cas, des gènes activés précocement au cours de la cancérogenèse contribuent à la formation de métastases, tandis que dans d'autres cas les gènes impliqués dans la cancérogenèse ne conduisent pas à la formation de métastases (Duffy, McGowan et al. 2008). Les métastases apparaîtront donc suite à l'activation plus tardive de gènes spécifiques au développement des métastases (Duffy, McGowan et al. 2008). Il convient également de prendre en considération le rôle du microenvironnement tumoral. En effet, les cellules stromales comme les macrophages, mastocytes, fibroblastes et autres cellules endothéliales jouent un rôle critique, non seulement dans l'initiation de la cancérogenèse, mais également dans la progression tumorale et la formation de métastases (Bhowmick, Neilson et al. 2004; Mueller and Fusenig 2004; van Kempen, de Visser et al. 2006). Chez la souris, MMP-9 produit par des macrophages infiltrés est à l'origine de l'angiogenèse de tumeur de la peau (Coussens, Tinkle et al. 2000), des ovaires (Huang, Van Arsdall et al. 2002) et du cervix (Giraud, Inoue et al. 2004). Chez l'Homme, uPA et MMP-11 (aussi appelé stromelysin-3) localisés dans les cellules stromales sont des facteurs de mauvais pronostic importants des cancers du sein (Chenard, O'Siorain et al. 1996; Hewitt and Dano 1996; Duffy 2002). Ces études suggèrent que les cellules tumorales produisent des facteurs paracrines qui induisent chez les cellules stromales l'expression de protéases responsables de la progression tumorale. La perte et l'activation de l'expression de certains gènes dans les cellules stromales contribuent donc au développement de métastases.

- Mélanome et métastase

Les mélanomes présentent deux phases d'expansion : la phase radiale (RGP pour radial growth phase) et la phase verticale (VGP pour vertical growth phase) (Ossowski and Aguirre-Ghiso 2010). Lors de la RGP, les cellules de mélanome croissent au sein de l'épiderme. Lors de la VGP, certaines cellules de mélanome traversent la membrane basale de l'épiderme et pénètrent le derme où elles peuvent ainsi rejoindre la circulation sanguine (Ossowski and Aguirre-Ghiso 2010). Il est donc généralement admis que l'invasion et la dissémination caractéristiques de la métastase se produisent lors de la phase VGP. L'acquisition de ces propriétés par certaines cellules de la tumeur initiale est le résultat de l'accumulation et de la sélection de mutations spécifiques.

De nombreuses études ont entrepris d'identifier les gènes dont les mutations ou les changements d'expression seraient responsables de la progression du mélanome (Timar, Gyorffy et al. 2010). Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans l'initiation des mélanomes (BRAF, PTEN, CDKN2) ont été suspectés à tort (Timar, Gyorffy et

al. 2010). C'est l'expression de l'oncogène c-MET, indétectable dans les naevi, qui a d'abord été associée à une progression métastatique des mélanomes (Natali, Nicotra et al. 1993) puis corrélée à une invasion lymphatique et vasculaire des mélanomes (Cruz, Reis-Filho et al. 2003). Des amplifications du gène MITF, régulateur central de la différenciation des mélanocytes, ont été identifiés dans des mélanomes humains et corrèle avec la progression et la formation de métastases (Garraway, Widlund et al. 2005). L'activation de MITF est contrôlée par divers facteurs de transcription dont Slug (régulateur important de la transition épithélio-mésenchymateuse, TEM) et plusieurs voies de signalisation comme la voie des MAPK (très souvent activés dans les mélanomes) (Goding and Meyskens 2006) de même que WNT5A (également impliqué dans la TEM), dont l'expression est augmentée au cours de la progression des mélanomes (Weeraratna 2005). Certains mélanomes présentent des amplifications de l'EGFR (Udart, Utikal et al. 2001) et de l'oncogène c-MYC (Rodolfo, Daniotti et al. 2004). On note que les amplifications de l'EGFR contribuent au potentiel métastatique (Rakosy, Vizkeleti et al. 2007), tandis que les amplifications de c-MYC peuvent inhiber le potentiel métastatique (Ross, Laing et al. 2006). La progression des mélanomes et le développement des métastases requièrent l'acquisition d'un phénotype invasif ce qui explique l'activation de gènes impliqués dans la TEM. En effet, la métastase est l'une des manifestations pathologiques de la TEM (en opposition au rôle physiologique de la TEM au cours du développement embryonnaire) (Thiery 2002; Thiery, Acloque et al. 2009). Dans le cas des mélanomes on a bien perte d'expression de la E-cadherine (épithéliale) et expression de la N-cadhérine (mésenchymateuse) en association avec la progression métastatique (Danen, de Vries et al. 1996; Li, Satyamoorthy et al. 2001). Une augmentation de l'expression de TWIST, un facteur de transcription central dans la TEM, est associée à un mauvais pronostic (Hoek, Rimm et al. 2004).

Cinq études ont tenté de définir une signature d'expression génique des mélanomes métastatiques par l'utilisation de puces à ADN (Becker, Roesch et al. 2004; Wang, Panelli et al. 2004; Haqq, Nosrati et al. 2005; Jaeger, Koczan et al. 2007; Riker, Enkemann et al. 2008). Une de ces études n'a pas comparé les mélanomes métastatiques aux mélanomes primaires mais s'est concentrée sur une signature immunologique des mélanomes métastatiques (Wang, Panelli et al. 2004). Dans les quatre autres études, les auteurs comparent mélanomes métastatiques et primaires. Les auteurs de ces études ont identifiés de 7 à 308 gènes exprimés différemment entre mélanomes primaires et métastatiques. Ces gènes sont impliqués dans des fonctions allant de la régulation du cycle cellulaire à la communication intercellulaire et aux phénomènes d'adhérence. Dans la revue de Timar, Gyorffy et Raso, les données issues des études génomiques ont été analysées dans le but de compiler les résultats et d'établir une liste

unique des signatures d'expression génique du mélanome métastatique (Timar, Gyorffy et al. 2010). En totalité, 2475 gènes ont été associés aux mélanomes métastatiques parmi lesquels 350 gènes ont été identifiés dans plus d'une étude. Seuls 17 gènes sont retrouvés dans trois études et CDC28 a été identifié dans les quatre études. CDC28 est impliqué dans la régulation de l'activité des protéines kinases cycline-dépendantes au cours du cycle cellulaire. Le tableau 2 présente les 17 gènes associés par les auteurs à une signature d'expression génique du mélanome métastatique (Timar, Gyorffy et al. 2010). Ces gènes participent à diverses fonctions (Tableau 2).

Affymetrix ID	Genbank	UniGene	Gene title	Symbol	Gene ontology biological process
204170_s_at	NM_001827	Hs.83758	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2	CKS2	Regulation of cyclin-dependent protein kinase activity//cell cycle//spindle organization
206032_at	AI797281	Hs.41690	Desmocollin 3	DSC3	Cell adhesion
201984_s_at, 201983_s_at	NM_005228	Hs.488293	Epidermal growth factor receptor	EGFR	Ossification//electron transport//protein amino acid phosphorylation//response to stress
203968_s_at	NM_001254	Hs.405958	Cell division cycle 6 homolog	CDC6	DNA replication checkpoint//regulation of cyclin-dependent protein kinase activity//DNA replication
203081_at	NM_020248	Hs.463759	Catenin, beta interacting protein 1	CTNNB1P1	Regulation of transcription, DNA-dependent//signal transduction
202487_s_at	NM_012412	Hs.488189	H2A histone family, member V	H2AFV	Nucleosome assembly
218002_s_at	NM_004887	Hs.483444	Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	CXCL14	Chemotaxis//inflammatory response//immune response//signal transduction
206033_s_at	NM_001941	Hs.41690	Desmocollin 3	DSC3	Cell adhesion//homophilic cell adhesion
220445_s_at	NM_004909	Hs.522810	CSAG family, member 2///CSAG family, member 3B	CSAG2	Response to drug
205990_s_at	NM_003392	Hs.696364	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A	WNT5A	Signal transduction//Wnt receptor signaling pathway, calcium modulating pathway//JNK cascade
209875_s_at	M83248	Hs.313	Secreted phosphoprotein 1	SPP1	Ossification//cell adhesion//cell-matrix adhesion
219529_at	NM_004669	Hs.64746	Chloride intracellular channel 3	CLIC3	Transport//ion transport
210198_s_at	BC002665	Hs.1787	Proteolipid protein 1	PLP1	Synaptic transmission//axon ensheathment
203300_x_at	NM_003916	Hs.656471	Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	AP1S2	Protein complex assembly//transport//intracellular protein transport
205681_at	NM_004049	Hs.227817	BCL2-related protein A1	BCL2A1	Apoptosis//anti-apoptosis
220016_at	NM_024060	Hs.502756	AHNAK nucleoprotein	AHNAK	Nervous system development
204268_at	NM_005978	Hs.516484	S100 calcium binding protein A2	S100A2	Endothelial cell migration
204734_at	NM_002275	Hs.654570	Keratin 15	KRT15	Epidermis development

Tableau 2 : Signature d'expression génique du mélanome métastatique

Quatre études génomiques ont été réalisées par des équipes distinctes pour identifier des gènes dont l'expression varie dans les mélanomes métastatiques par rapport aux mélanomes primaires. La revue de Timar et al tente de compiler les données générées par ces études pour mettre en évidence une signature générale du mélanome métastatique malgré l'hétérogénéité des échantillons testés. Ce tableau rassemble les 17 gènes dont l'expression varie dans au moins trois études sur les quatre explorées ainsi que la fonction cellulaire dans laquelle ils sont impliqués.

(D'après Timar et al., Clin Exp Metastasis, 2010)

DSC3 est une molécule d'adhérence impliquée dans la communication mélanocyte-kératinocyte ce qui suggère l'importance de ce gène dans l'acquisition du phénotype invasif et la transition RGP/VGP (Schmitt, Franke et al. 2007). Les phases précoces de la formation de métastases nécessitent l'altération de la prolifération cellulaire (Rodolfo, Daniotti et al. 2004; Ross, Laing et al. 2006), d'où une implication de régulateurs du cycle cellulaire comme CDC28 et CDC6. L'implication des cellules stromales dans les phases précoces de l'invasion est indiquée par la présence de CXCL14 dans la signature.

On note également l'implication de la voie WNT/ β -caténine (CTNNBIP1 et WNT5A) et celle de Bcl-2 qui sont déjà documentées dans la littérature (voir (McGill, Horstmann et al. 2002; Mikhail, Velazquez et al. 2005; Weeraratna 2005)).

Les premières études sur les métastases ont pour la plupart été réalisées dans des modèles de mélanomes. Cependant, la pléthore de données n'a pas permis une application en thérapie du mélanome, sans doute à cause de l'hétérogénéité caractéristique de ce cancer.

- Les cellules souches cancéreuses et le mélanome

La formation de métastases est admise comme une étape tardive, mais plusieurs études, notamment sur le cancer du sein, ont mis en évidence des similarités dans les profils d'expression de gènes entre les tumeurs primaires et leurs métastases (Weigelt, Glas et al. 2003; Weigelt, Hu et al. 2005)). Ces observations soulèvent la possibilité que la capacité à métastaser est déterminée au début du développement tumoral (ce qui conforte le modèle de Bernards & Weinberg, présenté précédemment dans « - Les métastases »). (Xu, Shen et al. 2008) Pour le mélanome également, on ne peut exclure une dissémination précoce des cellules. L'expérience clinique a d'ailleurs prouvé que la dissémination peut précéder le diagnostic de la tumeur primaire (Braun, Vogl et al. 2005). L'idée d'une petite population cellulaire présente dans la tumeur primaire qui donne naissance à des métastases correspond au modèle de cellules souches cancéreuses (CSCs pour « cancer stem cells »). Il s'agit d'un modèle validé récemment qui explique l'initiation, la propagation et la résistance tumorale par un petit groupe de cellules au sein de la tumeur primaire qui possèdent des propriétés d'auto-renouvellement comparables à celles de cellules souches pluripotentes (Wang and Dick 2005). D'abord identifiées dans les leucémies (Hamburger and Salmon 1977; Lapidot, Sirard et al. 1994; Bonnet and Dick 1997), les CSCs ont été décrites dans des tumeurs solides comme le cancer du sein (Dick 2003) et du cerveau (Singh, Hawkins et al. 2004). Les mélanomes présentent une grande hétérogénéité intra-tumorale et des propriétés de cellules non-différenciées ce qui suggère l'existence de MMSCs (« Malignant Melanoma Stem Cells »). Ces MMSCs seraient issues de la transformation de cellules souches de mélanocytes et participeraient à l'initiation et la progression des mélanomes (Schatton and Frank 2008). Malgré le nombre d'études

enregistrées depuis le début des années 2000, en 2008 aucune n'avait identifié une sous-population de MMSCs présentant des marqueurs moléculaires précis, la capacité à s'auto-renouveler et à initier une tumeur après xélogreffe dans des souris immunodéficientes (Schatten and Frank 2008). En 2008, l'équipe du Dr Morrison identifie comme la cause de ses résultats les souris utilisées (NOD/SCID pour non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency) dont le faible système immunitaire suffirait à sous-estimer le potentiel invasif des MMSCs (Quintana, Shackleton et al. 2008). Ils préconisent l'utilisation des souris NOD/SCID *il2r γ -/-* (déficients en lymphocytes B, T et Natural Killer) qui leur ont permis d'augmenter la proportion de cellules capables de former un mélanome de 0,0001% (avec les NOD/SCID) à 27% (Quintana, Shackleton et al. 2008). On peut remarquer ici que si la propriété d'initiation de tumeurs est propre aux CSCs alors soit ces cellules ne sont pas rares (fréquence de 27% dans Quintana et al) soit la notion de CSCs reflète uniquement la capacité des cellules à survivre à la greffe. De plus, les auteurs n'ont pas mis en évidence de corrélation entre le potentiel à former des mélanomes et les marqueurs de cellules souches identifiés par les études dans d'autres types tumoraux. Récemment, Boiko et al ont identifié, grâce au même type de modèle (souris *Rag2-/-, γ -/-*, déficientes en lymphocytes B, T et Natural Killer), des cellules initiatrices des mélanomes (Boiko, Razorenova et al. 2010). Cette étude relie la présence du marqueur de cellules souches cancéreuses C271/p75/Ngfr (cellules CD271+) au potentiel de formation de mélanome (70% de formation de mélanome *in vivo*) (Boiko, Razorenova et al. 2010). Held et al ont étudié la combinaison des marqueurs CD34 et CD271 et la formation de mélanomes murins (Held, Curley et al. 2010). Selon ses résultats c'est la population cellulaire CD34+/CD271- qui forme constamment des tumeurs tandis que les cellules CD34-/CD271- forment des mélanomes dans 57% des cas et les CD271+ ne forment pas ou très peu de tumeurs (Held, Curley et al. 2010). Il est intéressant de noter que les tumeurs induites par les CD34+/CD271- ne reproduisent pas l'hétérogénéité de la tumeur de départ alors que c'est le cas avec les CD34-/CD271-. Les divergences de ces études peuvent avoir deux explications :

(1) Les techniques utilisées diffèrent. Quintana et al et Boiko et al partent de mélanomes humains injectés dans des souris déficientes en lymphocytes B, T et NK, ils les récupèrent les passent/trient et les réinjectent dans le même type de souris pour observer l'initiation de tumeurs. Ces études diffèrent au niveau de la greffe. Chez Quintana et al, les cellules transplantées sont incluses dans du matrigel (extrait protéique sécrété par des cellules de sarcome murin et qui permet aux cellules humaines de se développer plus vite chez la souris). Chez Boiko et al, les souris receveuses portent des greffes de peau humaines sur lesquelles sont greffées les cellules de mélanome. Held et al partent de tumeurs murines issues de trois

modèles de mélanomes génétiquement modifiés (Held, Curley et al. 2010) dont les cellules sont triées et réinjectées dans des souris Nude pour observer la formation de tumeurs. Les résultats sont donc difficilement comparables.

(2) Les cellules tumorales sont extraites, amplifiées et triées par cytométrie en flux à chaque passage et ce pendant trois passages. Il a été observé que plusieurs marqueurs changent après le tri et à chaque passage (Hoek and Goding 2010). Il est donc difficile d'évaluer la variabilité phénotypique dans ce type d'étude sur cellule unique et qui porte sur un ou deux marqueurs.

Il faut garder à l'esprit que ces études qui passent par une transplantation des cellules dans des animaux immuno-déprimés diffèrent du processus naturel où certaines cellules de la tumeur primaire s'évadent pour former une métastase distante qui reproduit l'hétérogénéité initiale (Hoek and Goding 2010). Il serait donc intéressant de chercher dans les cellules tumorales humaines les propriétés de cellules souches.

Les métastases sont associées au phénomène de dormance car elles sont diagnostiquées longtemps après l'apparition de la tumeur primaire (qu'elles aient été initiées précocement ou tardivement). Diverses études ont ainsi montré que les cellules de mélanome disséminées peuvent rester dormantes pendant plus de dix ans. Lorsqu'elles émergent de leur état de dormance elles sont le plus souvent résistantes aux thérapies, tout comme les lésions primaires, et donc fatales. (Ossowski and Aguirre-Ghiso 2010)

b) La résistance à la mort cellulaire

Les traitements anticancéreux disponibles ont très peu ou pas d'efficacité sur les mélanomes. En effet, il est rare d'observer une réponse de traitement chimiothérapeutique chez plus de 20% de patients (Soengas and Lowe 2003). Il ne s'agit donc pas d'une résistance acquise par les cellules tumorales au cours ou suite à un traitement, mais bien d'une caractéristique intrinsèque des mélanomes. La chimiorésistance peut être attribuée à la sortie de drogues hors de la cellule par des pompes d'efflux appelées transporteurs ABC. Chez les mélanomes plusieurs de ces transporteurs sont exprimés dont : ABCA9, ABCB1, ABCB5, ABCB8, ABCC2 et ABCD1 (Szakacs, Annereau et al. 2004; Chen, Szakacs et al. 2005; Frank, Margaryan et al. 2005; Elliott and Al-Hajj 2009). Cependant leur fonction dans les mélanomes n'est pas élucidée (Chen, Valencia et al. 2009). Par exemple, ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp), le transporteur ABC le mieux caractérisé dans de nombreux cancers, est exprimé faiblement dans les mélanomes (Goldstein, Galski et al. 1989). Les résultats de nombreuses études suggèrent qu'ABCB1 n'est pas responsable de la résistance intrinsèque des mélanomes (Chen, Valencia

et al. 2009). Le transporteur ABC le plus exprimé chez les mélanomes est ABCB5. Cependant, les mélanomes expriment les isoformes ABCB5 α et β qui n'encodent pas la protéine ABCB5 entière (Chen, Szakacs et al. 2005). La fonction exacte de ces protéines tronquées n'est pas totalement élucidée, et leur rôle dans la chimiorésistance n'a pas été prouvé (Chen, Valencia et al. 2009).

La chimiorésistance intrinsèque des mélanomes n'est pas due à un export des drogues hors des cellules mais plutôt à une tolérance induite par l'activation de voies de survie, l'adaptation aux stress intracellulaires et à l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques. Ces mécanismes sont communs aux cellules tumorales et l'inactivation de l'apoptose est d'ailleurs une caractéristique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2000). Nous repartirons donc des informations de la Partie I « Mort cellulaire et résistance tumorale » sur la chimiorésistance pour discuter des particularités du mélanome.

- Les voies de survie dans le mélanome

La voie Ras/Raf/Mek/Erk

La majorité des mutations à l'origine de la transformation maligne des mélanocytes en mélanomes a été identifiée dans des membres de la voie Ras/Raf/Mek/Erk (chez 80% des tumeurs). Les mutations de B-RAF, identifiées par Davies et al en 2002 dans diverses tumeurs sont retrouvées dans plus de 60% des mélanomes (Davies, Bignell et al. 2002). Dans 80% des cas il s'agit de la substitution d'un codon (T1799A) qui aboutit à la protéine B-raf Val600Glu ou V600E constitutivement active (Hocker, Singh et al. 2008). L'activation de la protéine sérine/thréonine kinase Raf en aval de Ras (signalisation induite par des facteurs de croissance) permet l'activation par phosphorylation de Mek1 et 2 (Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase, MAPKK) qui à leur tour phosphorylent et activent Erk1 et 2 (extracellular signal-related kinases) (Solit and Rosen 2010). L'activation de la voie des MAP kinases (MAPK) régule de nombreuses kinases effectrices et facteurs de transcription qui dirigent des processus cellulaires clefs tels que la prolifération et la survie cellulaire (Solit and Rosen 2010). Nous avons vu précédemment que les mutations des membres de la voie Ras/Raf/Mek/Erk sont impliquées dans la transformation maligne des mélanocytes (I- 3. c) - « Les mutations somatiques »). Cependant, le taux élevé de mutations de cette voie spécifiquement dans les mélanomes laisse penser qu'il est nécessaire de l'inhiber pour sensibiliser les mélanomes à la mort cellulaire (Fig.21A). Une première étude sur l'effet des inhibiteurs des Meks *in vitro* et *in vivo* (Solit, Garraway et al. 2006) a prouvé l'utilité d'inhiber les kinases Raf, Mek et Erk pour traiter le mélanome. Malheureusement les tests cliniques pour l'inhibiteur de Mek AZD6244 (AstraZeneca) n'ont montré qu'une réponse partielle dans 13% de tumeurs porteuses d'une mutation dans B-Raf.

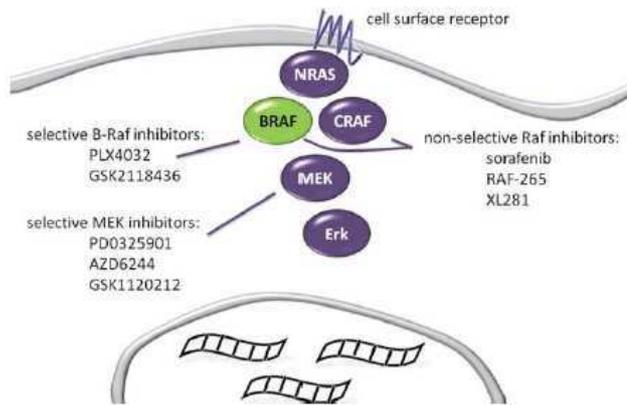


Figure 21A : Les inhibiteurs de MAPK

Inhibiteurs non-spécifiques et spécifiques des membres de la voie des MAPK, dont les nouvelles molécules inhibitrices de B-Raf.

(D'après Flaherty et McArthur, Cancer, 2010)

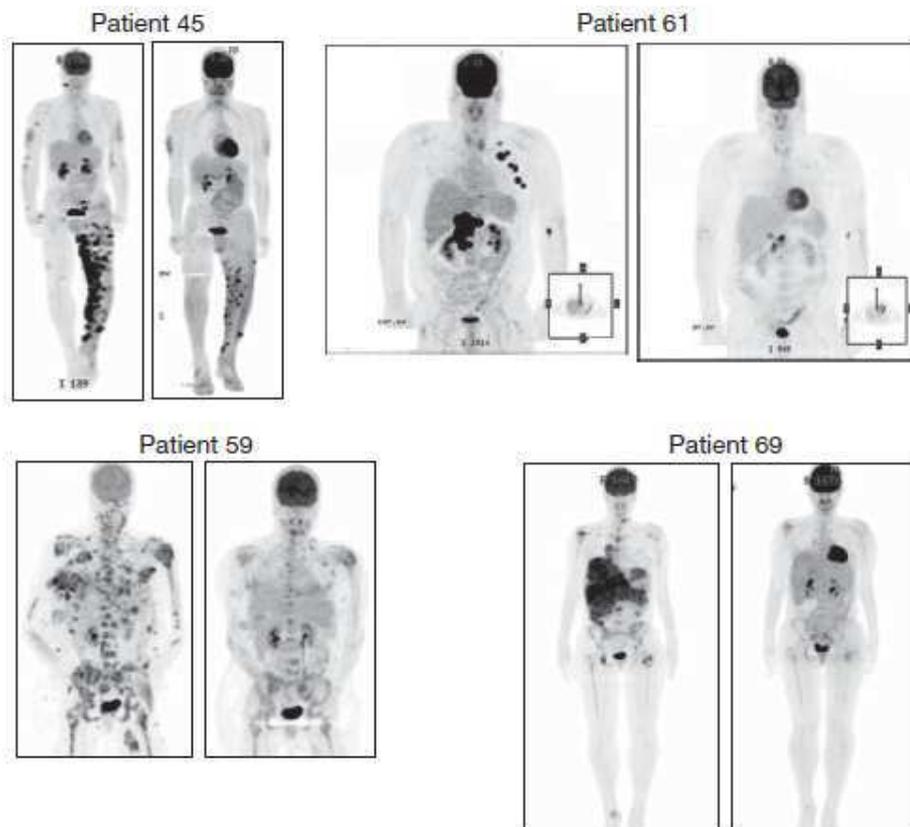


Figure 21B : PET scans de patients traités par PLX4032

PET scans de quatre patients participants à l'essai clinique de phase I de la molécule inhibitrice de B-Raf PLX4032. Les images sont prises avant le traitement et après deux semaines de traitement par PLX4032. Les patients 45 et 59 montrent 70% de régression tumorale, le patient 61 en montre 68% et le patient 69, 37%. (D'après Bollag et al 2010)

De plus, le premier inhibiteur de Raf testé en clinique, Sorafenib (Nexavar, Bayer), n'a pas montré d'activité contre le mélanome (Solit and Rosen 2010). Tout ceci a contribué à penser que la signalisation Raf/Erk n'est pas indispensable à la survie des mélanomes. Très récemment deux études ont relancé l'intérêt pour les inhibiteurs de cette voie de survie. Flaherty et al et Bollag et al en 2010 ont finalement mis un terme à la polémique et validé la dépendance des mélanomes à B-Raf (Bollag, Hirth et al. 2010; Flaherty, Puzanov et al. 2010). Ces deux articles portent sur l'inhibiteur de B-Raf, PLX4032 ou RG7204 (Plexxikon et Roche), dans des tests cliniques de phase I. PLX4032 se fixe sur le site actif des kinases Raf avec une plus forte affinité pour B-Raf (Sala, Mologni et al. 2008). Flaherty et al rapportent un taux de réponse de 77% chez les 48 patients présentant une mutation de BRAF et ayant reçu 240 à 290mg de PLX4032 au moins deux fois par jour (Flaherty, Puzanov et al. 2010). Parmi les patients qui répondent au traitement, les auteurs distinguent des réponses partielles (34 patients) et des réponses complètes (trois patients) (Flaherty, Puzanov et al. 2010). Bollag et al présentent les images impressionnantes de PET scan (« positron emission tomography scanner », imagerie médicale qui permet de visualiser les tumeurs par leur métabolisme accru) de patients avant et après deux semaines de traitement (Fig.21B) (Bollag, Hirth et al. 2010). Ces patients font partie de ceux qui répondent le mieux au traitement parmi les réponses partielles et présentent de 37 à 70% de régression (Bollag, Hirth et al. 2010). Les auteurs de ces articles notent qu'en plus des effets secondaires classiques (fatigue, éruptions cutanées et douleurs articulaires), un tiers des patients ayant reçu la dose de 290mg ont développé des lésions cutanées de type carcinome spino-cellulaire et kératoacanthome (tumeur cutanée bénigne) (Bollag, Hirth et al. 2010; Flaherty, Puzanov et al. 2010). Les résultats de régression tumorale chez les mutants BRAF montrent la capacité de PLX4032 à inhiber B-Raf et l'activation d'Erk conduisant ainsi à un arrêt du cycle cellulaire et même au déclenchement de la mort cellulaire (Joseph, Pratilas et al. 2010). Les effets secondaires les plus délétères sont sûrement le reflet de l'activation d'Erk et de la voie des MAP kinases par PLX4032 en absence de mutation BRAF, et donc dans les tissus sains (Hatzivassiliou, Song et al. 2010; Heidorn, Milagre et al. 2010; Poulikakos, Zhang et al. 2010). PLX4032 est néanmoins un traitement prometteur actuellement en test clinique de phase III pour comparer son efficacité à la chimiothérapie classique.

La voie PI3K/Akt, PTEN

L'activation de la voie PI3K/Akt déclenche l'activation de facteurs impliqués dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire (Fig.22). Akt est responsable de l'inactivation de protéines pro-apoptotiques telles Bad et caspase 9. Il promeut également la transcription de

la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L et active la voie de survie NF-κB (Fig.22) (Soengas and Lowe 2003). PTEN est une phosphatase qui réprime l'activation de PI3K et induit ainsi l'apoptose. Environ 50% des mélanomes métastatiques montrent une expression diminuée de PTEN due à une mutation, une délétion allélique ou une répression de son expression (Birck, Ahrenkiel et al. 2000; Zhou, Gimm et al. 2000). Les modifications d'expression de PTEN sont considérées comme un évènement tardif du développement des mélanomes (Whiteman, Zhou et al. 2002) et augmenter son expression permet de sensibiliser les mélanomes à des drogues chimiothérapeutiques (Mayo, Dixon et al. 2002). Inhiber PI3K est donc apparu comme une solution pour sensibiliser le mélanome (ainsi que d'autres cancers) à la mort cellulaire. Wortmannin et LY294002, molécules inhibitrices de PI3K permet en effet d'inhiber la prolifération de cellules de mélanomes *in vitro* et *in vivo* (Krasilnikov, Adler et al. 1999; Wellbrock, Fischer et al. 1999). Malheureusement, ces deux molécules se sont révélées très toxiques en tests cliniques. Deux nouvelles molécules, un dérivé de Wortmannin : PX-866 (ProlX pharmaceuticals) et une pro-drogue de LY294002 : SF1126 (Semaphore Pharmaceuticals) sont actuellement en test clinique de phase I après avoir montré leur efficacité *in vitro*.

La sérine/thréonine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) a d'abord été identifiée comme la cible moléculaire de la molécule Rapamycin (ou sirolimus) (Brown, Albers et al. 1994; Chiu, Katz et al. 1994; Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994). MTOR a été identifié comme étant en aval d'Akt dans la voie de signalisation PI3K/Akt (Chung, Grammer et al. 1994; Monfar, Lemon et al. 1995). Avant même l'identification de mTOR, la Rapamycine était connue pour son activité anti-tumorale sur des tumeurs greffées chez la souris (Eng, Sehgal et al. 1984). La Rapamycine et ses dérivés sont efficaces sur de nombreux modèles de cancers *in vitro* et *in vivo* mais ont peu d'effet comme agent seul dans les tests cliniques (Maira, Stauffer et al. 2009). Plusieurs études cliniques de phase II sont actuellement en cours de recrutement pour tester l'activité de dérivés de la Rapamycine sur le mélanome accompagné d'autres molécules. On note le développement récent d'une molécule prometteuse: NVP-BEZ235 (Novartis). Cette molécule est capable d'inhiber à la fois PI3K et mTOR à des concentrations très faibles (faible toxicité attendue) et a déjà montré son efficacité sur les mélanomes *in vitro* (Aziz, Jilaveanu et al. 2010).

La voie NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB est un régulateur de nombreuses fonctions : inflammation, angiogenèse, cycle cellulaire, différenciation, adhésion, migration et survie (Karin and Lin 2002). Dans le contexte de la mort cellulaire, NF-κB contrôle divers facteurs de survie qui

interfèrent avec les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque (Fig.22) (Karin and Lin 2002). Dans les mélanomes, la voie NF- κ B peut être altérée par l'augmentation de l'expression des sous-unités de NF- κ B p50 et RelA (McNulty, Tohidian et al. 2001; Meyskens, McNulty et al. 2001) ou par diminution de l'expression de l'inhibiteur de NF- κ B, I- κ B (Yang and Richmond 2001; Dhawan and Richmond 2002). Par conséquent, les cibles de NF- κ B comme c-myc, la cycline D1, le facteur anti-apoptotique TRAF2, les protéines associées à l'invasion Mel-CAM, la chémokine pro-angiogénique GRO voient souvent leur expression augmentée dans les mélanomes (Baldwin 2001).

Il semblerait que l'inhibition de NF- κ B empêche les tumeurs d'acquérir une chimiorésistance. Ainsi divers inhibiteurs de NF- κ B ont été développés pour sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies. Plusieurs types de molécules inhibent NF- κ B en utilisant différentes stratégies. Les inhibiteurs du protéasome, comme Bortezomib et MG132 (Millenium Pharmaceuticals), qui inhibent la dégradation protéique empêche, entre autre, la dégradation d'I- κ B (Nakanishi and Toi 2005). Les molécules inhibitrices de NF- κ B, comme BAY 11-7085 et BAY 11-7085 (Bayer), empêchent la phosphorylation qui précède la dégradation d'I- κ B (Nakanishi and Toi 2005). De nombreuses molécules naturelles issues de plantes, comme le curcumin, ont la capacité d'inhiber NF- κ B (Nakanishi and Toi 2005). Ce large éventail de molécules a montré son efficacité *in vitro* et *in vivo* sur divers modèles de cancers (Cusack, Liu et al. 2001; Aggarwal, Takada et al. 2004; Mabuchi, Ohmichi et al. 2004). La plupart ont déjà été testées en études cliniques de phase I/II en traitement seul (Cheng, Hsu et al. 2001; Jagannath, Barlogie et al. 2004; O'Connor, Wright et al. 2005) et sont en cours de test de phase II, pour le curcumin dans les cancers digestifs, et de phase III, pour le Bortezomib dans le myélome multiple, en combinaison avec des chimiothérapies. Concernant les mélanomes, l'intérêt de Bortezomib a été montré *in vivo* et *in vitro* (Amiri, Horton et al. 2004). Il est actuellement en cours de test clinique de phase I/II dans le but de sensibiliser à d'autres traitements. Le rôle synergique de Bortezomib semble prometteur mais certaines combinaisons de traitement sont peu efficaces (Croghan, Suman et al. 2010).

Les membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés de l'apoptose et jouent un rôle important dans la chimiorésistance (Voir Partie I : Mort cellulaire et résistance tumorale). Dans les cellules de mélanome, les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-x_L et Mcl-1 sont fortement exprimées (Fig.23) (Selzer, Schlagbauer-Wadl et al. 1998; Hossini, Eberle et al. 2003; Wolter, Verhaegen et al. 2007) et un ratio Bcl-2/Bax élevé est corrélé avec une résistance à l'apoptose (Raisova, Hossini et al. 2001).

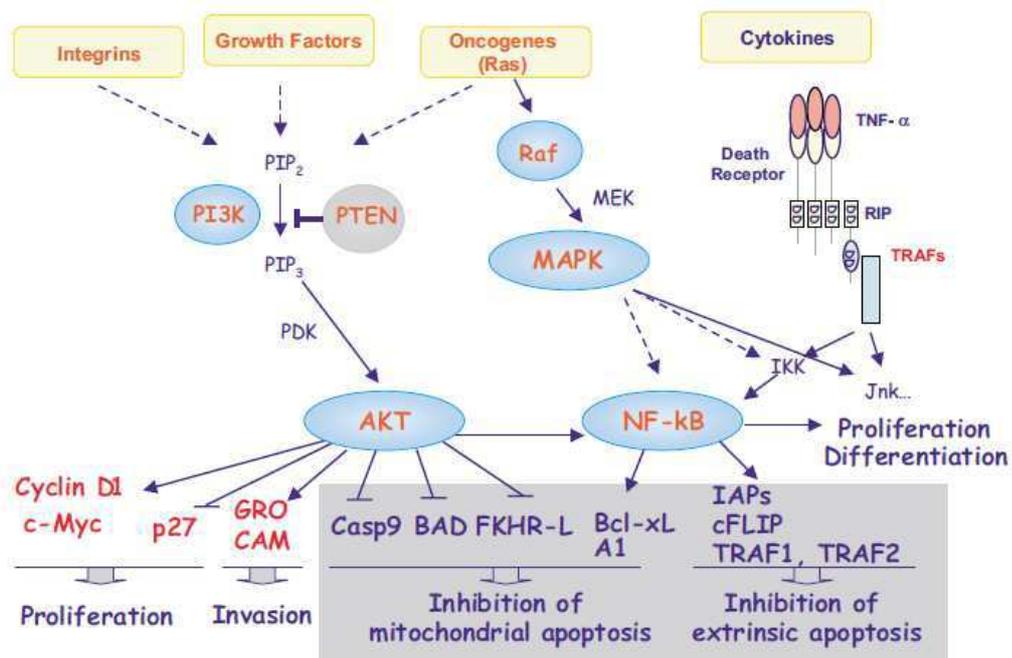


Figure 22 : Voies de survie et résistance à l'apoptose

Les voies PI3K/Akt, Ras MAPK et NF-κB qui sont fortement activées dans les mélanomes vont induire l'expression de protéines anti-apoptotiques et d'autres impliquées dans la prolifération et l'invasion cellulaire.

(D'après Soengas & Lowe, Oncogene, 2003)

Le rôle de ces protéines dans la résistance des mélanomes, bien qu'avéré, est toujours en cours d'investigation. Le membre anti-apoptotique le mieux documenté est Bcl-2 dont l'expression est indispensable à la survie des mélanocytes.

- Les protéines anti-apoptotiques dans le mélanome

Les voies de survie Ras/Raf/Mek/Erk et PI3K/Akt peuvent seules ou via l'activation de la voie NF-κB déclencher l'induction de facteurs anti-apoptotiques tels que des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou et des IAPs.

En effet, les souris invalidées pour Bcl-2 sont caractérisées par une perte de pigmentation (Bouillet, Cory et al. 2001; Nishimura, Granter et al. 2005). Ce rôle s'explique par sa régulation qui chez les mélanomes est attribuée à Mitf, régulateur central de la survie du lignage mélanocytaire (McGill, Horstmann et al. 2002). Son implication directe dans la chimiorésistance des mélanomes porte à controverse. Ramsay et al ont rapporté une expression très forte de Bcl-2 dans les mélanocytes et les naevi bénins, mais très diminuée dans les mélanomes primaires et métastatiques, résultats confirmés par d'autres études (Saenz-Santamaria, Reed et al. 1994; Cerroni, Soyer et al. 1995; Ramsay, From et al. 1995). Tang et al ont montré que l'expression de Bcl-2 diminuait dans les mélanomes tandis que celles de Bcl-x_L

et Mcl-1 augmentaient (Tang, Tron et al. 1998). Leiter et al ont mis en évidence l'augmentation du taux de Bcl-2 et Bcl-x_L dans des mélanomes de stade avancé (Leiter, Schmid et al. 2000). D'autres ont rapporté une association entre l'expression de Bcl-x_L et la chimiorésistance des mélanomes (Olie, Hafner et al. 2002). Une étude de 2007 semble avoir clos le débat en présentant une corrélation entre l'augmentation de l'expression de Mcl-1 et Bcl-x_L et la baisse d'expression de Bcl-2 avec la progression du mélanome (Zhuang, Lee et al. 2007). Les mélanomes primaires et métastatiques présentent tous la caractéristique de chimiorésistance. Il semblerait que les trois protéines soient impliquées dans la résistance des mélanomes et qu'il y ait un mécanisme compensatoire entre les différentes protéines anti-apoptotiques pour maintenir le niveau de résistance. En terme de thérapie, il est donc intéressant de cibler Bcl-2 comme avec l'Oglimersen (Genta, cf. Tableau 1) qui est actuellement en essai clinique de phase III associé à une chimiothérapie contre le mélanome. En effet, les études de phase I/II ont montré une amélioration de la survie médiane des patients de 7,8 à 9 mois et une augmentation de la réponse globale au traitement de référence, de 7,5 à 13% (Bedikian, Millward et al. 2006). Le plus efficace serait néanmoins de cibler plusieurs protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. La molécule ABT-737 (Abbott, cf. Tableau 1), qui cible Bcl-2, Bcl-x_L et Bcl-w, montre des résultats intéressants *in vitro* mais sa capacité à induire l'apoptose est clairement augmentée par l'invalidation de Mcl-1 (Keuling, Felton et al. 2009). La molécule « BH3 mimetic » la plus prometteuse serait donc l'Obatoclax (Gemin X, cf. Tableau 1) qui contrairement à ABT737 inhibe aussi Mcl-1. L'Obatoclax a démontré un effet pro-apoptotique en traitement combinatoire et également en agent seul, *in vitro* et *in vivo*, sur plusieurs modèles de cancers dont le mélanome (Nguyen, Marcellus et al. 2007), mais n'est pas encore en essai clinique sur le mélanome.

Les inhibiteurs d'apoptose (IAPs)

Comme nous l'avons vu dans la partie I, hormis XIAP, le rôle anti-apoptotique des IAPs n'est pas encore élucidé mais les IAPs sont souvent surexprimés dans les tumeurs (Gyrd-Hansen and Meier 2010). L'expression élevée de XIAP dans plusieurs cancers est associée à leur capacité à échapper à l'apoptose (Gyrd-Hansen and Meier 2010). Dans les mélanomes, XIAP est fortement exprimé dans les lignées cellulaires, tumeurs primaires et métastatiques (Emanuel, Phelps et al. 2008). De plus, Hiscutt et al en 2010 ont mis en évidence sur des échantillons cliniques que l'expression de XIAP est plus élevée dans les tumeurs de stades avancés et de plus grande épaisseur (Hiscutt, Hill et al. 2010). Cette étude complète les observations faites par d'autres (Kluger, McCarthy et al. 2007; Emanuel, Phelps et al. 2008) et met en évidence le rôle potentiel de XIAP comme marqueur de la progression et de l'agressivité des mélanomes (Tian and Lee 2010). La deuxième partie de cet article met en évidence le rôle anti-apoptotique

de XIAP dans les mélanomes (Hiscutt, Hill et al. 2010). ML-IAP tient son nom du fait qu'il est fortement exprimé dans les mélanomes (Fig. 23) (Vucic, Stennicke et al. 2000). Vucic et al ont montré que ML-IAP est capable de bloquer l'apoptose induite par divers agents thérapeutiques et cela dans la même mesure que XIAP (Vucic, Stennicke et al. 2000). D'abord identifié dans des lignées cellulaires de mélanome, le taux élevé de ML-IAP a été confirmé sur des échantillons de patients. ML-IAP est très exprimé dans les mélanomes par rapport aux naevi, mais son taux d'expression est équivalent entre les tumeurs primaires et les tumeurs métastatiques (Gong, Chen et al. 2005). Le rôle anti-apoptotique des IAPs associé à leur fort taux d'expression dans les mélanomes en font des cibles intéressantes pour sensibiliser les mélanomes à l'apoptose (Fulda and Debatin 2006). Deux types de stratégies ont été inventées pour contrer les IAPs ; utiliser des antagonistes des IAPs ou des agonistes de leurs inhibiteurs (Smac/Diablo et Omi/Htra2) (Fulda and Debatin 2006). Des oligonucléotides antisens ont été développés récemment contre les domaines BIR des IAPs.

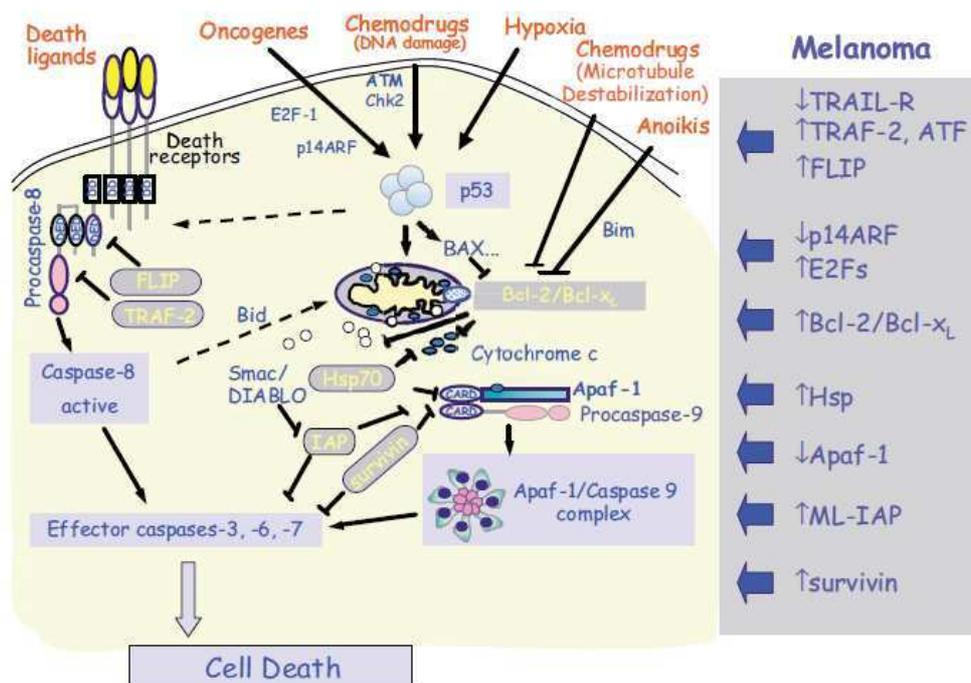


Figure 23 : Modifications des voies apoptotiques dans le mélanome

Dans les mélanomes, les dérégulations augmentent le niveau des protéines anti-apoptotiques de la voie extrinsèque (FLIP) et de la voie intrinsèque (Bcl-2) ainsi que les protéines impliquées en aval des deux voies d'induction de l'apoptose (ML-IAP, survivin).

(D'après Soengas & Lowe, Oncogene, 2003)

Ces molécules montrent des résultats intéressants *in vitro* mais n'ont pas encore été testées contre les mélanomes (voir par exemple (Dean, Ward et al. 2010; Liu, Wu et al. 2010)). Les molécules qui suscitent le plus d'engouement actuellement sont les « Smac-mimetics ». Il s'agit de peptides qui imitent le domaine de liaison aux domaines BIR des IAPs (le domaine IBM pour « IAPs-binding domain ») (Fulda and Debatin 2006). Les peptides Smac-mimetics sont actuellement en cours d'amélioration et testés *in vitro* pour leur efficacité dans le traitement des cancers. La molécule TL32711 (TetraLogics Pharmaceuticals) est en cours d'essai de phase I/II pour tester son efficacité seule et en combinaison avec divers traitements chimiothérapeutiques. Concernant les mélanomes, une seule étude *in vitro* est répertoriée et elle montre un effet intéressant dans la sensibilisation à l'apoptose (Lecis, Drago et al. 2010).

- La tolérance du mélanome aux stress

L'adaptation au stress du réticulum endoplasmique

Nous avons discuté du stress du réticulum endoplasmique (RE) dans la première partie de l'introduction. Le stress RE, par exemple du fait d'un mauvais repliement des protéines, peut aboutir à la mort de la cellule par apoptose. Néanmoins le stress RE est avant tout le déclencheur de la réponse UPR qui va tout entreprendre pour que la cellule survive au stress. La réponse au stress RE produit donc des signaux anti-apoptotiques. Lorsqu'une cellule est capable de survivre à des stress répétés du RE, elle peut tirer parti de ces signaux. En effet, l'adaptation au stress RE peut contribuer à la transformation maligne (Rutkowski and Kaufman 2007). Cela semble être le cas pour les mélanomes qui présentent un stress du RE, même à un stade précoce de développement (Hersey and Zhang 2008). La chaperonne Grp78 qui est un marqueur de stress RE peut être détectée dans la plupart des lignées cellulaires et des tissus de mélanomes (Hersey and Zhang 2008). De plus, l'expression de Grp78 corrèle avec la progression de la maladie (Zhuang, Scolyer et al. 2009). La protéine CHOP est également exprimée de façon constitutive dans les mélanomes en culture (Jiang, Chen et al. 2007). *In vitro*, et sous l'effet d'un stress RE élevé, induit par les agents tunicamycin ou thapsigargin, les cellules de mélanomes survivent contrairement aux mélanocytes (Jiang, Chen et al. 2007). Ceci conforte l'idée d'une activation constitutive de la réponse UPR comme mécanisme de résistance des mélanomes à l'apoptose. Jiang et al ont montré que l'inhibition de Mek dans des cellules de mélanome permet d'induire l'apoptose par des agents de stress RE et que cela est du au moins en partie à l'inhibition de Grp78 (Jiang, Chen et al. 2007). Les mêmes résultats sont obtenus par l'inactivation de Grp78 ce qui a permis aux auteurs de mettre en évidence la régulation de Grp78 par Mek (Jiang, Chen et al. 2007). L'adaptation au stress RE serait donc un mécanisme de résistance des mélanomes contrôlé par la voie des MAPK. La voie de survie PI3K/Akt serait induite par le stress RE dans les mélanomes. En effet, un traitement court par

la tunicamycin augmente la forme Akt phosphorylée (Hersey and Zhang 2008). L'activation constitutive de la réponse UPR pourrait avoir comme conséquence une sélection des cellules de mélanome présentant un taux d'Akt activé plus élevé (Hersey and Zhang 2008). Cibler l'adaptation au stress RE pourrait permettre de contrer la résistance des cellules de mélanomes. Il semble particulièrement intéressant de cibler Grp78. L'étude de Jiang et al montrent que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Ras/Raf/Mek permettrait de diminuer l'expression de Grp78. D'autres agents sont également à l'étude. La versipelostatin est notamment capable d'inhiber le pic d'expression de Grp78 induit par l'hypoglycémie (Li and Lee 2006; Park, Chijiwa et al. 2007). L'épigallocatechine issue du thé vert et l'aspirine pourraient inhiber l'activité de Grp78 (Ermakova, Kang et al. 2006; Li and Lee 2006). Ajouter du stress RE au stress RE constitutif est également une stratégie possible pour sensibiliser les cellules à la mort cellulaire. Plusieurs agents sont susceptibles de jouer ce rôle comme le bortezomib qui, en limitant la dégradation protéique, induit un stress du RE (Hersey and Zhang 2008). L'épigallocatechine est actuellement en essai clinique de phase I/II pour le traitement du cancer du sein. Il a montré des effets pro-apoptotiques sur les mélanomes *in vitro* (Nihal, Ahmad et al. 2005) et l'effet préventif du thé vert contre le mélanome et d'autres cancers fait débat (Yang and Wang 2010).

L'adaptation au stress oxydant

Dans la partie I nous avons discuté du rôle du stress oxydant et de la dérégulation des systèmes oxydants et antioxydants dans la cancérogenèse et la naissance d'une résistance des cellules tumorales. La revue de Trachootham et al présente l'adaptation au stress oxydant comme une particularité des cellules cancéreuses et une cible thérapeutique intéressante (Trachootham, Alexandre et al. 2009).

Dans les mélanomes, l'altération de la structure des mélanosomes, l'absence ou la baisse de la production de mélanine, puissant antioxydant, sont accompagnées d'une production accrue d'EAO (Fruehauf and Trapp 2008). En effet, la production d'EAO (O_2^- et H_2O_2) est beaucoup plus élevée dans les mélanomes par rapport aux mélanocytes (Meyskens, McNulty et al. 2001). Tout porte à croire que ce fort taux d'EAO participe à la transformation maligne des mélanocytes en mélanome (Meyskens, McNulty et al. 2001; Brar, Kennedy et al. 2002). Brar et al en 2001 ont montré que ces EAO sont produits par des complexes NOXs et que les EAO ainsi produits sont associés à une activation constitutive de NF- κ B dans les mélanomes (Brar, Kennedy et al. 2001). En effet, l'ajout d'antioxydant et d'inhibiteur des NOXs diminue fortement l'activation de NF- κ B et la prolifération cellulaire (Brar, Kennedy et al. 2001; Brar, Kennedy et al. 2002). La source précise de ce stress oxydant a été mis en évidence en 2009 par Yamaura et al (Yamaura, Mitsushita et al. 2009). Les auteurs montrent que le complexe NOX4

est fortement exprimé dans 13 lignées cellulaires sur 20 testées et dans 31% des 13 échantillons de patients analysés (Yamaura, Mitsushita et al. 2009). L'inhibition de NOX4 dans les cellules de mélanome mène à une diminution du taux des EAO et à une baisse du caractère tumorigène des cellules dans des souris immunodéficientes (Yamaura, Mitsushita et al. 2009). De plus les auteurs montrent que l'absence de NOX4 va conduire au blocage des cellules en phase G2-M du cycle cellulaire (Yamaura, Mitsushita et al. 2009). La résistance induite par les EAO dans les mélanomes peut être expliquée par l'activation de la voie de survie NF- κ B (Fig.24) (Brar, Kennedy et al. 2001; Brar, Kennedy et al. 2002). Brar et al montrent que l'utilisation d'inhibiteur des NOXs empêche l'activation de NF- κ B (Brar, Kennedy et al. 2002). Cependant, dans leur modèle, l'inhibition de NF- κ B n'est pas suffisante pour arrêter totalement la prolifération cellulaire des mélanomes. La présence d'un taux constant de stress oxydant, et donc de molécules mutagènes, favorise l'apparition de mutations ou la dérégulation de la fonction de certaines protéines qui peuvent concourir à la résistance des cellules (Fig.24). Dans la partie I nous avons vu que de nombreux récepteurs, facteurs de transcription et protéines ont une activité modifiée par les EAO. Nous noterons ici que la voie Ras/Raf/Mek/Erk peut aussi être affectée (Fig.24). En effet, Erk est activée en présence d'EAO dans de nombreux types cellulaires comme le rapportent McCubrey et al (McCubrey, Lahair et al. 2006). L'utilisation d'agents antioxydants en thérapie du mélanome semble donc intéressante pour inhiber les voies de survie et contrer ainsi la résistance des mélanomes (Brar, Kennedy et al. 2002; Fruehauf and Trapp 2008). L'antioxydant disulfiram est actuellement en essai clinique de phase I/II contre le mélanome seul et en combinaison avec un agent chimiothérapeutique. Cependant de nombreux mélanomes présentent déjà un niveau élevé d'enzymes détoxifiantes (Sander, Hamm et al. 2003) qui semblent participer à leur résistance. La déplétion du glutathion (GSH) *in vitro* sensibilise les mélanomes à l'apoptose (Mena, Benlloch et al. 2007) ce qui fait de la déplétion de GSH une stratégie thérapeutique (Estrela, Ortega et al. 2006). Le BSO (buthionine sulfoximine) capable de dépléter les cellules en GSH est actuellement en test de phase I chez des patients atteints de mélanome. D'autres études ont montré une activité faible des enzymes antioxydantes dans les mélanomes et notamment de l'activité catalase (Kwee, Mitidieri et al. 1991; Picardo, Grammatico et al. 1996). Dans ce cas deux stratégies sont possibles : utiliser un antioxydant pour freiner la prolifération cellulaire et/ou utiliser un agent pro-oxydant (générateurs d'EAO) pour submerger les systèmes antioxydants de la cellule et induire la mort cellulaire. Il existe divers pro-oxydants en essai pré-clinique et cliniques. L'arsenic trioxide (As_2O_3) est un générateur d'EAO utilisé en chimiothérapie pour le traitement des leucémies. Il est actuellement en test de phase I pour le traitement du mélanome avec l'antioxydant disulfiram. L'elesclomol (Synta Pharmaceuticals), un autre agent pro-oxydant qui cible la

chaîne respiratoire et induit la voie mitochondriale de l'apoptose (Kirshner, He et al. 2008). Les résultats de l'étude clinique de phase II montrent une amélioration du taux de survie : de 7,8 mois pour la chimiothérapie seule contre 11,9 mois pour la chimiothérapie plus l'elesclomol chez des patients atteints d'un mélanome métastatique (O'Day, Gonzalez et al. 2009). Les tests de phase III sont terminés depuis 2009, mais les résultats ne sont pas encore publiés.

Il existe de nombreux obstacles à la sensibilisation des mélanomes à la mort cellulaire. Les mélanomes sont issus de cellules sélectionnées au cours du développement pour leur mobilité et leur résistance. L'adaptation aux stress générés par des facteurs environnementaux (rayons UVs, substances chimiques...), aboutit à l'activation de plusieurs voies de survie, l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques et finalement à la mise en place de la chimiorésistance. De plus l'hétérogénéité des cellules de tumeurs de mélanome va permettre leur adaptation aux variations de leur environnement et favoriser leur survie aux thérapies. De nombreuses protéines comme B-Raf, NF- κ B, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, ML-IAP ou les membres du système redox sont des cibles prometteuses. Il semble primordial d'adopter une stratégie de traitements combinatoire à élaborer au mieux en fonction des caractéristiques (bio-marqueurs) de chaque tumeur.

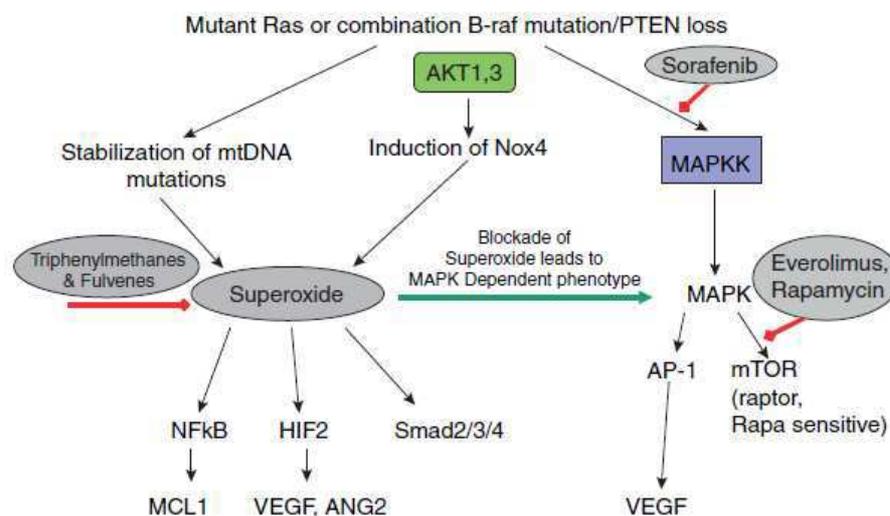


Figure 24 : Interactions entre les signalisations et O_2^- dans les mélanomes

La production accrue d'EAO dans les mélanomes est une conséquence des dérégulations des voies MAPK et PI3K/Akt et permet à son tour l'activation de voie de survie et de progression tumorale. Les auteurs montrent que cibler l' O_2^- est nécessaire mais pas suffisant pour stopper la progression tumorale. Il faut une thérapie combinatoire pour synergiser les effets.

(D'après Fried & Arbiser, Pigment Cell Melan Res, 2008)

2. Nouvelles approches thérapeutiques pour le mélanome

Le traitement du mélanome le plus efficace consiste à exciser chirurgicalement les lésions qui apparaissent sur la peau car les chimiothérapies n'apportent pas de bénéfice thérapeutique significatif (Bhatia, Tykodi et al. 2009). Le dacarbazine (DTIC) est l'agent thérapeutique approuvé pour le traitement du mélanome en agent seul ou combiné à une immunothérapie interleukine-2 (IL-2). Le DTIC seul montre 5 à 10% de réponse et une survie médiane de 6 à 9 mois (Lorigan, Eisen et al. 2008). Le DTIC peut être remplacé par un dérivé : le témozolomide qui présente une meilleure réponse pour les métastases au cerveau mais n'augmente pas la survie globale (Soengas and Lowe 2003). L'IL-2 offre une réponse durable pour 10% des patients, mais a l'inconvénient d'être très toxique (Kirkwood, Tarhini et al. 2008). L'utilisation de l'interféron- α (IFN- α) en combinaison avec l'IL-2 n'a pas démontré d'amélioration du taux de survie (Sparano, Fisher et al. 1993; Eton, Talpaz et al. 1996). Les biochimiothérapies qui combinent DTIC, cisplatine, vinblastine avec l'IL-2 et l'IFN- α ont amélioré le taux de réponse mais pas la survie globale (Ives, Stowe et al. 2007; Hamm, Verma et al. 2008).

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que de nombreuses molécules ciblées sont en cours de test et/ou d'amélioration. Néanmoins, les molécules qui obtiennent une autorisation de mise sur le marché sont peu nombreuses. Dans la perspective de l'élaboration de thérapies combinatoires, il est donc important d'identifier de nouvelles molécules candidates. Les composés naturels peuvent présenter des effets bénéfiques pour la santé humaine et certains induisent l'apoptose présentant ainsi une activité anti-tumorale (Fulda 2010). Nous nous sommes intéressés à plusieurs molécules issues de plantes et je présente ici celles qui semblent les plus prometteuses.

a) La molécule Withaferine A (WFA)

- Découverte des effets de WFA

En 1962, Lavie et Yarden isolent trois composés des feuilles de la plante *Whitania somnifera* Dun. (Solanaceae) (Yarden, D. & Lavie, D. J. Chem. Soc. 1962). Ils nomment le composé majoritaire « Withaferin A » (WFA) et élucident sa structure chimique ($C_{28}H_{38}O_6$; 5,6-époxy-4,27-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide, voir Fig.25) (Lavie, D.; Glotter, E.; Shvo, Y. J. Chem. Soc. 1965). Presque en même temps une autre équipe isole WFA d'une autre plante Solanaceae, *Acinthus arborescens* et montre qu'elle est capable d'inhiber la formation de sarcome chez la souris (Kupchan, Doskotch et al. 1965). La famille de stéroïdes comme WFA issus de plantes de type Solanaceae est nommée « withanolide ». Ces composés suscitent un intérêt d'autant plus important qu'ils sont isolés de plantes médicinales. La plante *Whitania*

somnifera (Ashwagandha) est utilisée en médecine traditionnelle indienne (Ayurveda) dans le traitement de l'arthrite, pour le bien-être général et le tonus (Mishra, Singh et al. 2000). Les effets de la plante ont été confirmés *in vivo* (Agarwal, Diwanay et al. 1999; Rasool and Varalakshmi 2006; Rasool and Varalakshmi 2006) et en essais cliniques (Kulkarni, Patki et al. 1991; Mikolai, Erlandsen et al. 2009). Des patients atteints d'arthrite ont vu leur condition (douleur, handicap) améliorée (Kulkarni, Patki et al. 1991) par des extraits de *Whitania somnifera* et cette plante peut également activer les lymphocytes T CD4+ et les Natural Killer (Mikolai, Erlandsen et al. 2009). D'autres effets ont été mis en évidence comme un rôle cardioprotecteur suite à l'ischémie-reperfusion chez le rat (Gupta, Mohanty et al. 2004; Mohanty, Arya et al. 2004) ainsi qu'un rôle neuro-protecteur dans un modèle de rats parkinsoniens (Ahmad, Saleem et al. 2005). La molécule WFA a d'abord été étudiée par des équipes indiennes pour son rôle anti-tumoral. Ils ont mis en évidence un rôle de WFA dans la sensibilisation des cellules tumorales à la mort induite par radiothérapie chez la souris (Devi, Sharada et al. 1995; Devi, Akagi et al. 1996; Devi, Kamath et al. 2000). On note qu'une des études porte sur la radio-sensibilisation du mélanome murin (Devi, Kamath et al. 2000).

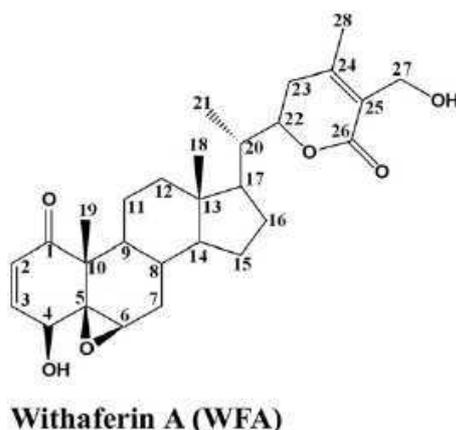


Figure 25 : Withaferine A (WFA)

Structure chimique de la molécule WFA (C₂₈H₃₈O₆ ; 5,6-époxy-4,27-dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide). (D'après Bargagna-Mohan et al., J Chem Biol, 2007)

- Récentes études sur le rôle anti-tumoral de WFA

En 2004, une étude sur l'effet anti-angiogénique de WFA et sa capacité à inhiber l'activation de NF-κB met WFA dans la lumière (Mohan, Hammers et al. 2004). Dès lors de nombreuses études vont être publiées sur le potentiel anti-tumoral de WFA, principalement entre 2007 et 2010. WFA est un inducteur d'apoptose et son action a été décrite dans différents types de cancers. Il agit sur les leucémies lymphoïdes et myéloïdes (Malik, Kumar et al. 2007; Mandal, Dutta et al. 2008; Oh, Lee et al. 2008), sur le cancer de la prostate (Srinivasan, Ranga et al. 2007; Yang, Shi et al. 2007), le cancer du sein (Stan, Hahm et al. 2008; Stan, Zeng et al. 2008;

Lee, Hahm et al. 2010), le cancer de la thyroïde (Samadi, Mukerji et al. 2010), et aussi le cancer du rein (Lee, Um et al. 2009), du côlon (Koduru, Kumar et al. 2010), du cou et de la tête (Samadi, Tong et al. 2010), et du pancréas (Yu, Hamza et al. 2010). Parmi ces études, certaines ont montré son efficacité anti-tumorale *in vivo* (Yang, Shi et al. 2007; Stan, Hahm et al. 2008; Samadi, Mukerji et al. 2010; Yu, Hamza et al. 2010). Selon le type cellulaire, l'induction de l'apoptose se produit via la voie des récepteurs de mort (Lee, Um et al. 2009) ou la voie mitochondriale (Malik, Kumar et al. 2007; Mandal, Dutta et al. 2008). De plus, deux études mettent en évidence un rôle des EAO dans l'induction de la mort de cellules cancéreuses par WFA (Malik, Kumar et al. 2007; Lee, Um et al. 2009). WFA est susceptible d'agir sur d'autres types de cancers comme le mélanome. Son rôle pro-oxydant potentiel serait un avantage dans ce type de tumeur.

- Cibles directes et indirectes de WFA

Le mode d'action de WFA n'est pas élucidé cependant les études de plus en plus nombreuses révèlent de nombreuses cibles directes ou indirectes et plusieurs voies de signalisation dérégulées par la WFA (voir Tableau 3).

La voie NF- κ B

Depuis l'étude de 2004 qui montre l'effet inhibiteur de l'activation de NF- κ B, diverses études ont reproduit cet effet (Kaileh, Vanden Berghe et al. 2007; Singh, Aggarwal et al. 2007; Ndlovu, Van Lint et al. 2009; Grover, Shandilya et al. 2010) et notamment dans des cellules cancéreuses (Oh, Lee et al. 2008; Koduru, Kumar et al. 2010) et en ont étudié les mécanismes. Les auteurs ont d'abord mis en évidence le défaut de phosphorylation d'I κ B et l'inhibition de translocation de NF- κ B au noyau par WFA (Kaileh, Vanden Berghe et al. 2007; Singh, Aggarwal et al. 2007). Une récente étude par Grover et al *in silico* a permis de déterminer que WFA peut se fixer directement sur NEMO (NF- κ B essential modulator) dans le complexe activateur de NF- κ B : IKK (I κ B kinase), formé par NEMO et IKK- β (kinase qui phosphoryle et induit la dégradation d'I κ B). La fixation de WFA dissocie le complexe et empêche ainsi l'activation de NF- κ B (Grover, Shandilya et al. 2010). Cet effet direct de WFA sur l'activation de NF- κ B peut expliquer sa capacité à sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort cellulaire. Ce rôle est intéressant dans le cas du mélanome.

La voie du protéasome

En 2007, Yang et al ont mis en évidence, par une étude *in silico*, le potentiel de WFA pour interagir et inhiber l'activité du protéasome (Yang, Shi et al. 2007). Les auteurs ont également testé l'effet direct de WFA sur des protéasomes purifiés de lapin (unité 20S) et de cellules humaines (unité 25S). Cet effet est confirmé sur des lignées de cancer de la prostate en culture et xenogreffées dans des souris. Dans ce modèle, le rôle anti-tumoral de WFA, *in vitro* et *in*

vivo, semble passer par une inhibition du protéasome (Yang, Shi et al. 2007). Il est important de noter qu'I κ B étant une cible du protéasome, l'effet *in cellulo* et *in vivo* passe en partie par une inhibition de l'activité de NF- κ B. De plus, l'inhibition du protéasome augmente l'effet d'inhibition de la voie NF- κ B que nous avons mentionné dans le paragraphe précédent. Une étude récente de Grover et al affine l'étude *in silico* sur l'interaction protéasome-WFA (Grover, Shandilya et al. 2010). Les auteurs mettent en évidence une action efficace et irréversible de WFA sur le protéasome et concluent sur le potentiel de WFA comme candidat chimiothérapeutique moins toxique que les inhibiteurs du protéasome actuellement disponibles (Grover, Shandilya et al. 2010).

Le cytosquelette

Une première étude en 2006 montre que WFA est capable d'altérer l'architecture des cellules par interaction avec le cytosquelette d'actine (Falsey, Marron et al. 2006). Les auteurs montrent que WFA n'interagit pas directement avec l'actine mais avec l'annexin II, une protéine adaptatrice. Cette action de désorganisation provoquée par WFA est responsable d'une inhibition des capacités migratoires et du caractère invasif des cellules (Falsey, Marron et al. 2006). Cette étude conforte l'effet anti-angiogénique rapporté par Mohan et al en 2004 par l'observation d'une baisse de la prolifération et du « bourgeonnement » (« sprouting ») de cellules endothéliales traitées par de la WFA (Mohan, Hammers et al. 2004). Les mêmes investigateurs ont également montré, *in vitro* et *in vivo*, une interaction directe de WFA avec la vimentine des filaments intermédiaires (Bargagna-Mohan, Hamza et al. 2007). Très récemment une autre équipe a confirmé l'action de WFA sur la vimentine (Lahat, Zhu et al. 2010). Les auteurs montrent que WFA induit le clivage de la vimentine par les caspases en plus d'induire l'apoptose de cellules de sarcome. Ils montrent aussi que WFA a peu d'effet sur des cellules endothéliales non-prolifératives. Dans un modèle de xénogreffe de sarcome chez la souris, les auteurs observent un blocage de la croissance tumorale et une dégradation de la vimentine qui s'accompagne d'une baisse de l'angiogénèse et des métastases (Lahat, Zhu et al. 2010). La vimentine étant exprimée dans les cellules ayant subi une transition épithélio-mésenchymateuse, cette étude confirme l'effet anti-métastatique de WFA contre la formation de métastases.

Les protéines kinases

WFA est susceptible d'influer sur plusieurs voies de signalisation en modifiant l'activité de protéines kinases. WFA est par exemple capable de déclencher l'activation de la MAP kinase (MAPK) p38 comme cela a été rapporté par Mandal et al dans des cellules leucémiques (Mandal, Dutta et al. 2008). La MAPK p38 est normalement activée suite à un stress cellulaire (rayons UVs, EAO, dommages à l'ADN) et elle est impliquée dans le déclenchement d'une

signalisation pro-apoptotique. Mandal et al montrent, dans leur modèle, un rôle indispensable de la signalisation p38 dans le déclenchement de l'apoptose suite au traitement des cellules par WFA (Mandal, Dutta et al. 2008). La kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) est, comme p38, activée en réponse aux stress cellulaires et mène à l'induction de l'apoptose. Koduru et al, dans un modèle de cancer du côlon, mettent en évidence une mort apoptotique médiée par l'activation de JNK suite à l'action de WFA (Koduru, Kumar et al. 2010). Les signalisations pro-survie sont aussi impliquées et plus particulièrement la voie Ras/Raf/Mek/Erk et la voie PI3K/Akt que nous avons vu précédemment pour leur rôle central dans la résistance des mélanomes. Plusieurs études mettent en évidence une inhibition de la phosphorylation d'Akt (Oh, Lee et al. 2008; Oh and Kwon 2009; Koduru, Kumar et al. 2010) et également de Erk (Oh and Kwon 2009). L'étude de Koduru et al montre que WFA induit une baisse de phosphorylation d'Akt et de mTOR consécutive à l'inhibition de Notch-1 (Koduru, Kumar et al. 2010). WFA présente donc l'avantage d'activer des voies de signalisation pro-apoptotiques et d'inhiber des voies pro-survies qui sont souvent activées dans les cellules tumorales.

Le stress RE et les chaperonnes

Lee et al ont observé l'augmentation du taux de protéine CHOP après action de WFA sur des cellules de cancer rénal (Lee, Um et al. 2009). CHOP, dans ce modèle, déclenche la mort par la voie extrinsèque de l'apoptose. De plus, les auteurs montrent que les EAO produisent, après traitement par WFA, l'activation de CHOP (Lee, Um et al. 2009). Une récente étude de la même équipe confirme que WFA provoque un excès d'EAO qui entraîne un stress du RE et la mort cellulaire par apoptose (Choi, Park et al. 2011). L'observation de l'activation d'un stress du RE est confortée par les travaux de Yu et al et Grover et al qui mettent en évidence une interaction entre WFA et la chaperonne résidente du RE, Hsp90 (Grover, Shandilya et al. 2010; Yu, Hamza et al. 2010). Cette chaperonne est surexprimée dans de nombreux cancers (Richardson, Mitsiades et al. 2011) et notamment dans les mélanomes où elle peut servir de marqueur de la progression (McCarthy, Pick et al. 2008). Elle est également une cible thérapeutique car elle déclenche des signalisations pro-survie et anti-apoptotique (Solit, Osman et al. 2008). Yu et al rapportent l'inhibition de Hsp90 par WFA et la dégradation de ses cibles comme la kinase Akt (Yu, Hamza et al. 2010).

Les membres de la famille Bcl-2 et les IAPs

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle important dans la régulation de la mort cellulaire. Les résultats divergent concernant l'expression des membres de la famille Bcl-2. Mandal et al mettent en évidence une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et une baisse du taux de Bcl-2 dans des lignées de leucémie traitées par WFA (Mandal, Dutta et al. 2008). Dans le même type tumoral, mais dans des lignées différentes, Oh

et al ne montrent pas de changement dans le niveau d'expression de Bax. Cependant, ils observent bien une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 ainsi que Bcl-x_L et Mcl-1 (Oh, Lee et al. 2008). Ces deux articles montrent une apoptose Bax dépendante assurée par une diminution du ratio Bcl-2/Bax. Stan et al, dans des cellules de cancer du sein, remarquent une légère diminution des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Stan, Hahm et al. 2008). Dans cette étude Bcl-2 est d'abord augmenté par l'effet de WFA puis son expression diminue (Stan, Hahm et al. 2008). Les auteurs montrent une augmentation de l'expression des membres anti-apoptotiques Bcl-x_L et Mcl-1 et notent une forte augmentation de celle de la protéine pro-apoptotique Bim (Stan, Hahm et al. 2008). Il s'agit d'une activation indirecte via son régulateur transcriptionnel FOXO3a (Stan, Hahm et al. 2008). La protéine Bim est, dans ce modèle, essentielle au déclenchement de l'apoptose.

Oh et al ont également étudié l'expression de deux IAPs. Lors du traitement par WFA, les auteurs montrent une diminution de l'expression de XIAP et pas de changement d'expression de cIAP2 (Oh, Lee et al. 2008).

Le rôle de WFA sur l'expression des membres de la famille Bcl-2 participe à l'induction de l'apoptose mais semble varier d'un type cellulaire à l'autre.

Protéines	Fonction	Méthode	Références
Interactions directes			
Protéasome	Dégradation, stress cellulaire, voie NF-κB	In silico, In vitro, In vivo	(Yang, Shi et al. 2007)
NEMO	voie de survie NF-κB	In silico, In vitro	(Kaileh, Vanden Berghe et al. 2007; Singh, Aggarwal et al. 2007; Ndlovu, Van Lint et al. 2009; Grover, Shandilya et al. 2010)
Vimentin	Migration cellulaire	In vitro, In vivo	(Bargagna-Mohan, Hamza et al. 2007; Lahat, Zhu et al. 2010)
Annexin II	Migration cellulaire	In vitro	(Falsey, Marron et al. 2006)
Hsp 90	Stress cellulaire	In silico, In vitro	(Grover, Shandilya et al. 2010; Yu, Hamza et al. 2010)
Interactions indirectes			
JNK et p38	Voie pro-apoptototique	In vitro	(Mandal, Dutta et al. 2008) ; (Koduru, Kumar et al. 2010)
Akt et Erk	Voie anti-apoptotique	In vitro	(Oh, Lee et al. 2008; Oh and Kwon 2009; Koduru, Kumar et al. 2010) ; (Oh and Kwon 2009)
CHOP	Stress cellulaire	In vitro	(Lee, Um et al. 2009)

Tableau 3 : Cibles directes et indirectes de WFA

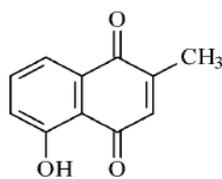
Les études sur l'effet de WFA sur les cancers, montrent un rôle direct sur l'induction d'un stress cellulaire (EAO, stress du RE), l'inhibition de la voie de survie NF- κ B et d'autres voies de survie via l'inhibition de Hsp90 ajouté à l'inhibition de la migration et de l'angiogénèse. WFA peut également inhiber l'activité de protéines pro-survie (Akt, mTOR, Erk) et activer les protéines pro-apoptotiques JNK, p38 et CHOP. De plus il régule l'expression des membres de la famille Bcl-2 et de certains IAPs. WFA induit l'apoptose dans de nombreux types de cancer, cependant son action est à tester dans chaque type cellulaire car ses effets sont très variables. Les voies régulées par WFA sont particulièrement intéressantes pour en faire un candidat potentiel au traitement des mélanomes.

b) La molécule Plumbagine (PBG)

- Découverte des effets de PBG

La Plumbagine ($C_{11}H_8O_3$; 5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphtoquinone, voir Fig.26) est la substance la plus active des plantes du genre *Plumbago*, comme *Plumbago zeylanica* L., que l'on isole principalement des racines. Elle a d'abord été décrite en 1968 comme une substance anti-microbienne par de Lima et al, une équipe brésilienne qui étudiait les propriétés d'une plante médicinale locale (de Lima OG et al 1968). Les plantes de la famille des Plumbaginaceae sont présentes aussi bien dans les régions froides que dans les régions tropicales. Elles sont depuis longtemps utilisées dans les médecines traditionnelles et plus particulièrement en Asie du Sud-Est et en Afrique sub-saharienne comme remède contre les maladies de peau, les infections intestinales, les rhumatismes, etc... Elles sont également utilisées comme abortif. La plupart des effets de PBG ont été confirmés par diverses études, à commencer par les activités anti-bactérienne et anti-parasitaire. La PBG et ses dérivés montrent des propriétés contre de nombreuses bactéries (Durga, Sridhar et al. 1990; de Paiva, Figueiredo et al. 2003) comme *Escherichia coli* (Farr, Natvig et al. 1985), les gonorrhées (Kuete, Tangmouo et al. 2009) et également des mycobactéries (Mathew, Kruthiventi et al. 2010) et des pseudomonas et entérobactéries résistantes aux antibiotiques (Kuete, Alibert-Franco et al. 2011). Certaines études présentent un rôle intéressant contre les vers parasites nématodes et ascaris (Fetterer and Fleming 1991) et aussi et surtout contre des parasites plus dangereux : *Trypanosoma cruzi* (agent des trypanosomiasés) (Salmon-Chemin, Lemaire et al. 2000), *Leishmania donovani* (agent de la leishmaniose viscérale) (Croft, Evans et al. 1985) et *Plasmodium falciparum* (agent de la malaria) (Krungkrai, Kanchanarithsak et al. 2002). PBG a des effets anti-inflammatoires (Checker, Sharma et al. 2009), anti-fertilité et anti-tumoraux (Kini, Pandey et al. 1997). Son utilisation traditionnelle contre les affections de la peau lui a

valu très tôt d'être testé dans les cancers de la peau (Melo, Jardim et al. 1974). Comme WFA, elle a montré un effet dans la sensibilisation du mélanome murin à la radiothérapie (Prasad, Devi et al. 1996).



Plumbagin

Figure 26 : Plumbagine (PBG)

Structure chimique de la molécule PBG (C₁₁H₈O₃ ; 5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphtoquinone). (D'après Inbaraj & Chignell, Chem Res Toxicol, 2004)

- Etudes récentes sur le rôle anti-tumoral de PBG

Tout comme la molécule WFA, il y a eu un regain d'intérêt pour PBG à partir 2004 alors que des effets anti-cancéreux étaient déjà connus (Krishnaswamy and Purushothaman 1980). De nombreuses équipes se sont intéressées à PBG comme agent anti-tumoral dans divers modèles. En effet, PBG agit sur le cancer des ovaires (Srinivas, Annab et al. 2004; Thasni, Rakesh et al. 2008), du col de l'utérus (Srinivas, Gopinath et al. 2004; Nair, Nair et al. 2008), du sein (Kuo, Hsu et al. 2006; Ahmad, Banerjee et al. 2008), de la prostate (Aziz, Dreckschmidt et al. 2008; Powolny and Singh 2008), du poumon (Hsu, Cho et al. 2006; Acharya, Bhattacharyya et al. 2008; Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008), du foie (Shih, Lee et al. 2009), du pancréas (Chen, Chang et al. 2010), et aussi le myélome (Sandur, Pandey et al. 2010), la leucémie (Kawiak, Piosik et al. 2007; Xu and Lu 2010) et le mélanome (Wang, Chiang et al. 2008). La plupart des études montrent un arrêt du cycle cellulaire et/ou un déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose avec le plus souvent activation de la cascade protéolytique des caspases (Srinivas, Annab et al. 2004; Srinivas, Gopinath et al. 2004; Hsu, Cho et al. 2006; Kawiak, Piosik et al. 2007; Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008; Powolny and Singh 2008; Wang, Chiang et al. 2008; Chen, Chang et al. 2010; Sandur, Pandey et al. 2010; Xu and Lu 2010). Kuo et al ont montré un arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de l'autophagie par PBG (Kuo, Hsu et al. 2006). Shih et al ont utilisé une dose sub-létale pour mettre en avant le rôle de PBG dans l'inhibition de la migration des cellules cancéreuses (Shih, Lee et al. 2009). Cinq études ont été menées sur le rôle anti-tumoral de PBG chez la souris (Devi, Rao et al. 1998; Hsu, Cho et al. 2006; Aziz, Dreckschmidt et al. 2008; Wang, Chiang et al. 2008; Xu and Lu 2010). Les auteurs montrent dans tous les cas une diminution de la taille des tumeurs xénogreffées et l'absence de toxicité pour les tissus sains. L'étude de Wang et al montre un rôle prometteur de PBG contre les mélanomes (Wang, Chiang et al. 2008).

- Protéines et voies ciblées par PBG

Les cibles de PBG sont regroupées dans le Tableau 4.

De nombreuses études montrent l'implication des EAO dans le déclenchement de l'apoptose induite par PBG (Srinivas, Gopinath et al. 2004; Kawiak, Piosik et al. 2007; Powolny and Singh 2008; Wang, Chiang et al. 2008; Xu and Lu 2010). Ainsi, même si certains ont rapporté un effet antioxydant de PBG (Tilak, Adhikari et al. 2004; Ding, Chen et al. 2005), c'est clairement sa capacité à générer des EAO et donc son effet pro-oxydant qui est impliqué dans son rôle anti-tumoral (Nazeem, Azmi et al. 2009).

NF- κ B et protéines anti-apoptotiques

En 2006, Sandur et al mettent en évidence un rôle inhibiteur de l'activation de NF- κ B susceptible d'être à l'origine de l'apoptose induite par PBG (Sandur, Ichikawa et al. 2006). Cette étude montre que PBG provoque une baisse de l'activation d'IKK, de la phosphorylation, de la dégradation d'I κ B et de la translocation de NF- κ B au noyau (Sandur, Ichikawa et al. 2006). Les auteurs montrent que PBG est capable de se fixer directement à la sous-unité p65 de NF- κ B et d'empêcher sa fixation à l'ADN (Sandur, Ichikawa et al. 2006). PBG provoque donc une diminution de l'expression des protéines anti-apoptotiques régulées par NF- κ B comme : c-IAP1, c-IAP2, Bcl-2, Bcl-x_L, cFlip et survivin (Sandur, Ichikawa et al. 2006). Ces effets de PBG sur l'inhibition de NF- κ B et de ses cibles ont été confirmés par trois autres études dans des modèles de cancers du sein, de la prostate et du poumon (Ahmad, Banerjee et al. 2008; Aziz, Dreckschmidt et al. 2008; Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008). L'action anti-cancéreuse de PBG passe donc par l'inhibition de la voie de survie NF- κ B et des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et des IAPs.

Les protéines kinases

Gomathinayagam et al ont également montré l'implication de la voie PI3K/Akt (Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008). Dans son modèle cellulaire de cancer du poumon, la baisse de l'activation d'Akt est impliquée dans la mort induite par PBG, ajouté à de l'inhibition de la voie NF- κ B. Il ne s'agit pas ici d'une action directe, mais de la conséquence de la baisse d'expression d'EGFR et donc de l'inactivation des signalisations situées en aval (Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008). D'autres kinases sont impliquées, il s'agit de JNK et p38 qui vont contribuer à activer l'apoptose (Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008). JNK est également important dans le déclenchement de l'apoptose dans l'étude sur les mélanomes, à la différence de p38 (Wang, Chiang et al. 2008). Dans ce cas il semble s'agir de la conséquence de l'action des EAO générés par PBG. PBG est donc indirectement capable d'inhiber des kinases impliquées dans des voies de survie et d'activer (via la production d'EAO ?) les protéines kinases à action pro-apoptotique.

La migration et l'angiogenèse

L'étude de Sandur et al en 2006 a mis en évidence des marqueurs angiogéniques après traitement de cellules par PBG (Sandur, Ichikawa et al. 2006). Les auteurs ont ainsi montré une baisse d'expression de MMP-9 et VEGF qui les conduit à conclure que PBG inhiberait l'invasion tumorale et l'angiogénèse. L'étude plus récente de Shih et al en 2009 qui s'est uniquement attachée à analyser la migration et à l'invasion cellulaire va dans le même sens. Les auteurs observent une baisse d'expression des marqueurs MMP-2 et u-PA (urokinase plasminogen activator) corrélée avec l'inhibition de la migration de ces cellules (Shih, Lee et al. 2009). Ces études laissent présager un rôle anti-angiogénique et anti-métastatique de PBG qui reste à approfondir.

Protéines	Fonction	Méthode	Références
Interactions directes			
NF-κB (et EGFR)	Voie de survie NF-κB	In vitro	(Sandur, Ichikawa et al. 2006) ; (Ahmad, Banerjee et al. 2008; Aziz, Dreckschmidt et al. 2008; Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008)
Interactions indirectes			
JNK et p38	Voie pro-apoptotique	In vitro	(Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008; Wang, Chiang et al. 2008)
Akt	Voie anti-apoptotique	In vitro	(Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008)
MMP-2, MMP-9, u-PA et VEGF	Migration cellulaire et angiogénèse	In vitro, In vivo	(Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008) ; (Wang, Chiang et al. 2008)
Bcl-2, Bcl-x _L et IAPs	Résistance à l'apoptose	In vitro	(Sandur, Ichikawa et al. 2006) ; (Gomathinayagam, Sowmyalakshmi et al. 2008)

Tableau 4 : Cibles directes et indirectes de la PBG

PBG présente diverses actions pro-apoptotiques qui mettent en cause des voies et des protéines impliquées dans la résistance des mélanomes. PBG a déjà été testé dans un modèle de lignée de mélanome. Tout comme pour WFA, il ne s'agit pas d'une seule action ciblée mais de plusieurs rôles impliquant de nombreuses cibles (directes et indirectes) qui restent encore à identifier.

La chimiorésistance des mélanomes découle de l'activation et de l'amplification de nombreuses voies de survie et protéines anti-apoptotiques. La sensibilisation de ces tumeurs à la mort cellulaire doit passer par l'association de plusieurs traitements ciblés et/ou de l'utilisation de molécules pléiotropes comme WFA et PBG.

Objectifs

L'apoptose est considérée comme une stratégie de choix pour éliminer les cellules tumorales. Cependant, une des caractéristiques du cancer est l'acquisition de la résistance à la mort cellulaire. Cette résistance peut, entre autre, être expliquée par le développement d'une tolérance à différents stress cellulaires. Ces stress peuvent entraîner des altérations responsables de l'augmentation de l'expression de protéines anti-apoptotiques et de l'activation de voies de survie. Il est donc important d'identifier de nouvelles approches pour sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort cellulaire. Ces nouvelles stratégies seront capables de cibler certaines spécificités des cellules tumorales comme les stress cellulaires, les protéines anti-apoptotiques ou les voies de survie. Elles pourraient être utilisées en combinaison avec des molécules existantes pour sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose voire même à la nécrose.

La mitochondrie, intégrateur des signaux apoptotiques, est une cible des traitements anti-cancéreux. Au cours de l'apoptose, ANT, la protéine majoritaire de la membrane interne mitochondriale, participe à la régulation de la PMM. L'objectif de la première étude est d'identifier le rôle de l'isoforme ANT4 dans la régulation de l'apoptose dans des lignées cellulaires cancéreuses. La démonstration du rôle anti-apoptotique d'ANT4 dans l'apoptose, permet de considérer ANT comme une cible thérapeutique anticancéreuse, bien que des travaux supplémentaires soient encore nécessaires. (Article 1)

La résistance à la mort cellulaire est une caractéristique du mélanome, cancer meurtrier et sans traitement efficace. Dans une seconde étude nous avons entrepris de sensibiliser des cellules de mélanome en utilisant deux nouvelles molécules prometteuses, la Withaférine A (Article 2) et la Plumbagine (Article 3, en préparation). Nous avons étudié les capacités de ces molécules à sensibiliser plusieurs lignées cellulaires de mélanomes à l'apoptose ou à la nécrose ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués afin de caractériser les mécanismes de tolérance communs ou divergents entre ces différentes lignées. L'étude de molécules capables d'éliminer les cellules de mélanome en ciblant des mécanismes de résistance est importante pour l'élaboration de nouvelles thérapies.

Matériels et méthodes

I- Matériels

1) Produits

La Withaférine A (WFA) provient de chez Enzo Life Sciences et l'inhibiteur des caspases zVAD-fmk de chez Bachem.

Les produits de culture cellulaire sont fournis par Invitrogen.

Les sondes fluorescentes sont fournies par Molecular Probes, Invitrogen.

Tous les autres produits proviennent de chez Sigma-Aldrich.

2) Lignées cellulaires

Les lignées HeLa, HT29, HCT116, M14 et Lu1205 sont cultivées en milieu DMEM F12 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de glutamax et 1% de pénicilline/streptomycine.

Les lignées SK28 et Mel501 sont cultivées en milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et 1% de pénicilline/streptomycine.

Les lignées HeLa (carcinome cervical) et HT29 (carcinome du colon) ont été transfectées par les plasmides pcDNA3.1 (Invitrogen), pcDNA3.1-ANT1, pcDNA3.1-ANT2, pcDNA3.1-ANT3 ou pcDNA3.1-ANT4.

Les lignées HeLa et HeLa Bcl-2 nous ont été généreusement fournies par le Dr V. Goldmacher (Immunogen, Cambridge, MA, USA) et les lignées HCT116 (carcinome du colon), HCT116 Bax KO par B. Vogelstein (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA).

La lignée M14 (mélanome métastatique) nous a été généreusement fournie par le Pr S. Pervaiz (National University of Singapore, Singapore).

Les lignées Mel501 (métastase au nodule lymphatique), SK28 (mélanome primaire) et Lu1205 (métastase issue de la lignée WM793) sont un don généreux du Dr L. Larue (Institut Curie, Orsay, France).

Toutes les lignées sont cultivées à 37°C avec 5% de CO₂.

3) Construction des plasmides ANT3, 4 -V5

Les plasmides codant hANT3 et hANT4 proviennent d'Openbiosystems. Ils ont été séquencés et clonés dans le plasmide pcDNA-V5-3.1 (version A; Invitrogen) en utilisant les amorces suivantes: 5'-GCGGACGTGGGAAAGTCAGGCACAGAGCG-3' (hANT3); 5'-

AGCCTGCGAAAAAGAAGGCAG-3' (hANT4); amorces anti-sens: 5'-AGGACGTTGGACCACGCACCC- 3' (hANT3); 5'-TACCTACCACCAATATCAAT-3' (hANT4). Les vecteurs d'expression résultant sont composés du cadre ouvert de lecture des isoformes ANT humains fusionnés en N-terminal avec l'épitope V5.

4) Souris

Les souris utilisées pour la purification de mitochondries et de réticulum endoplasmique (RE) sont des femelles Swiss âgées de 6 semaines provenant de chez C.E.C. (Sarl CEC, Domaine St Louis, 95710 Bray et LU).

Les souris Swiss nu/nu utilisées dans l'étude *in vivo* âgées de 7 semaines provenant de chez Charles River (Laboratoire Charles River, 69210 L'Abresle cedex)

II- Méthodes

1) Fractionnement cellulaire

Les cellules HeLa,ensemencées en boîtes de culture 175 cm³ (8×10⁶ cellules par boîtes), sont fractionnées à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce. L'homogénat subit ensuite des centrifugations différentielles à 4°C pour récupérer le noyau (700g), les mitochondries (10000g), le RE (100000g) et le cytosol (surnageant 100000g). 50 µg de protéines sont analysées sur gel SDS-PAGE (BioRad) 12.5%, coloré au Bleu de Coomassie R250 ou par Western blot.

2) Mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire

a) Test BrdU

La prolifération des cellules HeLa est analysée par l'incorporation du 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, Amersham). Les cellules sont incubées avec 30 µM de BrdU pendant 2 h en plaque 96-puits (1,5×10³ cellules par puit). L'incorporation du BrdU est quantifiée par la mesure de l'absorbance à 415nm à l'aide d'un spectrophotomètre (TECAN).

b) Test FDA

La viabilité des cellules de mélanome est étudiée à l'aide de la fluorescéine diacétate (FDA). La FDA est clivée en fluorescéine par les estérases présentes dans les cellules vivantes. Les cellules sontensemencées en plaque 24-puits (7×10³ cellules par puit). Après 24h de traitement par WFA, les cellules sont incubées pendant 10 min en présence de FDA (1

$\mu\text{g/mL}$) à 37°C . Le marquage est ensuite analysé par cytométrie en flux (Epics XL, Beckman Coulter).

3) Mesure de l'apoptose et de la nécrose

a) Marquage Hoechst/iodure de propidium (IP)

Les cellules de mélanome sontensemencées en plaque 24-puits (7×10^4 cellules par puit). Après 24h de traitement par WFA ou PBG, les cellules sont trypsinées, centrifugées et resuspendues dans 20 μL PBS contenant 2 μM de Hoechst pour visualiser l'ADN condensé/fragmenté. Juste avant l'observation, la sonde imperméante IP (20 $\mu\text{g/mL}$) est ajoutée pour déterminer la perméabilisation précoce de la membrane plasmique associée avec la nécrose. Les analyses quantitatives sont réalisées par comptage de plus de 500 cellules au microscope à fluorescence Leica (type DMRH).

b) Mesure de l'hypoploïdie (SubG1)

Les cellules HeLa ou mélanomes sontensemencées en plaque 12-puits ($1,3 \times 10^5$ cellules par puit). Après 48h traitement par STS, LND ou WFA, les cellules sont trypsinées, centrifugées, resuspendues dans du PBS 2% SVF et fixées dans l'éthanol 70% froid. Elles sont conservées à -20°C pendant au moins 24h. Les cellules sont ensuite lavées au PBS et marquées à l'IP (50 $\mu\text{g/mL}$) en présence de RNase A (250 $\mu\text{g/mL}$). Le marquage est analysé par cytométrie en flux (Cell Lab Quanta MPL, Beckman Coulter).

4) Préparation des échantillons pour la microscopie électronique

Les cellules Mel501, SK28 et Lu1205 sontensemencées en plaque 6-puits ($3,4 \times 10^5$ cellules par puit). Après 24h de traitement par WFA ou PBG, les cellules sont fixées dans un tampon contenant 4% de glutaraldéhyde et 0,1M de cacodylate de sodium pendant 1h à température ambiante. Puis elles sont rincées dans un tampon contenant 0,1M de cacodylate de sodium et 0,4M de sucrose pendant 1h à température ambiante. Les échantillons sont inclus dans la paraffine, coupés et montés sur lames. Les images sont obtenues à la plate-forme de microscopie électronique de l'INRA (Jouy-en-Josas, France).

5) Analyse de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose

Les cellules Mel501, SK28 et Lu1205 sontensemencées en boîtes 25 cm^3 ($8,8 \times 10^5$ cellules par boîte). Après 48h de traitement par WFA ou PBG, les cellules sont trypsinées, lavées au PBS et incubées 2h à 50°C dans du tampon de lyse (10 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM EDTA, 0,5% de SDS) contenant 100 $\mu\text{g/mL}$ de protéinase K. La fraction contenant l'ADN de

bas poids moléculaire est isolée par centrifugation (15000g) pendant 15 min à 4°C. Elle est ensuite précipitée dans de l'éthanol 70% froid. L'ARN est éliminé par l'incubation dans un tampon RNase A (10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA et 1 µg/ml de RNase A) pendant 1h à 37°C. Les fragments d'ADN sont précipités dans de l'éthanol 70% froid. Les fragments d'ADN migrent sur gel d'agarose 1,2% contenant 100 µg/mL de bromure d'éthidium à 100V pendant 30 min.

6) Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial

Le potentiel mitochondrial transmembranaire est mesuré par la sonde cationique DiOC6(3). Les cellules HeLa, HCT116 ou mélanomes sont ensemencées en plaque 24-puits (7×10⁴ cellules par puit). Après 24h de traitement par STS, LND, WFA ou PBG, les cellules sont incubées à 37°C avec 100 nM de DiOC6(3) pendant 30 min et analysées par cytométrie en flux (Cell Lab Quanta MPL ou Epics XL, Beckman Coulter).

7) Mesure de la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale

La perméabilisation de la membrane interne mitochondriale est évaluée par le marquage calcéine-AM/cobalt comme décrit précédemment (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). Les cellules HeLa, HCT116 ou mélanomes sont ensemencées en plaque 24-puits (7×10⁴ cellules par puit). Après 24h de traitement par STS, LND, WFA ou PBG, les cellules sont marquées pendant 10 min à 37°C avec de la calcéine-AM (1 µM) en présence de cobalt (1 mM) dans la solution HBSS (Hank's balanced salt solution, Invitrogen) avec 1 mM de HEPES. Après marquage, les cellules sont traitées pendant 24h. La fluorescence de la calcéine est analysée par cytométrie en flux (Cell Lab Quanta MPL ou Epics XL, Beckman Coulter).

8) Mesure de la respiration mitochondriale des EAO

a) Mesure de la consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'une électrode Oxytherm (Hansatech Instruments) à 25°C comme décrit précédemment (Chen and Pervaiz 2007). Les mitochondries isolées sont ajoutées à chaque compartiment dans le tampon suivant : 200mM mannitol, 75mM sucrose, 0,1mM EDTA, 10mM K₂HPO₄, 10mM KCl and 10mM Tris-HCl (pH 7.4). L'étape 2 de la respiration mitochondriale est stimulée par l'ajout de 10mM de succinate et 5mM de rotenone. L'étape 3 de la respiration est initiée avec 0,2mM d'ADP. L'acquisition et l'analyse sont réalisées à l'aide d'un Oxygraphe Plus (Hansatech Instruments).

b) Mesure des EAO intracellulaires

L'accumulation d'anion superoxide ($O_2^{\cdot-}$) mitochondrial est déterminée par la sonde MitoSOX Red. Les cellules HeLa ou mélanomes sont ensemencées en plaque 24-puits (7×10^4 cellules par puit). Après 24h de traitement WFA (ou en l'absence de traitement pour les cellules HeLa), les cellules sont lavées dans du HBSS 1X et marquées avec $2 \mu\text{M}$ de MitoSOX Red à 37°C pendant 10 min. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) intracellulaire est mesuré à l'aide de la sonde carboxy- $H_2\text{DFFDA}$. Les cellules HeLa ou mélanomes traitées sont lavées dans du HBSS 1X et marquées avec $10 \mu\text{M}$ de $H_2\text{DFFDA}$ à 37°C pendant 10 min. La fluorescence des cellules est analysée par cytométrie en flux (Cell Lab Quanta MPL ou Epics XL, Beckman Coulter).

9) Immunofluorescence

Pour déterminer la localisation intracellulaire du cytochrome *c* (cyt *c*), les cellules Mel501 et Lu1205 sont ensemencées sur lamelles en plaque 6-puits ($3,4 \times 10^5$ cellules par puit). Elles sont ensuite traitées avec WFA, lavées au PBS 1X, fixées dans du paraformaldehyde 3.7% pendant 10 min à température ambiante et perméabilisées 3 min dans l'acétone à -20°C . Les cellules sont saturées en PBS/3% sérum albumine bovine (SAB) pendant 30 min et incubées 1h avec l'anticorps anti-cyt *c* (mAb 6H2.B4, BD Biosciences) dans du PBS/1% SAB à température ambiante. Après deux lavages, l'anticorps secondaire (IgG chèvre anti-souris couplé-Cy3, Jackson ImmunoResearch) est ajouté dans du PBS/1% BSA. Le noyau est marqué avec $2,5 \mu\text{g/mL}$ de Hoechst pendant 5 min. Les images sont analysées par un microscope à fluorescence Leica.

10) Western blot

Les cellules HeLa ou mélanomes sont ensemencées en plaque 6-puits ($3,4 \times 10^5$ cellules par puit) ou en boîtes 25 cm^3 ($8,8 \times 10^5$ cellules par boîte). Après traitement, les cellules sont trypsinées et lavées deux fois avec du PBS puis congelées à -20°C . Les cellules sont lysées en tampon RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% acide déoxycholique) avec un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et du PMSF pendant 30 min à 4°C . Les protéines (30 μg) sont séparées sur gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide et transféré sur membrane PVDF (Millipore). Les membranes sont incubées sur la nuit à 4°C avec les anticorps suivants: anti-caspase 9 (5B4) et anti-Mcl-1 (Y37) d'Abcam, anti-caspase 3 et anti-Bcl-xL (54H6) de Cell Signaling, anti-Bcl-2 (100), anti-Bax (N-20), anti-Bim (N-20), anti-GRP78 (N-20) et anti- β -actin (C4) de Santa Cruz

Biotechnology, monoclonal anti-VDAC1 de Calbiochem. Les protéines sont détectées sur Chemidoc XRS (Biorad) par la méthode ECL en accord avec les instructions de Millipore. La densitométrie des bandes est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

11) Transfections transitoires

Les cellules Mel501 sont semencées en plaque 24-puits (10^5 cellules par puit). Le lendemain de l'ensemencement, les cellules sont co-transfectées transitoirement avec le plasmide pEGFP-N2 et, soit un vecteur vide pcDNA3.1-V5, soit le plasmide pSFFV-Bcl-2 (généreusement fourni par le Pr B. Mignotte, LGBC, Versailles, France) dans des proportions 1 pour 5. Les transfections sont réalisées avec l'agent de transfection ExGen 500 (Fermentas). Un mélange de 0,5 µg d'ADN et de 3,3 µL d'ExGen est ajouté à 10^5 cellules. Après 24h, les cellules sont incubées avec WFA pour 24h supplémentaires. Le potentiel transmembranaire mitochondrial des cellules est mesuré à l'aide d'un marquage avec la sonde CMXRos (Invitrogen) à 100 nM pendant 30 min à 37°C. La fluorescence rouge du CMXRos est déterminée par cytométrie en flux au sein de la population cellulaire verte GFP positive.

12) Tests fonctionnels sur mitochondries isolées

a) Mitochondries seules

Les mitochondries sont purifiées à partir d'homogénat de foie de souris par centrifugations différentielles à 4°C et purifiées sur gradient de Percoll (Belzacq-Casagrande, Martel et al. 2009). La concentration protéique mitochondriale est déterminée par le test BCA (acide bicinchonique, Pierce). Pour mesurer le gonflement matriciel et la dépolarisation, les mitochondries (25 µg de protéines) sont diluées dans un tampon hypo-osmotique (10 mM Tris-Mops, pH 7.4, 5 mM succinate, 300 mM sucrose, 1 mM Pi, 100 µM EGTA, 2 µM rotenone) et plusieurs doses de Ca²⁺ ou de WFA sont ajoutées. Le gonflement matriciel mitochondrial est mesuré par la diminution de l'absorbance à 540 nm et à 37°C. La dépolarisation mitochondriale est mesurée par la diminution de la fluorescence de la rhodamine 123 (1 µM) (λ_{exc} : 485 nm, λ_{em} : 535 nm, Invitrogen) à 37°C (Infinite M200, TECAN). Les mesures sont réalisées en cinétique toutes les 1min 30sec pendant 1h.

b) Système acellulaire mitochondries-réticulum endoplasmique

Le RE est isolé à partir d'homogénat de cerveau de souris par centrifugations différentielles à 4°C, 2000g 10 min, 12000g 10 min puis 100000g pendant 1h (Deniaud, Sharaf el dein et al. 2008). La concentration protéique est déterminée par le test BCA (Pierce). Le gonflement

matriciel et la dépolarisation mitochondriale sont déterminés comme précédemment avec les mitochondries (0,4 mg/mL) et le RE (0,6 mg/mL) en présence d'EGTA.

13) Etude *in vivo*

Les cellules SK28 et Lu1205 (4×10^6) sont injectées sur le flanc des souris nude.

Trois jours après la xéno greffe de cellules, les souris sont injectées en intra-péritonéal avec du polyéthylène glycol (PEG), 0.7 mg/kg de PBG, 1.4 mg/kg de PBG ou 2 mg/kg de PBG trois fois par semaine.

La taille des tumeurs est mesurée deux à trois fois par semaine. Les souris xéno greffées Lu1205 sont sacrifiées au bout d'environ 30 jours et les souris xéno greffées SK28 sont sacrifiées au bout de 60 jours.

Les tumeurs sont fixées en paraformaldéhyde 4% et incluses dans la paraffine.

Les plages de nécrose sont déterminées histologiquement et rapportées à la surface tumorale.

La densité vasculaire est basée sur le nombre de vaisseaux observés sur une surface tumorale de 10mm^2 .

Le nombre de mitoses est établi par la moyenne du nombre de mitoses observées dans dix champs de la tumeur au grossissement 400X.

L'index prolifératif est évalué par immunohistochimie avec l'anticorps anti-Ki67 (Dako).

14) Statistiques

A l'exception des résultats préliminaires, les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins trois expériences ($n > 3$). Ils sont présentés sous la forme suivante : moyenne \pm DS (déviation standard).

Chaque expérience de cytométrie est réalisée sur 5000 cellules (FDA, DiOC, Calcein, MitoSOX et H₂DFFDA) ou 10000 cellules (SubG1).

Les réponses des cellules aux traitements sont comparées à l'aide du test de Student et la significativité est indiquée par un astérisque)

Résultats

I- Etude du rôle de la nouvelle isoforme d'ANT dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique

Article 1 : The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells

Gallerne C*, Touat Z*, Chen Z X, Martel C, Mayola E, Sharaf el dein O, Buron N, Le Bras M, Jacotot E, Borgne-Sanchez A, Lemoine A, Lemaire C, Pervaiz S, Brenner C

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2010) 42, 623–629

Contexte de l'étude

La protéine ANT (Adenine nucleotide translocase) est la protéine majoritaire de la membrane interne mitochondriale. Elle est caractérisée par ces deux fonctions différentes : translocateur ADP/ATP (rôle vital) et la formation d'un pore qui conduit à la PMM au cours de l'apoptose (rôle létal). Il existe quatre isoformes d'ANT codés par quatre gènes différents (68 à 88% d'homologie). Les fonctions des protéines ANT1, 2 et 3 dans l'apoptose sont identifiées. ANT1 et 3 sont des isoformes pro-apoptotiques qui participent à la formation de pores létaux, en interaction avec des membres de la famille Bcl-2, suite à des stimuli apoptotiques. Ils favorisent le déclenchement de la voie mitochondriale de l'apoptose. L'isoforme 4 identifiée en 2005, n'avait pas de rôle connu dans la signalisation apoptotique. Pour déterminer son rôle, nous avons surexprimé ANT4 dans des lignées cellulaires cancéreuses et comparé son effet avec celui d'ANT3. La morphologie et les taux de prolifération des deux types de lignées ont d'abord été comparés avant de mesurer la respiration cellulaire et la production d'EAO (O_2^- et H_2O_2). Les effets d'ANT4 sur la voie mitochondriale de l'apoptose ont été observés en présence de deux molécules inductrices de la voie mitochondriale : staurosporine (inhibiteur de la PKC) et lonidamine (cible la mitochondrie).

Résultats et discussion

La coloration au bleu de Coomassie et les Western blots mettent en évidence que nos lignées stables HeLa surexpriment bien ANT dans la mitochondrie et la présence de l'étiquette V5 confirme la présence des vecteurs plasmidiques (voir Fig.1 A et B). Les cellules surexprimant ANT4 montrent, comme les cellules contrôles et contrairement aux ANT3, une forme de fuseau et un réseau mitochondrial tubulaire homogène dans le cytoplasme (voir Fig.1C). L'expression d'ANT4 n'induit aucune modification de la morphologie cellulaire ni du réseau mitochondrial. L'impact des isoformes sur la prolifération cellulaire n'était pas connu. Nos résultats montrent une diminution de la prolifération des cellules surexprimant ANT3 mais une augmentation pour les cellules ANT4 en comparaison avec le contrôle (voir Fig.1D). Cela suggère une activité biologique d'ANT4 opposée à celle d'ANT3.

ANT catalyse le transfert d'ADP et d'ATP entre la matrice et l'espace inter-membranaire. Nous avons testés les isoformes ANT3 et 4 pour leur impact sur la respiration mitochondriale en mesurant le taux d'oxygène consommé et les EAO produits. Nous montrons qu'il n'y a pas de différence significative dans la consommation d'oxygène des cellules contrôles, ANT3 et ANT4 (voir Fig.2 A et B). Les concentrations d'EAO diffèrent selon l'isoforme d'ANT surexprimée. Nos résultats montrent que les cellules ANT3 présentent légèrement moins d'EAO que les cellules contrôles (voir Fig. 2C). Les cellules surexprimant ANT4 présentent la même concentration d'O₂⁻ mitochondrial que le contrôle mais moins de H₂O₂ (voir Fig. 2C). Les isoformes ANT3 et 4 n'influent pas sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, les changements de concentration d'EAO n'impliquent pas les complexes I et III. Ces résultats laissent supposer un effet d'ANT3 et 4 sur les enzymes productrices d'EAO ou détoxifiantes.

Les actions antagonistes des ANT3 et 4 sur la morphologie mitochondriale et la prolifération cellulaire nous ont amené à questionner les effets d'ANT4 sur le déclenchement de l'apoptose mitochondriale. La fragmentation de l'ADN (caractéristique de l'apoptose) a été évaluée par le pourcentage de cellules hypoploïdes en cytométrie en flux suite aux traitements par staurosporine (Sts) et Ionidamine (LND). Les résultats obtenus pour les lignées HeLa ANT4 sont comparés aux lignées ANT1 et 3 (pro-apoptotiques) et à la lignée ANT2 (anti-apoptotiques). Les cellules surexprimant ANT4 diminuent l'apoptose de la même façon que les cellules surexprimant ANT2 (voir Fig.3A). Les paramètres mitochondriaux de chute du potentiel transmembranaire (sonde DiOC6 (3)) et de perméabilisation de la membrane interne (marquage calcein et cobalt) ont été évalués par cytométrie en flux. Les résultats montrent un

effet inhibiteur d'ANT4 sur les événements mitochondriaux, à l'opposé de l'effet d'ANT3 (voir Fig.3 B et C). Ces effets ont été confirmés par des expériences dans des cellules de carcinomes du colon HT29 surexprimant les isoformes d'ANT.

La caspase 9 étant la caspase initiatrice de la voie mitochondriale, son activation a été déterminée dans les cellules ANT4 en comparaison avec les cellules contrôle et ANT3. En accord avec les données précédentes, les Western blots montrent que le traitement par LND des cellules surexprimant ANT4 n'induit pas l'activation de la caspase 9 (voir Fig.4A). Cependant le traitement par Sts de ces mêmes cellules mène au clivage de la caspase 9 (voir Fig.4A). Ce résultat pourrait être expliqué par une perméabilisation des membranes externes qui laisse sortir le cytochrome *c* mais n'est pas visible par le test de perméabilisation des membranes internes (marquage calcein et cobalt). En effet, l'inhibition par ANT4 de la chute du potentiel mitochondriale entraînée par Sts est moins forte que dans le cas du traitement LND (voir Fig.3B). Pour compléter cette hypothèse il faut supposer un clivage de la pro-caspase 9 non associé à l'apoptosome qui ne donne pas une caspase 9 active.

Pour s'assurer que l'effet anti-apoptotique mis en évidence dans les lignées ANT4 n'est pas dû à l'augmentation de l'expression d'une autre protéine anti-apoptotique, nous avons évalué le taux de Bcl-2 dans nos lignées. La lignée contrôle montre un niveau élevé de Bcl-2 qui est fortement réduit dans les cellules ANT3 (28% du contrôle) et modérément réduit dans les cellules ANT4 (57% du contrôle) (voir Fig.4B). La diminution de l'expression de Bcl-2 peut expliquer l'effet pro-apoptotique observé dans les lignées ANT3 mais ne peut être responsable de l'effet anti-apoptotique observé dans les lignées ANT4. Les effets mis en évidence semblent bien être la conséquence de la surexpression d'ANT4.

Cet article constitue la première démonstration de l'inhibition de la signalisation apoptotique induite par la surexpression de l'isoforme ANT4. Ce résultat renforce l'implication des isoformes d'ANT dans les signalisations apoptotiques et la division des ANT en deux membres pro-apoptotiques (ANT1 et 3) et deux membres anti-apoptotiques (ANT2 et 4).

II- Sensibilisation à la mort cellulaire par deux nouvelles molécules dans un modèle de cancer particulièrement résistant : le mélanome

Contexte de l'étude

Les cancers de la peau touchent 2 à 3 millions de personnes dans le monde chaque année et le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter. Parmi ces cancers, le mélanome est le moins fréquent, mais il représente la majorité des décès par cancer de la peau. Il constitue ainsi un problème de santé public dans les pays d'Europe, d'Amérique du Nord et en Australie. L'agressivité caractéristique du mélanome est due à sa résistance vis-à-vis des traitements actuellement disponibles et à sa capacité à métastaser rapidement. La seule méthode efficace pour lutter contre le mélanome est son excision chirurgicale précoce. Il est donc indispensable d'identifier de nouvelles approches thérapeutiques pour éliminer les cellules de mélanome. La difficulté repose dans la possibilité d'induire la mort cellulaire de cellules qui ont développé de nombreux mécanismes de résistance. Il est donc nécessaire de tester des molécules capables de cibler des processus ou des protéines impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques. Plusieurs molécules sont actuellement en essai préclinique et clinique pour le traitement du mélanome. Parmi ces molécules, les inhibiteurs de B-Raf suscitent beaucoup d'espoir car ils sont capables d'inhiber l'activité de kinases mutées dans plus de 60% des tumeurs de mélanomes. Ces nouveaux agents thérapeutiques devront être associés pour garantir leur efficacité contre le mélanome et éviter l'émergence d'une nouvelle chimiorésistance. Dans le but d'un traitement combinatoire il faut donc découvrir de nouvelles molécules efficaces contre les mélanomes.

Nous avons testé l'effet de quatre molécules sur des lignées de mélanomes humains et nous proposons les molécules Withaférine A (WFA) et Plumbagine (PBG) comme prometteuses pour contribuer à la thérapie du mélanome. Ces deux molécules ont comme point commun d'être les constituants principaux de plantes médicinales. Les premières études faisant état de leur effet anticancéreux et de leur potentiel contre le mélanome datent de la fin des années 90 au début des années 2000. Une équipe indienne a montré que WFA et PBG sont capables de sensibiliser le mélanome murin à la radiothérapie. Depuis 2004 de nombreuses études se sont succédées et ont démontré leurs effets anticancéreux dans divers modèles de cancer *in vitro* et *in vivo*. Leur action passe le plus souvent par l'induction de l'apoptose et/ou l'inhibition de la migration cellulaire. WFA et PBG agissent principalement par l'inhibition de voies de survie (NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt) qui jouent un rôle dans le développement mais surtout dans la résistance des mélanomes. Sont également décrites des actions pro-

apoptotiques par la production d'EAO, l'induction d'un stress du RE ou la diminution de l'expression de protéines pro-apoptotiques.

Dans cette étude, qui se décompose en deux projets (chacun reposant sur une molécule), nous avons testé la capacité de WFA et PBG à diminuer la viabilité de quatre lignées cellulaires de mélanome. Après avoir démontré le type de mort cellulaire mis en jeu, nous avons étudiés les mécanismes cellulaires déclenchés par ces molécules et conduisant à la mort des mélanomes.

Article 2 : Withaferin A induces apoptosis in human melanoma cells through generation of reactive oxygen species and down-regulation of Bcl-2

Mayola E, Gallerne C, Pervaiz S, Larue L, Debuire B, Lemoine A, Brenner C and Lemaire C

Apoptosis (article en révision)

Contexte

Il y a récemment eu un regain d'intérêt pour les composés naturels dans la recherche de molécules anticancéreuses. La molécule WFA a démontré un effet antitumoral dans divers modèles de cancer. Elle présente des propriétés anti-angiogéniques et inhibe la migration cellulaire. Ces caractéristiques sont intéressantes pour le traitement d'un cancer avec comme caractéristique principale la capacité à métastaser rapidement. L'autre caractéristique principale du mélanome, la résistance, peut être contrecarrée par l'inhibition des voies de survie NF- κ B, MAPK et PI3K/Akt démontrée comme une propriété de WFA. WFA a également l'avantage de pouvoir déclencher un stress du RE par l'augmentation de l'expression de CHOP, l'inhibition de Hsp90 ainsi que l'inhibition du protéasome. La majorité des études montre que l'action de WFA passe par une induction de l'apoptose. Dans deux de ces études, la génération d'EAO est responsable du déclenchement de l'apoptose.

Nous nous sommes d'abord demandés si WFA était capable d'induire la mortalité des cellules de mélanome et si l'apoptose était impliquée comme c'est le cas dans les modèles de cancer testés. Nous nous sommes ensuite intéressés aux évènements cellulaires induits par WFA dans les mélanomes en se concentrant sur la voie mitochondriale et les membres de la famille Bcl-2.

Résultats et discussion

WFA diminue la viabilité des quatre lignées de mélanome de façon dose dépendante (voir Fig.1B). Des comptages cellulaires réalisés en fonction de la morphologie des noyaux et de la perméabilisation des membranes plasmiques montrent que WFA induit de l'apoptose dans les quatre lignées (voir Fig.1C). Les caractéristiques propres à l'apoptose : contraction du cytoplasme, condensation et fragmentation de l'ADN ont été approfondies sur la lignée cellulaire Mel501 (voir Fig.1D à L).

La mitochondrie est impliquée dans les effets de WFA par l'étude de la chute du potentiel transmembranaire (sonde DiOC6(3)) et de la perméabilisation de la membrane interne de la mitochondrie (marquage calceïne et cobalt). Le déclenchement d'une chute du potentiel dose et temps dépendante (voir Fig.2A et B) et d'une PMM (voir Fig.2C) nous suggère que la mitochondrie pourrait être une cible de WFA dans ce modèle. Cependant l'ajout de WFA sur des mitochondries isolées de foie de souris n'induit ni gonflement matriciel ni dépolarisation. Il semble donc que la mitochondrie ne soit pas une cible directe de WFA (voir Fig.2D à G).

La PMM peut être expliquée par la formation du PTP et/ou l'implication de pores Bax/Bak. L'assemblage du PTP peut être inhibé par la molécule cyclosporine A (CsA). Nous avons testé son effet sur le traitement WFA.

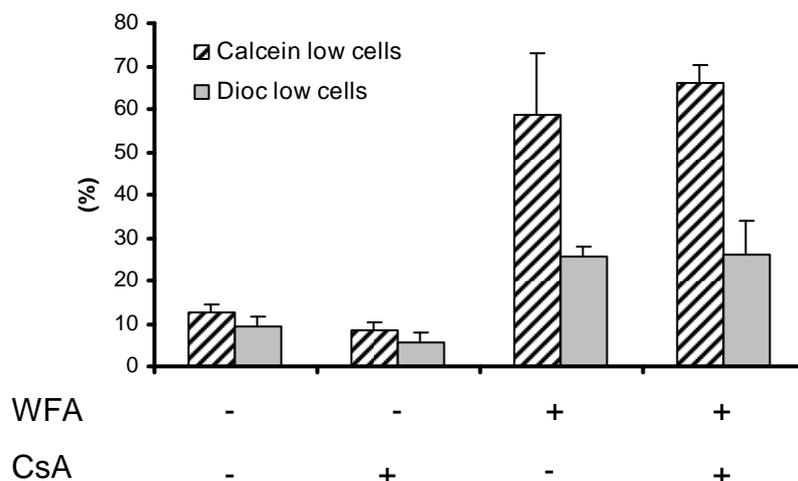


Figure supplémentaire 1 : Effet de Csa sur le traitement WFA

Les paramètres de PMM et de chute du potentiel transmembranaire mitochondrial déclenchés par WFA ont été évalués, par cytométrie en flux, dans la lignée Mel501.

Le pré-traitement des cellules Mel501 par la Csa n'inhibe pas les évènements mitochondriaux déclenchés par WFA (Fig. suppl. 1). Il semblerait donc que l'ouverture du PTP ne soit pas impliquée dans l'action de WFA. Nous avons évalué l'implication de Bax dans les évènements mitochondriaux induits par WFA dans un autre modèle. Nous disposons de la lignée cancéreuse du colon HCT116 invalidée pour Bax sur laquelle nous avons testé l'effet de WFA.

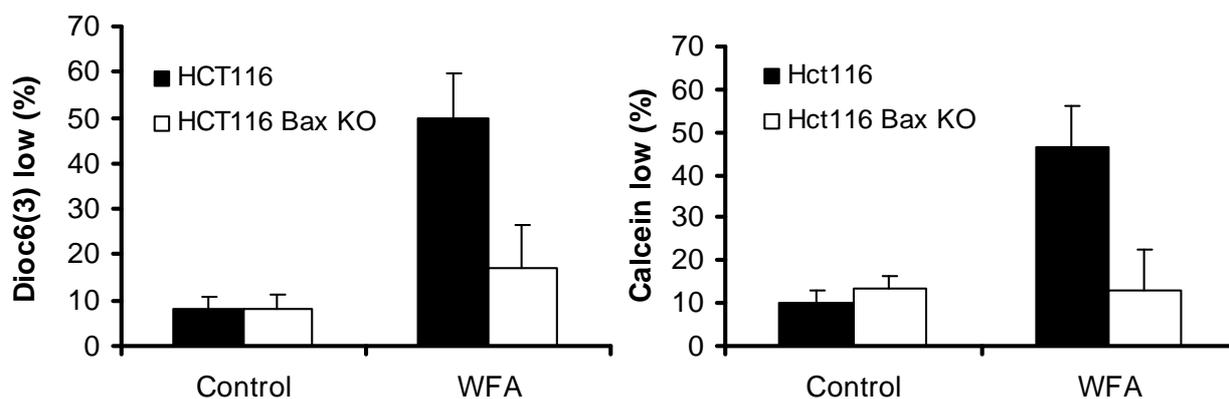


Figure supplémentaire 2 : Implication de Bax dans la voie mitochondriale induite par WFA

Des cellules HCT116 normales et invalidées pour Bax (Bax KO) sont traitées par WFA et les paramètres de chute du potentiel (marquage Dioc) et de PMM (marquage calcéine et cobalt) sont réalisés.

Dans la lignée invalidée pour Bax, les événements mitochondriaux sont peu ou pas déclenchés par WFA (Fig. suppl. 2). Dans ce modèle, Bax semble indispensable à la PMM et à la chute du potentiel déclenchées par WFA.

La voie mitochondriale de l'apoptose, suite à la PMM, conduit au relargage du *cyt c* qui va permettre l'activation de la caspase 9 puis des caspases exécutrices. Nous avons donc regardé si WFA était capable d'induire une perméabilisation totale des membranes mitochondriale avec relargage de *cyt c* suivie de l'activation des caspases. Les photos d'immunofluorescence montrent le relargage du *cyt c* (voir Fig.3A) et les Western blots mettent en évidence le clivage et donc l'activation des caspases 9 et 3 (voir Fig.3B). L'utilisation de l'inhibiteur global des caspases (z-VAD) qui diminue l'apoptose déclenchée par WFA montre qu'il s'agit d'une apoptose caspases-dépendante (voir Fig.3C). Nous avons également inhibé l'activité des caspases 3, 6, 7, 8 ou 9 à l'aide de vecteurs codant des formes dominant négatif des caspases.

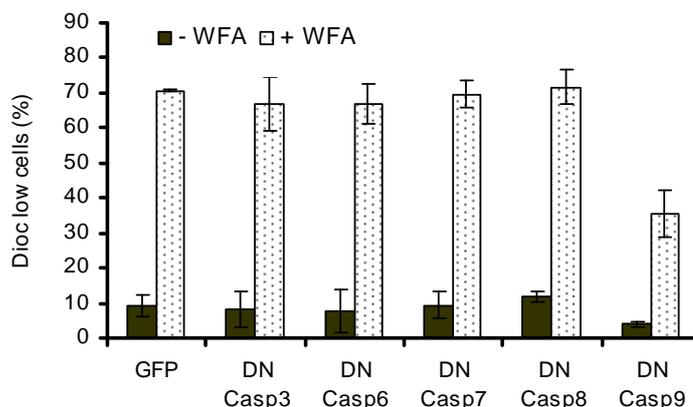


Figure supplémentaire 3 : Inhibition de l'activité des caspases

Les vecteurs dominant négatifs (DN) des caspases ont été transitoirement co-transfectés avec la GFP dans la lignée Mel501. Nous avons évalué la chute du potentiel (marquage CMX-Ros) dans la population GFP positives.

Les cellules transfectées par le vecteur DN de la caspase 9 montrent une diminution de la mortalité (Fig. suppl. 3) qui nous mène à conclure au rôle central de la caspase 9 dans l'apoptose induite par WFA. Cependant le marquage utilisé ici montre la chute de potentiel, c'est-à-dire un évènement en amont de la voie des caspases. L'effet du DN caspase 9 pourrait être du à l'existence d'une boucle d'amplification par laquelle des cibles des caspases sensibiliserait la mitochondrie. On note que l'inhibition de la caspase 3 n'a pas d'effet. Cependant, on peut penser que les effets des trois caspases exécutrices 3, 6 et 7 se compensent et qu'il faudrait inactiver les trois en même temps pour observer une inhibition de la mortalité des cellules.

Les EAO sont impliqués dans le processus apoptotique et plus particulièrement dans l'action de WFA dans deux études précédentes. Nous avons évalué le rôle des EAO dans l'action de WFA sur nos cellules de mélanome. WFA induit la production d' $O_2^{\cdot-}$ (marquage MitosoxRed) et de H_2O_2 (marquage H_2DFFDA) dans les quatre lignées (voir Fig.4). L'utilisation de l'antioxydant N-actylcystéine (NAC) permet une inhibition totale des EAO générés par le traitement WFA (voir Fig.4). Les évènements mitochondriaux ainsi que la fragmentation de l'ADN induits par WFA sont également inhibés par NAC (voir Fig.5A et B). Les EAO induits par WFA semblent donc jouer un rôle en amont de la mitochondrie et déclencher la voie mitochondriale de l'apoptose. On observe cependant que tous les antioxydants ne produisent pas les mêmes effets que la NAC. La molécule Tempol est un antioxydant dont l'action exacte n'est pas encore élucidée. Tempol mimerait une SOD en dégradant l' $O_2^{\cdot-}$ ou bien serait capable de piéger $O_2^{\cdot-}$. Cette molécule est connue pour diminuer $O_2^{\cdot-}$ et les peroxy-nitrites.

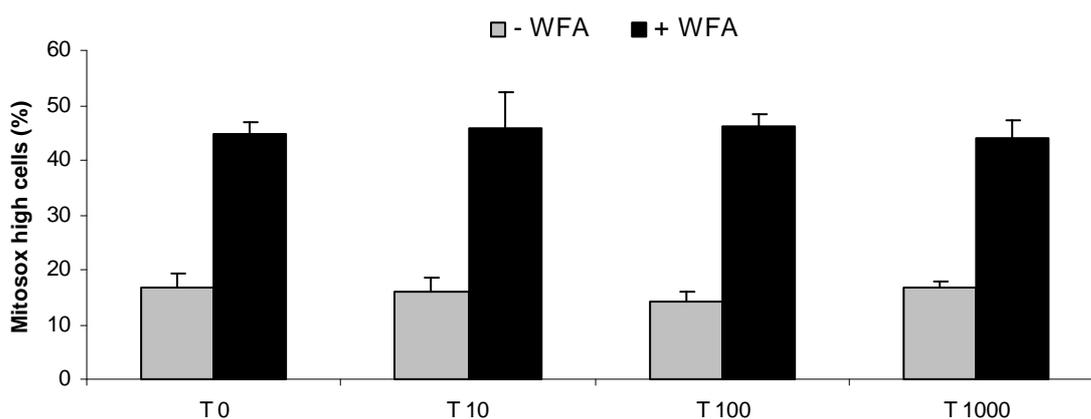


Figure supplémentaire 4 : Effet de l'antioxydant Tempol

Les cellules Mel501 ont été pré-traitées avec 0, 10, 100 ou 1000 μM de Tempol (T) puis traitées avec WFA. L'effet de Tempol a été observé sur la production d' $O_2^{\cdot-}$ (marquage MitosoxRed).

L'antioxydant Tempol, aux doses testées, n'a aucune efficacité sur la production d' $O_2^{\cdot-}$ induite par WFA (Fig. suppl. 4). Nous avons également utilisé l'antioxydant DPI (diphényl iodonium) qui est inhibiteur spécifique des complexes NOXs. Il inhibe donc spécifiquement la formation d' $O_2^{\cdot-}$.

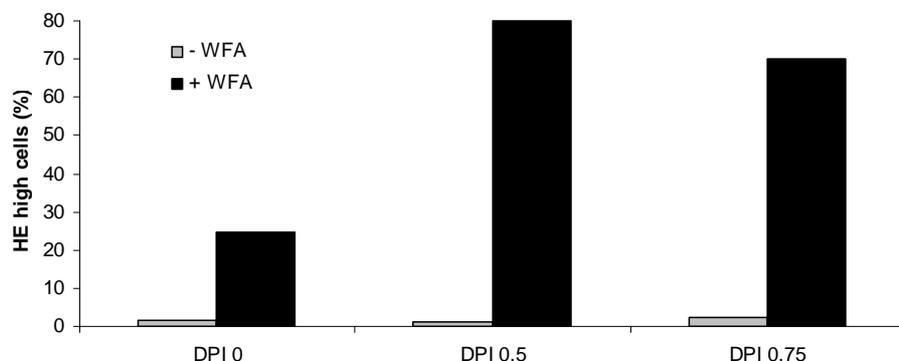


Figure supplémentaire 5 : Effet de l'inhibiteur des NOXs, DPI

Les cellules Mel501 ont été pré-traitées par DPI à 0,5 et 0,75μM puis traitées par WFA. La production d' $O_2^{\cdot-}$ a été mesurée à l'aide de la sonde HE qui permet un marquage de tous les $O_2^{\cdot-}$ cytoplasmiques.

Dans notre modèle, non seulement DPI n'inhibe pas les $O_2^{\cdot-}$ induits mais il les augmente considérablement (Fig. suppl. 5). Les effets incohérents produits par ces deux antioxydants inhibiteurs des $O_2^{\cdot-}$ nécessiteraient une étude plus approfondie des systèmes producteurs et détoxifiants des $O_2^{\cdot-}$ présents dans notre modèle et de l'action de WFA sur ces systèmes.

Nous nous sommes intéressés aux H_2O_2 et nous avons testé l'effet de la catalase, enzyme qui détoxifie les H_2O_2 .

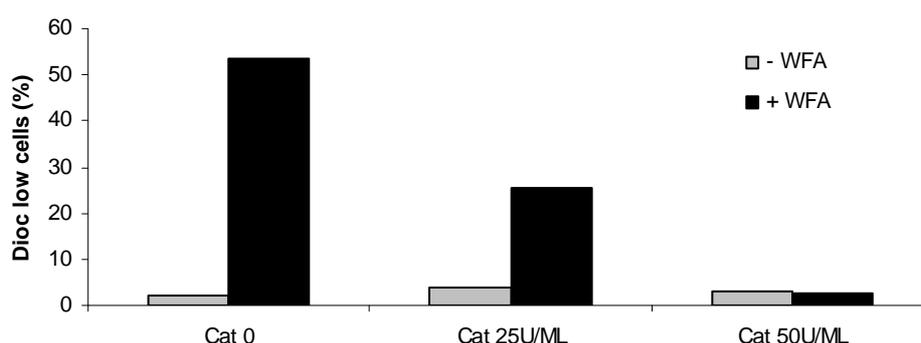


Figure supplémentaire 6 : Effet de la catalase sur le traitement WFA

Les cellules M14 ont été pré-traitées avec de la catalase à 25 ou 50 unités/mL avant d'être traitées par WFA.

Cette expérience montre un effet de la catalase pour inhiber la mort induite par WFA (Fig. suppl. 6). Il faut noter ici que l'on regarde comme paramètre la chute du potentiel

mitochondriale (marquage Dioc). L'effet observé avec l'antioxydant NAC pourrait être du à sa capacité à inhiber les H_2O_2 et non $l'O_2^{\cdot-}$.

Les lignées de mélanomes ne montrent pas la même sensibilité à l'action de WFA. Les lignées Mel501 et SK28 semblent moins sensibles (voir Fig.1B et Fig.2A). La chimiorésistance des cellules cancéreuses pouvant être expliquées par l'efflux des molécules à travers les transporteurs ABC (aussi appelés MDR pour multi-drug resistance). Nous avons ainsi testé l'effet de l'inhibiteur de ces pompes : LY335979 (Zosuquidar) sur ces deux lignées.

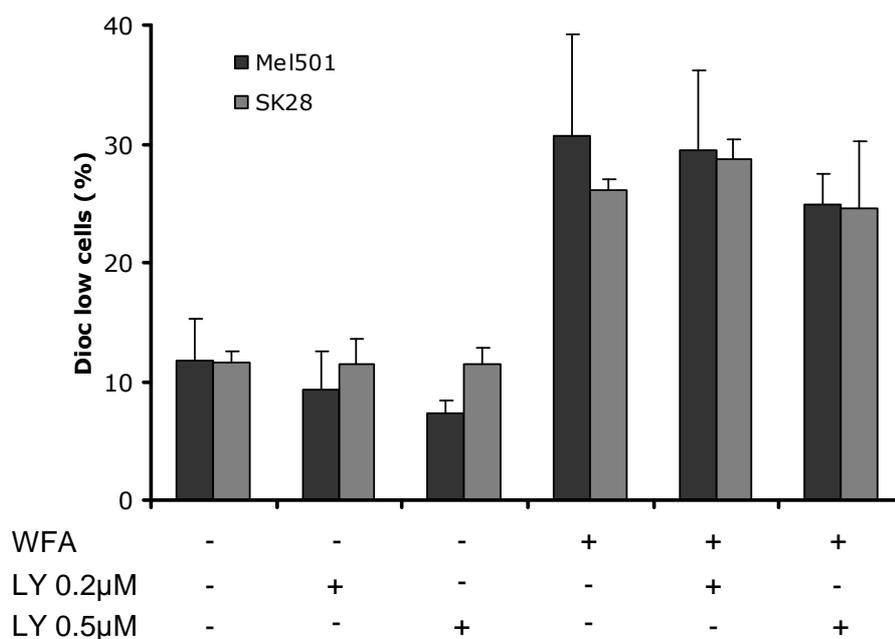


Figure supplémentaire 7 : Effet de l'inhibiteur des pompes MDR

Les cellules Mel501 et SK28 ont été pré-traitées par deux doses de LY335979 (LY), 0.2 et 0.5 µM avant un traitement par WFA.

Le pré-traitement des cellules Mel501 et SK28 par LY335979 ne semble pas influencer sur l'action de WFA (Fig. suppl. 7). Les pompes MDR ne semblent pas être impliquées dans la différence de sensibilité des cellules de mélanomes au traitement WFA.

Les membres de la famille Bcl-2 sont impliqués dans la chimiorésistance des mélanomes. Nous avons voulu évaluer leur niveau d'expression pour le corrélérer à une plus ou moins forte sensibilité à la WFA. Les taux de protéines de la famille Bcl-2 varie entre chaque lignée mais les lignées les moins sensibles à WFA (Mel501 et SK28) présente beaucoup plus de Bcl-2 et légèrement moins de Bax comme le montre le ratio Bcl-2/Bax (voir Fig.6A à F). Cependant, la surexpression de Bcl-2, puissant inhibiteur de la PMM, dans la lignée qui exprime le plus de Bcl-2 endogène n'inhibe que partiellement l'effet de WFA (voir Fig.6G). Nous avons testé WFA dans un autre modèle de cellule présentant un taux élevé de Bcl-2 : HeLa Bcl-2.

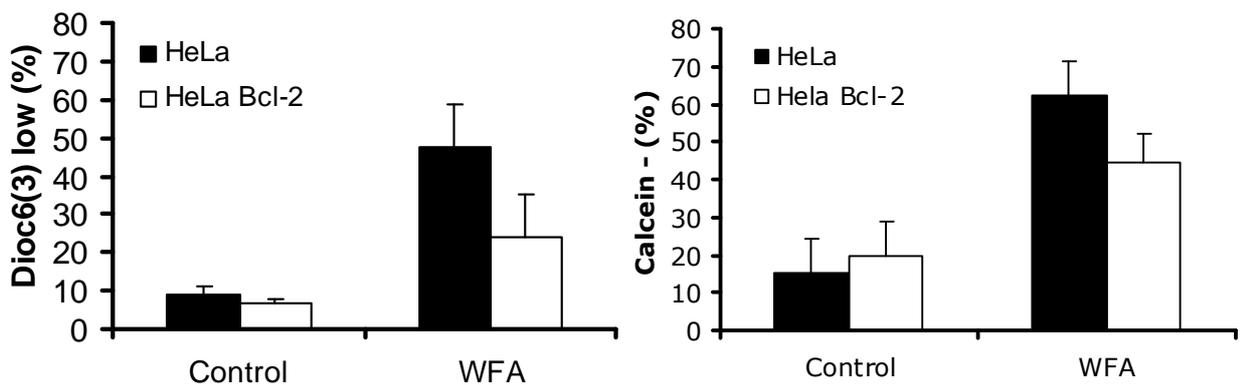


Figure supplémentaire 8 : Effet d'un niveau élevé de Bcl-2 sur l'action de WFA

Les cellules HeLa et HeLa surexprimant Bcl-2 (HeLa Bcl-2) ont été traitées par WFA et les évènements mitochondriaux (chute du potentiel et PMM) ont été mesurés.

Les cellules HeLa Bcl-2 constituent un autre modèle pour observer l'effet de Bcl-2 sur un traitement par WFA. Dans ce modèle, on observe que la surexpression de Bcl-2 inhibe à moitié les évènements mitochondriaux étudiés (Fig. suppl. 8). Comme nous l'avons vu avec la surexpression de Bcl-2 dans les Mel501, l'action de WFA n'est pas supprimée par Bcl-2. Cela semble être dû au fait que WFA est capable d'inhiber l'expression de Bcl-2 (voir Fig.6H). Cet effet intéressant de WFA expliquerait en partie sa capacité à sensibiliser les cellules de mélanome à l'apoptose. Cependant WFA n'a pas un effet inhibiteur sur toutes les protéines anti-apoptotiques impliquées dans la résistance des mélanomes. Nous avons étudié son action sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dont l'expression a été corrélée avec la progression des mélanomes.

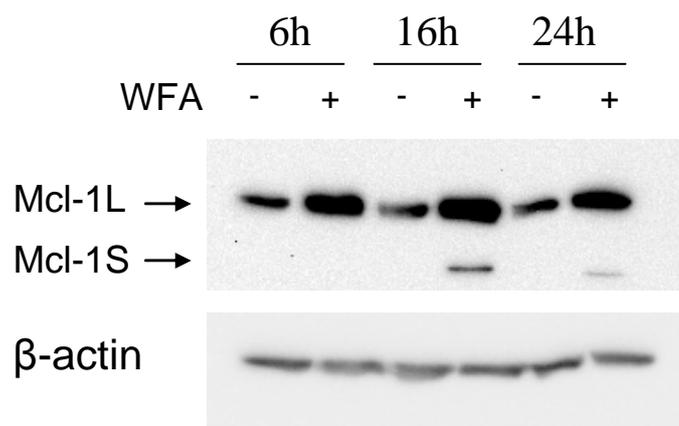


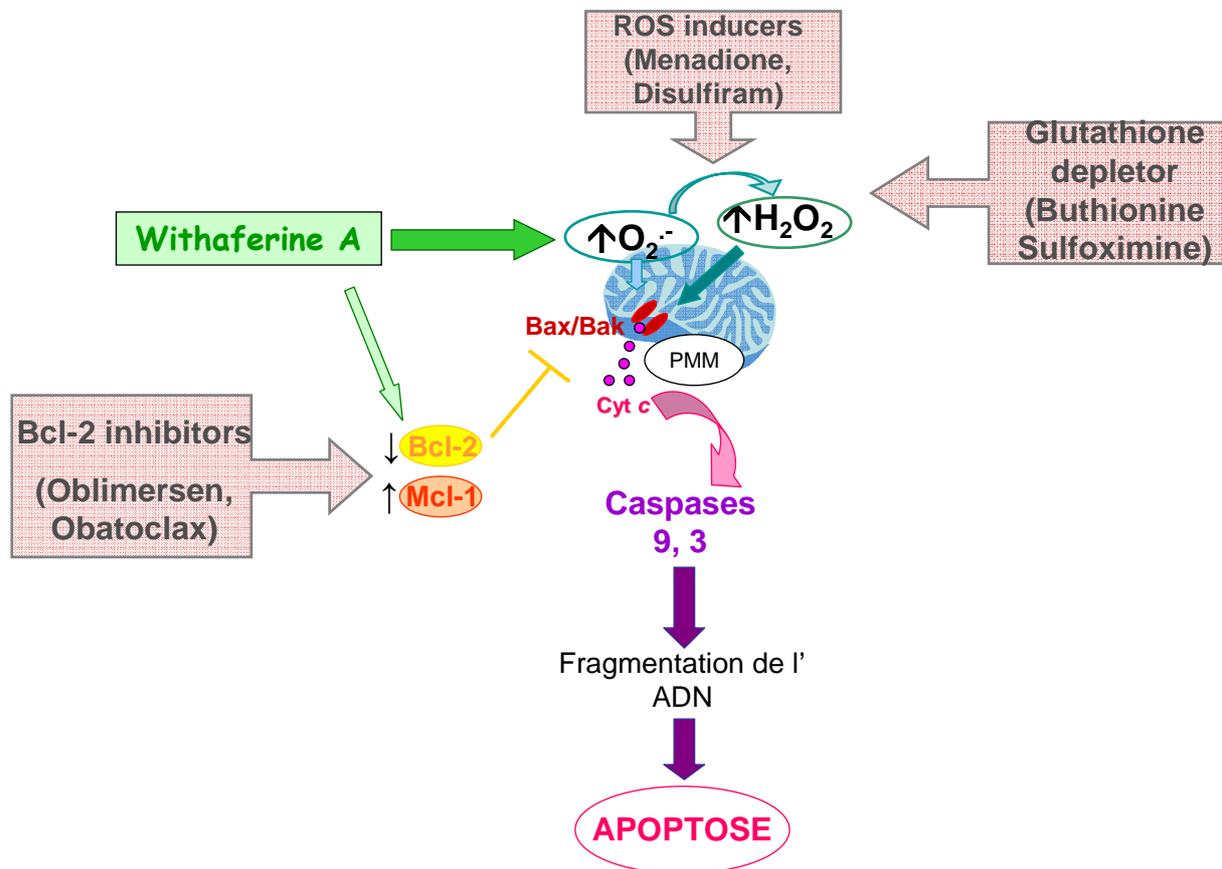
Figure supplémentaire 9 : Effet de WFA sur le taux d'expression de Mcl-1

Le niveau d'expression de Mcl-1 a été mesuré sur des extraits protéiques de cellules M14 traitées par WFA en cinétique (temps 6, 16 et 24h).

WFA semble avoir un effet important et précoce sur l'expression de Mcl-1. On observe une augmentation de la forme anti-apoptotique Mcl-1L et l'apparition de la petite forme pro-

apoptotique Mcl-1S au temps 16h (Fig. suppl. 9). Cette forte augmentation de Mcl-1 semble contradictoire avec l'effet pro-apoptotique produit par WFA. Il semblerait que, soit l'expression de la forme Mcl-1S est suffisante pour induire l'apoptose, soit la protéine Mcl-1L mesurée n'est pas fonctionnelle (phosphorylée, ubiquitinylée).

WFA semble avoir deux effets pour induire l'apoptose mitochondriale dans les mélanomes (voir schéma suivant). (1) WFA est un agent pro-oxydant. Il agit par la production d'EAO qui va déclencher la PMM et la chute de potentiel transmembranaire mitochondrial. (2) WFA est un inhibiteur de Bcl-2. Il induit une diminution modérée de l'expression de Bcl-2 qui permet de sensibiliser les cellules de mélanomes à l'apoptose. Les effets de WFA pourraient être améliorés par son association avec d'autres molécules comme des inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, d'autres pro-oxydants et l'inhibiteur de GSH (voir schéma).



Modèle de l'action de WFA sur les cellules de mélanome

Article 3 : Plumbagin est capable d'induire la mort des cellules de mélanome par apoptose ou par nécrose suite à la production d'EAO et au déclenchement de la voie mitochondriale

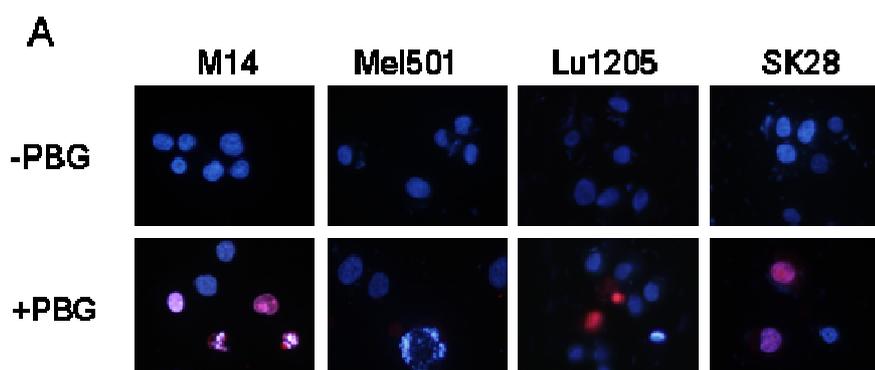
En préparation

Contexte

La molécule PBG montre, comme WFA, des propriétés intéressantes pour la sensibilisation des mélanomes à la mort cellulaire. Il est capable de cibler directement la voie de survie NF- κ B et d'inhiber indirectement la voie PI3K/Akt. Sa capacité à induire la production d'EAO est clairement impliquée dans son effet pro-apoptotique. De plus PBG inhibe des protéines anti-apoptotiques responsables de la résistance des mélanomes comme Bcl-2, Bcl-x_L et certaines IAPs. Il semble également capable d'inhiber la migration cellulaire et l'angiogénèse. Une étude publiée en 2008 démontre la capacité de PBG à induire l'apoptose des mélanomes *in vitro* et à diminuer la croissance tumorale *in vivo*. Nous avons commencé notre étude avant cette publication dans le but de déterminer l'effet de PBG sur des cellules de mélanomes. Notre étude sur quatre lignées, contre une seulement pour les travaux publiés, montre que les signalisations induites par un traitement PBG peuvent diverger selon les lignées et conduire à différents types de mort cellulaire.

Résultats et discussion

Nous avons commencé par évaluer la capacité de PBG à induire la mort cellulaire dans nos quatre lignées de mélanome. Pour ce faire, nous avons marqué les noyaux des cellules avec le marqueur perméant Hoechst, qui nous permet d'étudier la morphologie nucléaire, associé au marqueur non perméant Iodure de Propidium (IP) qui permet de repérer la perméabilisation de la membrane plasmique (Fig.1A).



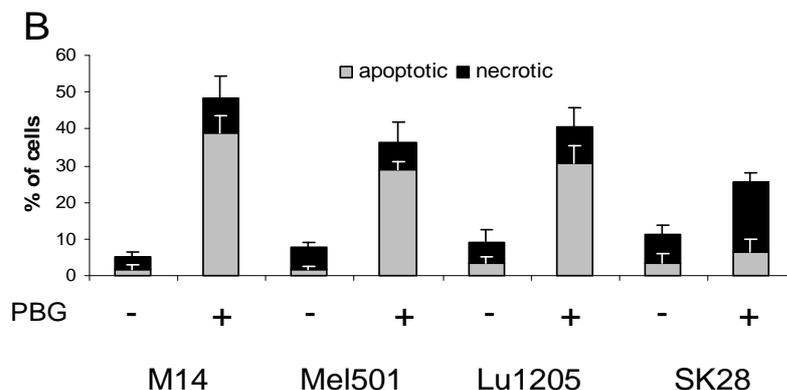
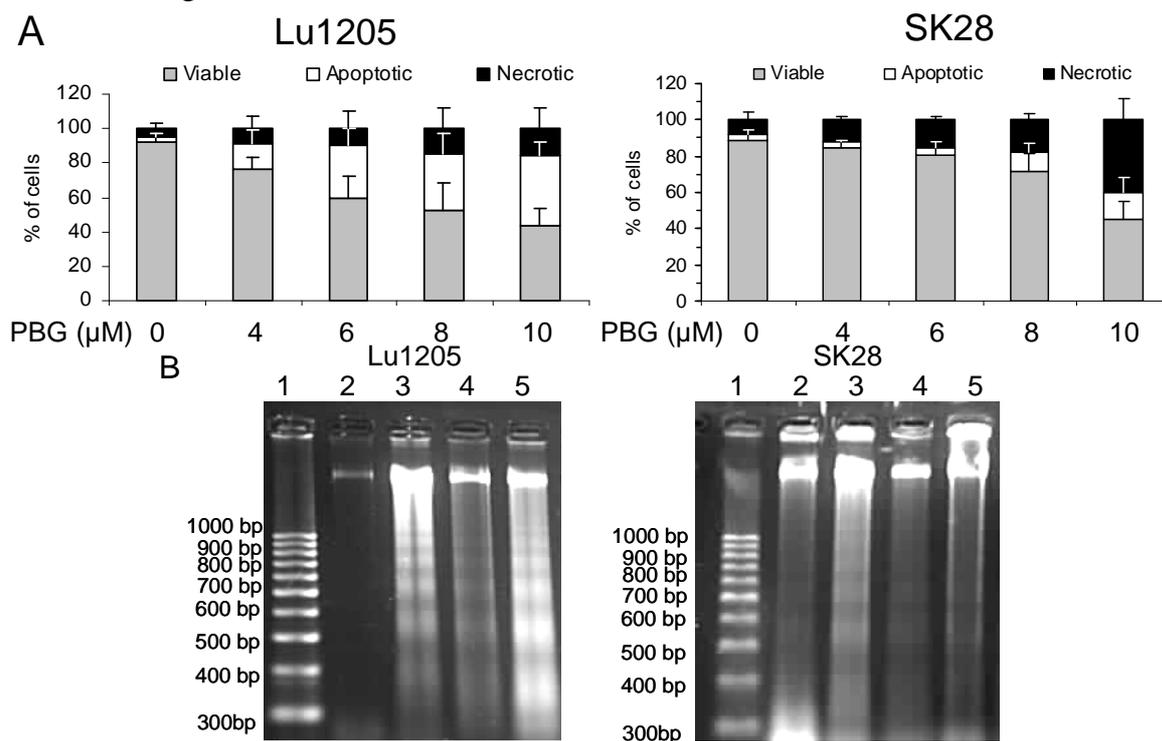


Figure 1 : PBG induit la mort des cellules de mélanomes par apoptose ou par nécrose. Les quatre lignées de mélanome ont subi un double marquage Hoechst (bleu)/iodure de propidium (IP, rouge). (A) Pour déterminer l'apoptose selon la morphologie des noyaux et la nécrose selon la morphologie et la perméabilisation des membranes (marquage IP). Les cellules ont été quantifiées par comptage (B) à partir de l'observation en microscopie.

Ces premiers résultats mettent en évidence des noyaux condensés ou fragmentés pour les lignées M14, Mel501 et Lu1205 mais pas pour la lignée SK28 (Fig.1A). On observe des noyaux nécrotiques (ronds comme ceux des cellules contrôles mais marqués en rouge par l'IP) dans les lignées M14 et Lu1205 (Fig.1A). On note une coloration rouge de certains noyaux condensés (lignée Lu1205) qui reflète une perméabilisation précoce de la membrane plasmique des cellules apoptotiques. La quantification de l'apoptose et de la nécrose représentée sur la figure 1B, montre que PBG induit majoritairement de l'apoptose dans les lignées M14, Mel501 et Lu1205 et de la nécrose dans la lignée SK28.

Nous avons ensuite étudié plus en détail les caractéristiques apoptotiques et nécrotiques pour confirmer nos premières observations. Pour cela nous avons utilisé une lignée apoptotique Lu1205 et la lignée SK28.



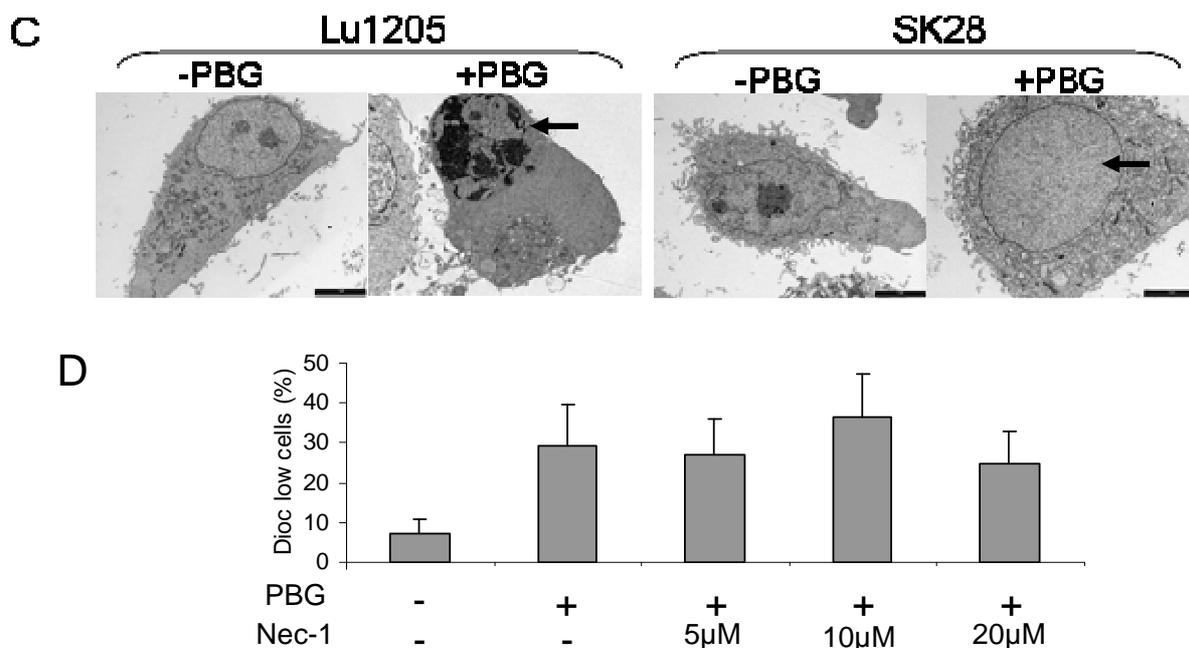


Figure 2 : Caractérisation de l'apoptose et de la nécrose induites par PBG

(A) Les lignées Lu1205 et SK28 ont été double marquées par Hoechst/PI et la quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques a été rapportée en fonction de la dose de PBG. (B) L'ADN génomique des cellules sans traitement (2), traitées par un inducteur d'apoptose l'étoposide (3), une dose nécrotique d'H₂O₂ (4) et PBG (5) a été extrait, précipité et migré sur gel d'agarose à côté d'un marqueur de taille (1). (C) Les images de microscopie électronique montrent la morphologie des cellules Lu1205 et SK28 +/-PBG. (D) Les cellules SK28 sont pré-traitées avec différentes doses de Necrostatine-1 (Nec-1) l'inhibiteur de la nécroptose.

La nécrose peut être observée lorsqu'un traitement est trop concentré. Ce n'est pas le cas ici comme le montre l'effet dose de PBG avec quantification des cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques (Fig.2A). PBG induit une apoptose dose dépendante dans les Lu1205 et une nécrose dose dépendante dans les SK28. La fragmentation de l'ADN est mise en évidence par migration de l'ADN génomique extrait des cellules et ayant subi deux étapes de lyse et de précipitation (Fig.2B). Le traitement par PBG (ligne 5) induit un clivage internucléosomal dans la lignée Lu1205 et non dans la lignée SK28. Le traitement par étoposide est un contrôle positif d'apoptose (ligne 3) et le traitement par 1mM de H₂O₂ un contrôle positif de nécrose (ligne 4). L'apoptose et la nécrose sont confirmées par microscopie électronique (Fig.2C). Dans la lignée Lu1205, le traitement par PBG induit la condensation du noyau (flèche noir) tandis que dans la lignée SK28 on observe un noyau (flèche noir) et un cytoplasme gonflés. Nos résultats prouvent clairement que PBG peut induire soit de l'apoptose (Lu1205), soit de la nécrose (SK28). Pour savoir si la nécrose induite par PBG est de la nécroptose, nous avons testé l'inhibiteur de nécroptose, Nécrostatine-1 (Nec-1) (Fig.2D). Nous avons testé trois concentrations de Nec-1 qui ne semblent pas inhiber l'effet de PBG. La mort nécrotique induite par PBG dans la lignée SK28 ne serait pas de la nécroptose.

Après avoir caractérisé les types de mort cellulaire induite par PBG nous avons cherché à identifier les mécanismes cellulaires communs. Nous nous sommes intéressés à la voie mitochondriale qui peut être impliquée dans ces deux types de mort.

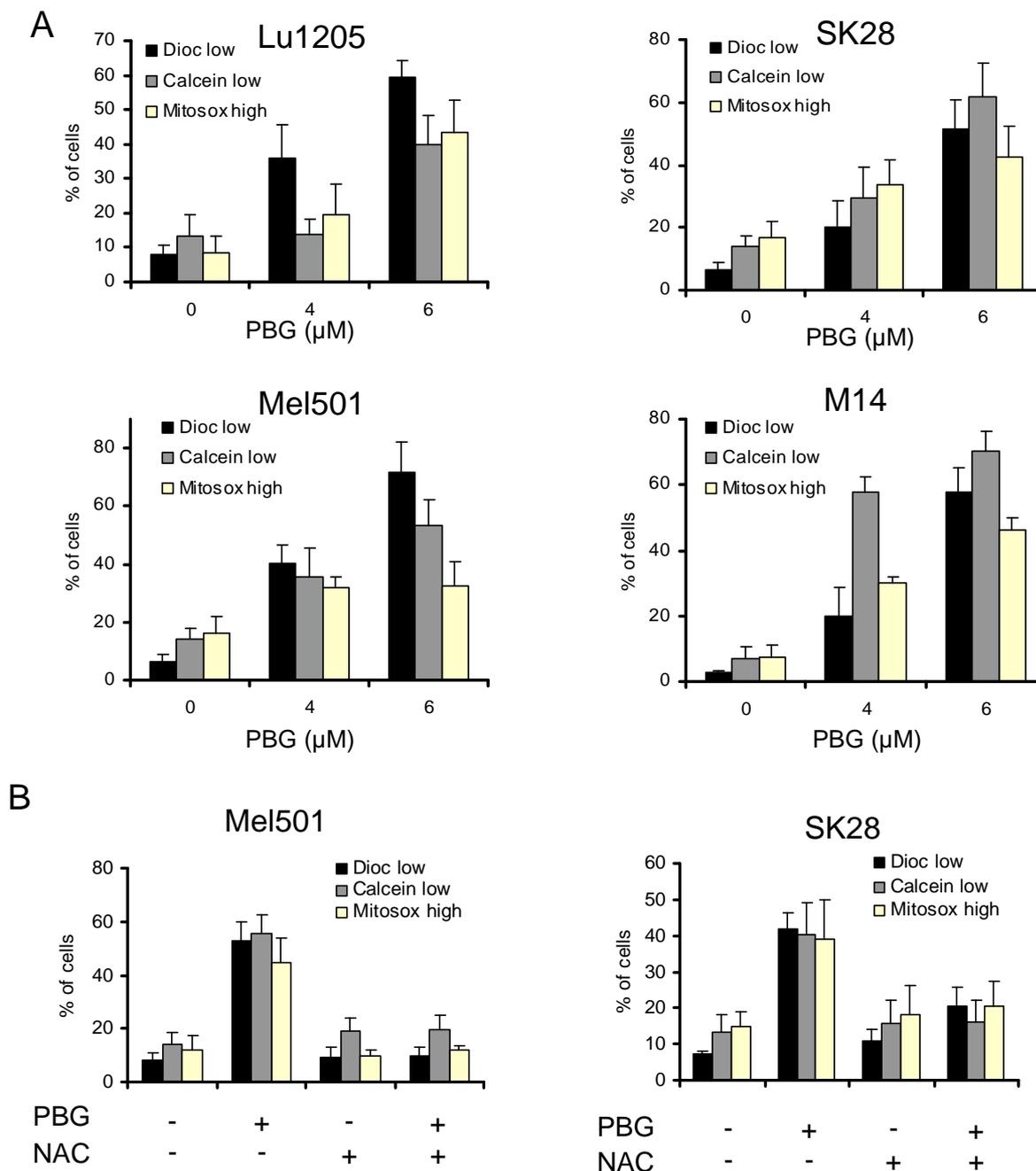


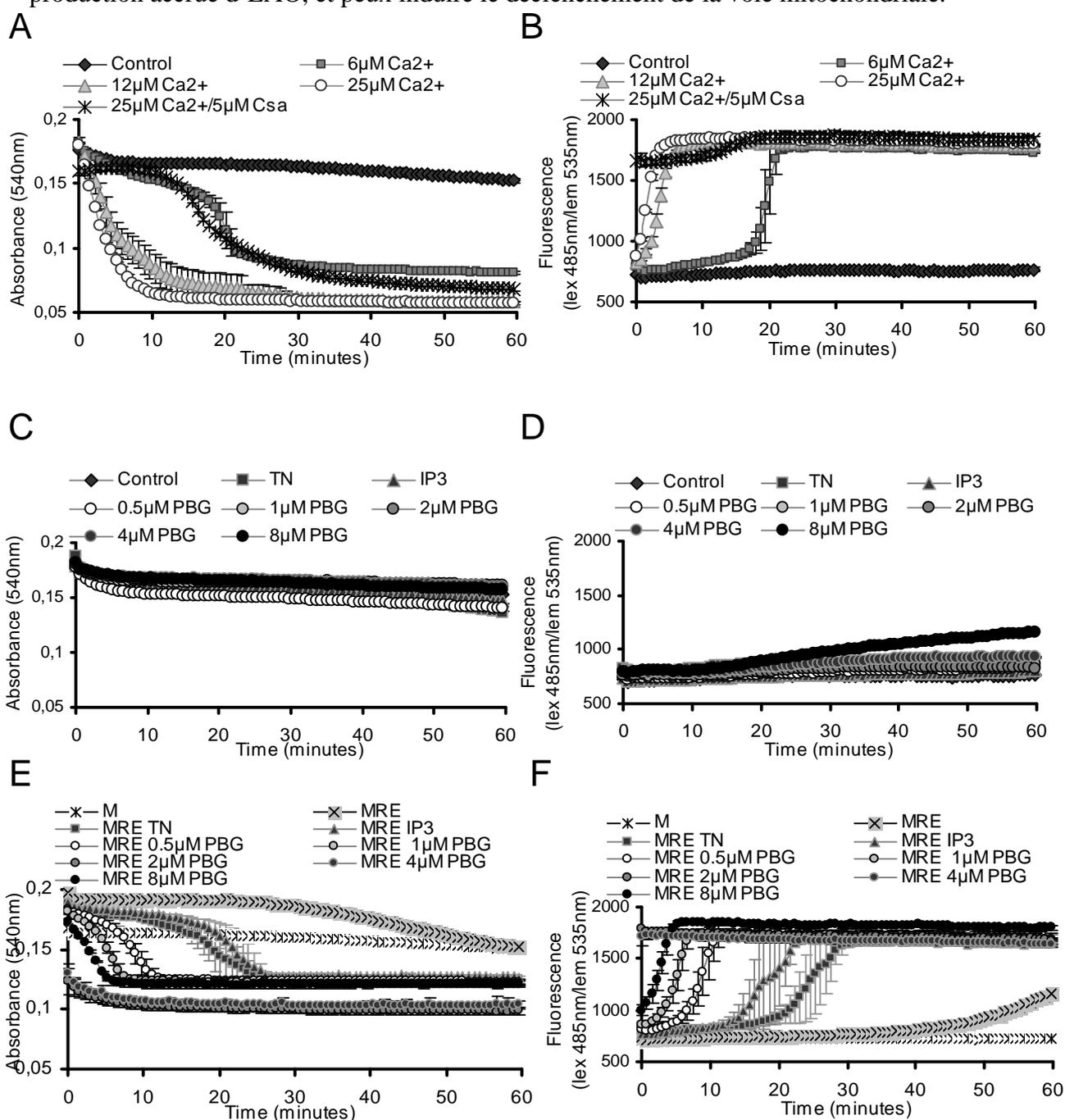
Figure 3 : PBG déclenche la voie mitochondriale médiée par la production d'EAO

Mesure des événements mitochondriaux dans les quatre lignées de mélanome. (A) PBG induit une chute du potentiel transmembranaire (sonde DiOC6(3)), une perméabilisation de la membrane interne (marquage calceine et cobalt) et une production d'O₂⁻ mitochondrial (sonde MitosoxRed) dose dépendante. (B) Effet du pré-traitement de cellules apoptotiques (Mel501) et nécrotiques (SK28) par l'antioxydant NAC sur les événements mitochondriaux déclenchés par PBG.

Nous nous sommes intéressés à la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (sonde DiOC6(3)), à la perméabilisation de la membrane interne mitochondriale (marquage calceine et cobalt) ainsi qu'à la production d'O₂⁻ mitochondrial (sonde MitosoxRed). Ces trois

évènements mitochondriaux sont induits par un traitement PBG des quatre lignées de mélanome (Fig.3A). Les EAO sont impliqués dans la mort apoptotique et nécrotique et de précédentes études ont montré un rôle des EAO dans l'action de PBG. Nous avons testé l'importance du rôle des EAO dans notre modèle en utilisant l'antioxydant NAC dans une lignée apoptotique (Mel501) et dans la lignée nécrotique (SK28). Dans les deux types de cellules le pré-traitement par NAC inhibe totalement les évènements mitochondriaux (Fig.3B). Les EAO sont nécessaires à l'activation de la voie mitochondriale par PBG dans les quatre lignées testées.

Nous avons voulu déterminer si la mitochondrie était une cible directe de la PBG. Le cas échéant nous voulons tester le rôle du RE qui est sensible aux stress, comme par exemple une production accrue d'EAO, et peut induire le déclenchement de la voie mitochondriale.



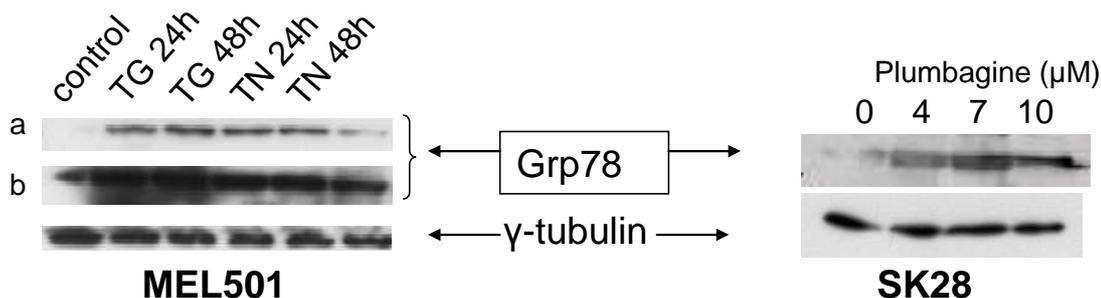


Figure 4 : Le RE mais pas la mitochondrie est une cible directe de PBG

Des mitochondries isolées de foie de souris sont testées pour leur fonctionnalité en leur appliquant une dose-réponse de calcium qui provoque un gonflement matriciel (A) et une dépolarisation des membranes mitochondriales (B). Plusieurs doses de PBG sont ensuite testées sur les mitochondries isolées (C et D) ainsi que de la tunicamycin (TN) et de l'inositol triphosphate (IP3). Les mêmes produits sont testés sur mitochondries en présence de RE isolé de cerveau de souris (E et F). M : mitochondries seules, MRE : mitochondries et RE. (G) Expression de la chaperone résidente du RE impliquée dans la réponse au stress RE : Grp78 dans les Mel501 et SK28 (Il y a une faible (a) et une forte (b) exposition pour les Mel501). TG : thapsigargine, TN : tunicamycine.

Nous avons isolé des mitochondries de foie de souris. Pour tester leur fonctionnalité nous leur appliquons une gamme de trois doses de calcium (inducteur de la PMM) et vérifions la capacité de la cyclosporine A (Csa) à inhiber le gonflement matriciel et la dépolarisation induits (Fig.4A et B). Nous testons ensuite plusieurs doses de PBG (de 0,5 à 8μM) pour leur effet sur mitochondries isolées. La TN et l'IP3 sont des inducteurs du relargage de calcium par le RE. Comme attendu TN et IP3 n'ont aucun effet sur les mitochondries isolées (Fig.4C et D). Il en va de même de toutes les doses de PBG testées (Fig.4C et D). Finalement nous mesurons les mêmes paramètres sur les mitochondries isolées en présence de RE isolé de cerveau de souris (Fig.4 E et F). Les mitochondries seules et les mitochondries avec du RE sans inducteur servent de contrôle négatif. Les traitements TN et IP3 sur mitochondries et RE sont des contrôles positifs. Les doses de PBG testées, en présence de mitochondries et de RE, provoquent cette fois gonflement matriciel et dépolarisation même à la dose de 0,5μM. On note que toutes les doses de PBG agissent plus rapidement que les inducteurs classiques (TN et IP3). Il semblerait donc que PBG agisse sur le RE en amont de la mitochondrie. Nous avons donc testé le niveau d'expression de la chaperone Grp78. Grp78, chaperone résidente du RE, voit son expression augmenter lors d'un stress du RE. Dans deux lignées (une apoptotique et la nécrotique), on observe une augmentation de l'expression de Grp78 après traitement par PBG (voir Fig.4G). Les traitements TN et TG servent de contrôle positif de l'induction d'un stress du RE. Dans le cas de l'induction de l'apoptose et de la nécrose, PBG serait capable d'induire un stress RE, peut-être du à un excès d'EAO, qui conduirait à l'activation de la voie intrinsèque.

Nous avons ensuite observé des évènements post-mitochondriaux pour identifier l'étape de divergence entre apoptose et nécrose. La voie mitochondriale aboutit dans de nombreux cas à l'activation des caspases, protéases spécifiquement impliquées dans l'exécution de l'apoptose. Nous nous sommes demandé si PBG induisait l'activation des caspases dans les lignées apoptotiques et ce qu'il en était de la lignée SK28.

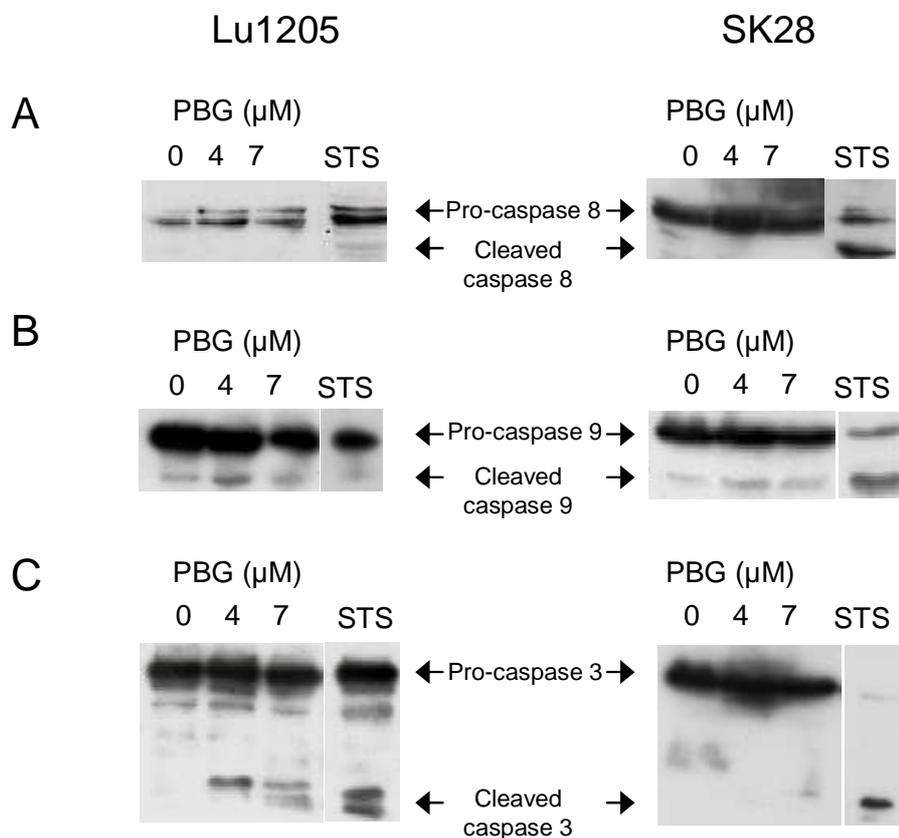


Figure 5 : L'apoptose et la nécrose induites par PBG divergent au niveau des caspases

Le traitement par staurosporine (STS) sert de contrôle positif de clivage des caspases. (A) PBG n'induit pas le clivage de la caspase 8. (B) PBG induit le clivage de la caspase 9 dans les lignées Lu1205 et SK28. (C) Le clivage de la caspase 3 suite au traitement PBG se produit uniquement dans la lignée Lu1205.

La caspase 8, caspase initiatrice de la voie extrinsèque, n'est pas activée par clivage suite au traitement par PBG dans une lignée apoptotique (Lu1205) et la lignée nécrotique (SK28) (voir Fig.5A). Pour la caspase 9, caspase initiatrice de la voie intrinsèque, on observe un léger clivage en l'absence de traitement qui peut être dû à une dégradation lors du traitement des échantillons. On observe cependant une augmentation de l'activation de la caspase 9 suite au traitement par PBG dans les deux lignées (voir Fig.5B). L'activation de la caspase exécutive 3 par clivage n'est observée que dans la lignée Lu1205 (voir Fig.5C) ce qui est cohérent avec un déclenchement de l'apoptose. Dans la lignée SK28, on n'observe pas de clivage de la caspase 3 suite au traitement par PBG, contrairement au traitement par STS. De plus, on a

observé un clivage de la caspase 9. On en conclut qu'il ne s'agit pas ici d'un manque d'ATP suffisant pour empêcher l'activation des caspases et induire la nécrose. Une autre possibilité serait que l'apoptosome ne se forme pas. L'inhibition spécifique du clivage de la caspase 3 pourrait faire intervenir une IAP ou une inactivation due à une forte concentration d' H_2O_2 (connu pour inhiber l'activation de certaines caspases).

Dans des cellules de mélanome, PBG semble déclencher la production d'EAO, ce induirait un stress du RE qui à son tour active la voie mitochondriale de l'apoptose dans la majorité des lignées avec activation des caspases (voir schéma suivant). En aval de la mitochondrie, PBG est également capable de diverger vers une mort nécrotique (voir schéma suivant).

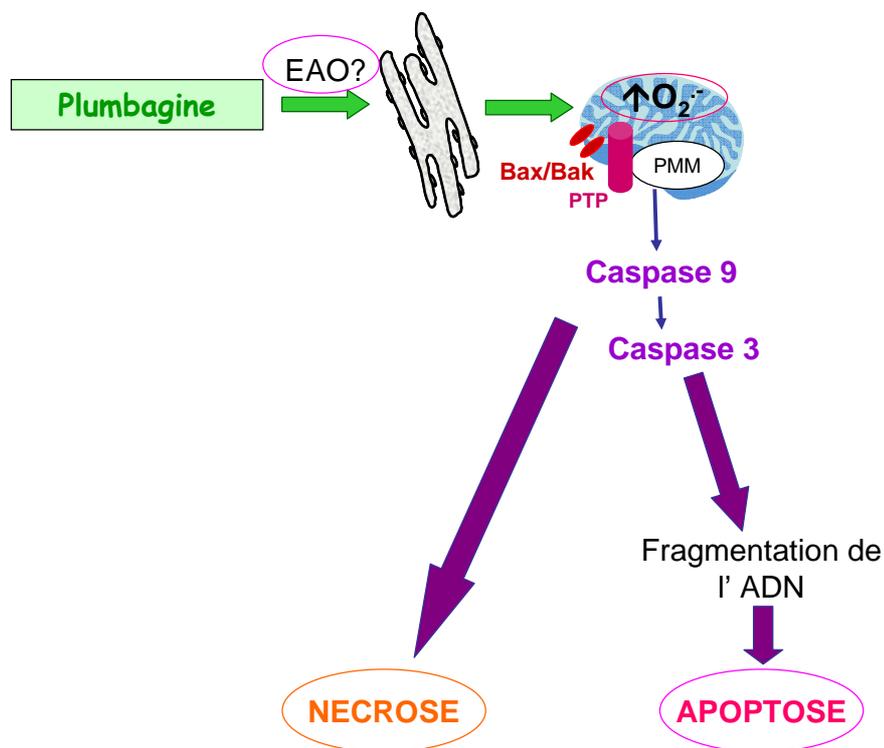


Schéma 1 : Conclusion de l'action de PBG sur les cellules de mélanome

L'étude de l'effet de PBG sur les cellules de mélanome nous a amené à questionner son effet *in vivo*. Nous nous sommes demandés si PBG serait capable d'induire de la nécrose et de l'apoptose comme dans le modèle *in vitro* et si l'induction de la nécrose serait plus efficace que l'apoptose pour faire régresser les tumeurs de mélanome. Nous avons mis au point une étude pilote de PBG sur souris (Collaboration avec l'équipe du Dr Lionel Larue, Institut Curie, Orsay).

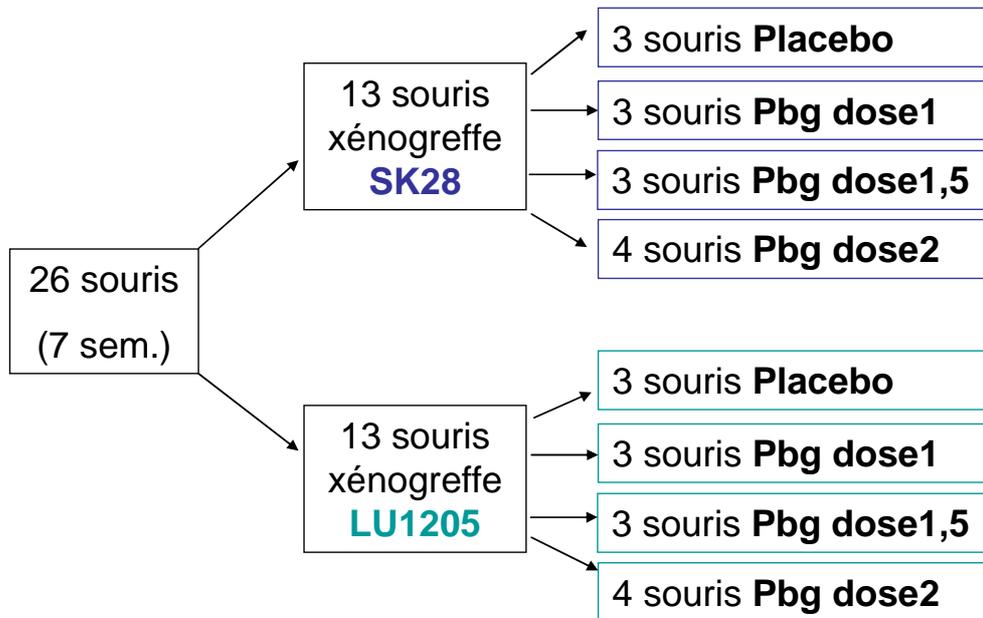
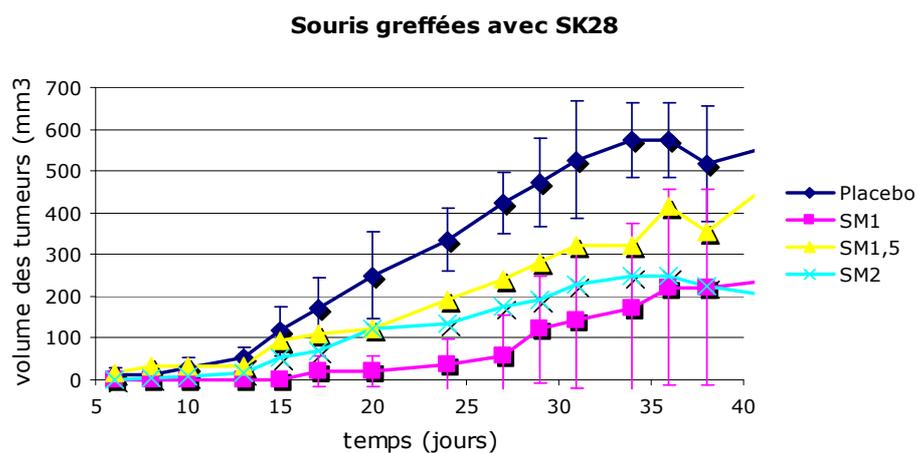


Schéma 2 : Protocole expérimental de l'étude de PBG *in vivo*

La moitié des souris est greffée avec des cellules SK28 et l'autre moitié avec des cellules Lu1205. Chaque groupe est divisé en 4 sous-groupes : Placébo (trois souris), faible dose 1 (trois souris), une dose intermédiaire 1,5 (trois souris) et forte dose 2 (quatre souris).

Les souris ont été greffées avec des cellules de mélanomes SK28 ou Lu1205 en sous-cutané au niveau du flanc. Trois jours après, les injections ont commencé avec du polyéthylène glycol (PEG) seul pour le groupe Placébo, 0.7 mg/kg pour le groupe SM1, 1.4 mg/kg pour le groupe SM1,5 et 2 mg/kg pour le groupe SM2. L'évaluation régulière de la taille des tumeurs a permis de connaître l'effet de PBG sur la régression tumorale. L'étude histologique des tumeurs prélevées sur les souris permet de définir plus précisément le rôle de PBG *in vivo*.



Souris greffées avec LU1205

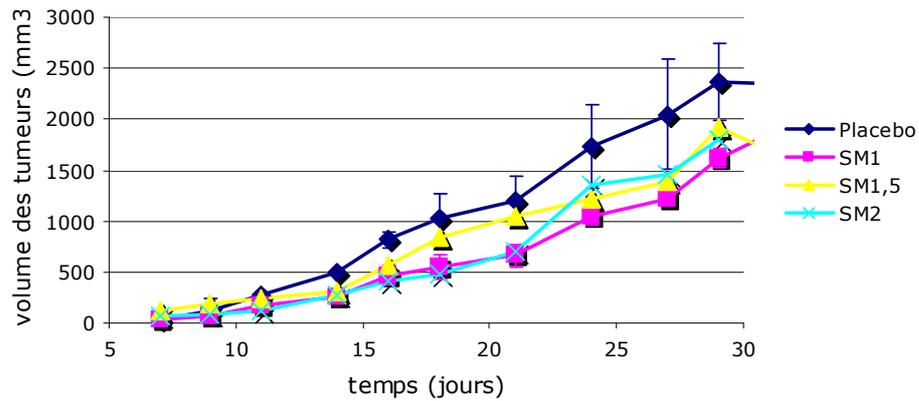
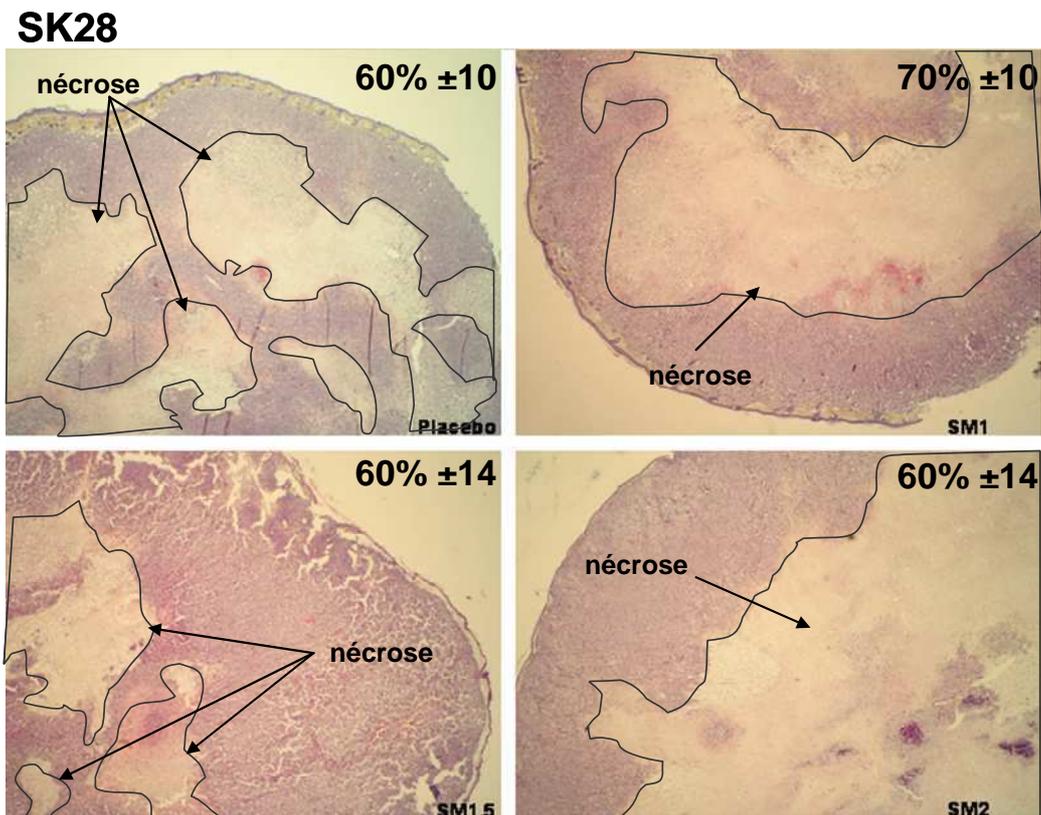


Figure 6 : Progression du volume tumoral

Le volume des tumeurs a été évalué au cours de l'expérience. On voit en bleu la moyenne de progression pour le groupe Placébo, en rose pour la faible dose, en jaune pour la dose intermédiaire et en turquoise pour la faible dose.

Le nombre réduit d'animaux ne permet pas une étude statistique. On n'observe peu de variations dans les effets de PBG selon la dose (voir Fig.6). La faible dose semble même plus efficace. PBG semble ralentir la croissance tumorale des cellules de mélanome.

Les études de d'immunohistochimie (IHC) pour marquer la caspase 3 activée n'ont pas abouti en ce qui concerne l'évaluation de l'apoptose. L'histologie révèle la présence de nécrose dans toutes les tumeurs (SK8 et Lu1205).



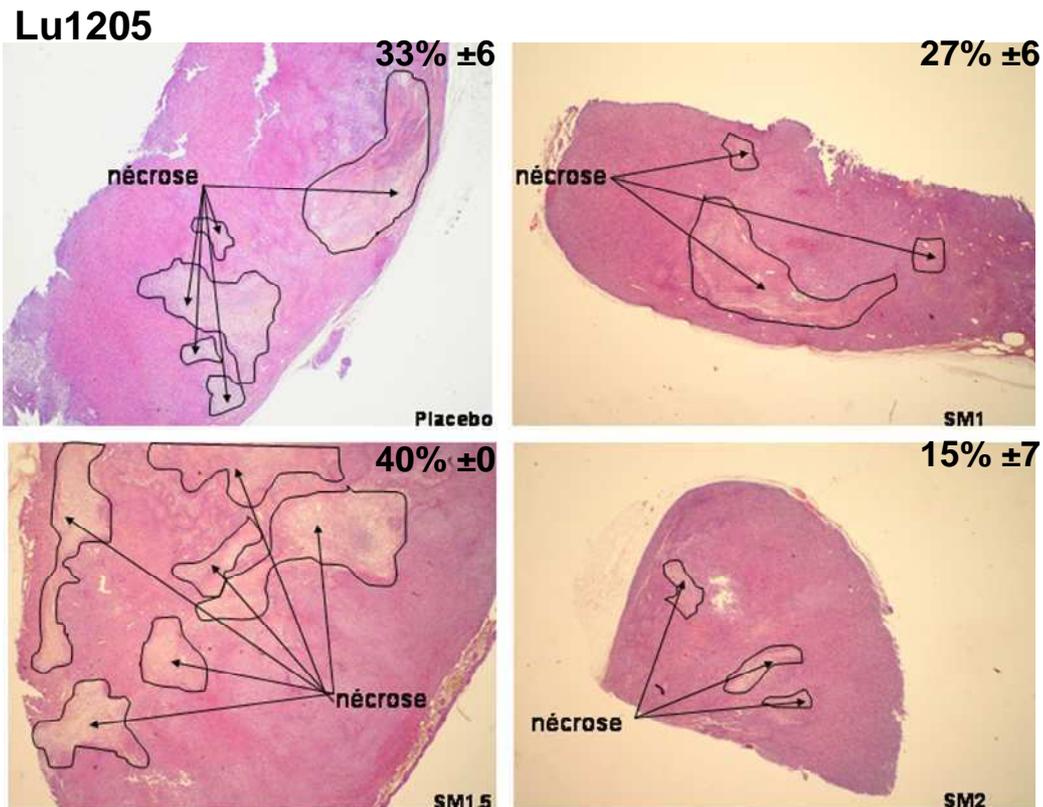
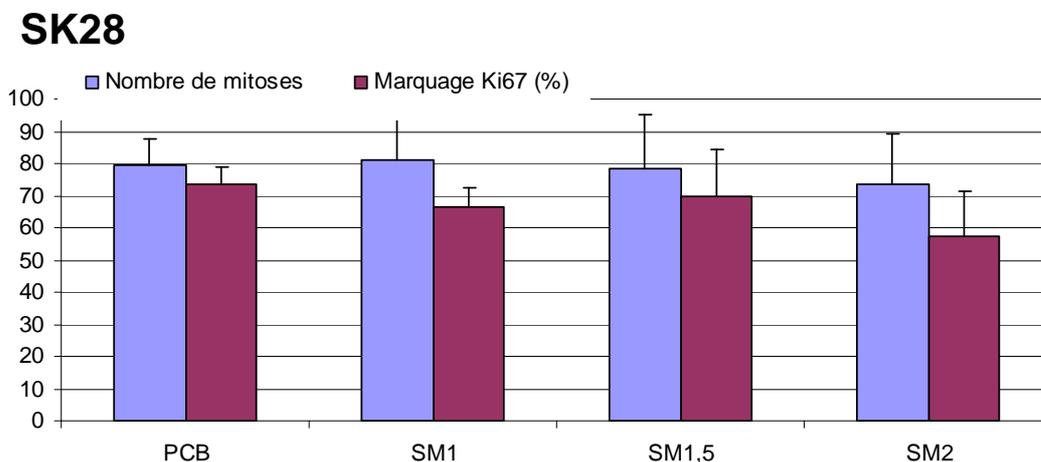


Figure 7 : Evaluation des plages de nécrose dans les tumeurs

La proportion de plages de nécrose des tumeurs SK28 et Lu1205 a été évaluée pour les tumeurs du groupe Placébo, de la faible dose (SM1), de la dose intermédiaire (SM1,5) et de la forte dose (SM2).

Des plages de nécrose sont présentes dans les tumeurs SK28 et Lu1205 Placébo et traitées avec PBG (voir Fig.7). Dans les tumeurs des placébos, on observe deux fois plus de nécrose dans les SK28 par rapport aux Lu1205. Il semble que dans les tumeurs Lu1205, PBG diminue la proportion de nécrose tandis qu'elle reste très élevée dans les tumeurs SK28. L'effet de PBG sur l'induction de la nécrose *in vitro* ne semble pas reproductible *in vivo*.

L'effet de PBG sur la prolifération des tumeurs a été mesuré par le comptage des cellules en mitoses et l'utilisation en IHC de Ki67 (marqueur des cellules cyclantes).



Lu1205

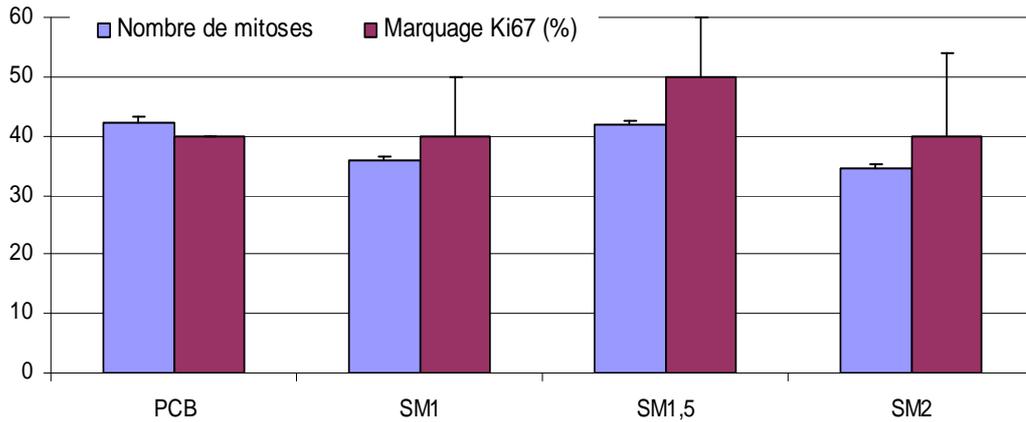


Figure 8 : Mesure de la prolifération des cellules tumorales

Le comptage du nombre de cellules en mitose ainsi que la quantification du marquage Ki67 ont été évalués dans les tumeurs SK28 et Lu1205. PCB : Placébo, SM1 : dose faible de PBG, SM1,5 : dose intermédiaire de PBG, SM2 : dose forte de PBG. Comptages effectués sur 3 à 4 tumeurs par groupe.

En l'absence de traitement, il y a une plus forte prolifération dans les tumeurs générées par les cellules SK28 par rapport aux Lu1205. On observe une tendance à la diminution de la prolifération (mitoses et Ki67) suite au traitement par PBG des tumeurs SK28 (voir Fig.8). Pour les tumeurs Lu1205, on observe une tendance à la diminution du nombre de mitose entre le placebo et la forte dose (voir Fig.8). Le marqueur Ki67 ne montre pas d'amélioration de la prolifération après traitement par PBG, la dose intermédiaire semble même augmenter la prolifération.

Nous avons déterminé l'effet de PBG sur l'angiogenèse par comptage des vaisseaux au sein des tumeurs SK28 et Lu1205.

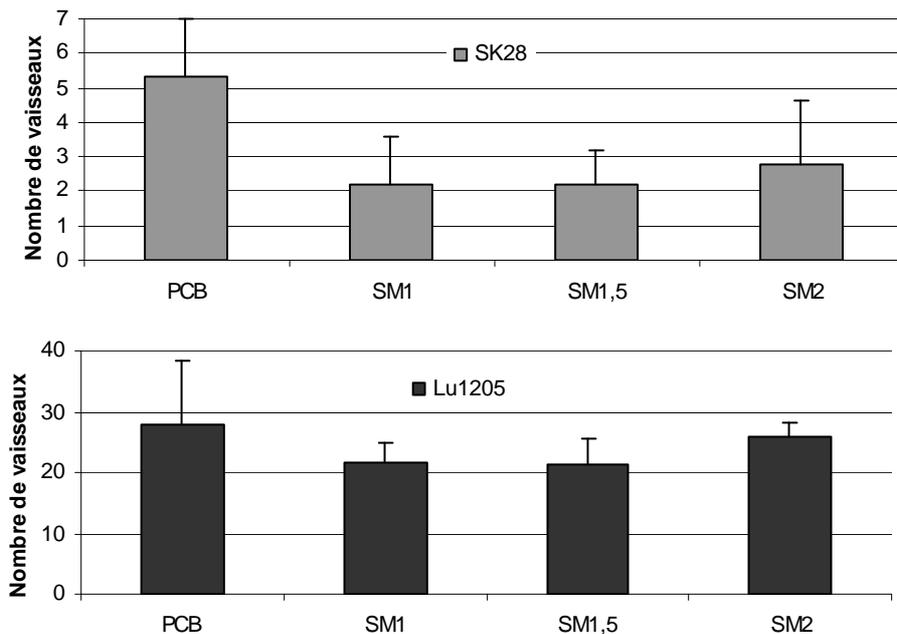


Figure 9 : Evaluation de l'angiogenèse

Les nombres de vaisseaux sanguins présents dans les tumeurs SK28 et Lu1205 Placebo (PCB) ou traitées PBG (SM1, 1.5 et 2).

Le comptage du nombre de vaisseaux sanguins dans les tumeurs révèle que les tumeurs Lu1205 sont beaucoup plus vascularisées que les tumeurs SK28. Le traitement par PBG a pour effet de diminuer le nombre de vaisseaux fortement dans les tumeurs SK28 et plus modérément dans les tumeurs Lu1205 (voir Fig.9).

L'étude *in vivo* montre des effets de PBG différents en comparaison de l'étude *in vitro* et des études *in vivo* de la littérature. Les résultats de cette étude sont à confirmer sur un plus grand nombre de souris. Un traitement par la plus faible dose (0,7 mg/kg b.w.) semblerait suffisant pour observer les effets de PBG.

Discussion et perspectives

La résistance à l'apoptose est une caractéristique principale acquise par les cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2000). Il est important d'étudier les voies de mort cellulaire et de résistance pour sensibiliser les cellules à la mort et contrer ou contourner la chimiorésistance tumorale. La sensibilisation à la mort cellulaire est, en effet, un axe thérapeutique important dans la lutte anti-tumorale. Dans ce but, il est intéressant de cibler la mitochondrie qui est un intégrateur central des signalisations apoptotiques (Kroemer 2003; Berridge, Herst et al. 2009; Ralph and Neuzil 2009; Fulda, Galluzzi et al. 2010). Des signaux en provenance des récepteurs de mort et des organites (noyau, RE ou lysosome), suite à l'apparition d'un stress ou d'une altération, vont conduire à la stimulation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Brenner and Kroemer 2000; Breckenridge, Germain et al. 2003; Chwieralski, Welte et al. 2006; Le Bras, Rouy et al. 2006). Diverses protéines peuvent intervenir pour former des pores au niveau des membranes (externe et/ou interne) mitochondriales (Kroemer, Galluzzi et al. 2007). Parmi ces protéines, ANT, constituant majoritaire de la MIM, forme un canal dans la MIM au sein du PTP en conditions apoptotiques (Halestrap and Brenner 2003). ANT constitue donc une cible putative pour induire l'apoptose en thérapie anti-tumorale. L'étude d'ANT en tant que cible thérapeutique nécessite de prendre en compte la diversité de ses isoformes. Au démarrage de notre étude, quatre isoformes d'ANT étaient identifiées : ANT 1, 2, 3 et 4. Seuls les rôles des isoformes ANT 1, 2 et 3 étaient connus. Les isoformes 1 et 3 d'ANT étaient décrites comme ayant un rôle pro-apoptotique tandis que l'isoforme 2 était connu pour son action anti-apoptotique. Nous nous sommes ainsi attachés à identifier le rôle de l'isoforme ANT4, nouvellement identifiée, dans la signalisation apoptotique. Dans ce but, nous avons surexprimé la protéine ANT4 dans des cellules cancéreuses humaines (HeLa et HT29) et étudié différents effets de cette isoforme en l'absence de stimulus apoptotique et suite au traitement par LND (cible le PTP) et Sts (inhibe la PKC). Les observations des effets d'ANT4 ont été comparées avec ceux de l'isoforme ANT3 (pro-apoptotique).

Nous avons observé qu'ANT4 ne modifie ni la morphologie cellulaire, ni le réseau mitochondrial et n'a aucun effet sur la respiration cellulaire. ANT4 modifie néanmoins la production d'EAO intracellulaires. La surexpression d'ANT4 conduit à une diminution des H_2O_2 alors que le taux d' $O_2^{\cdot-}$ mitochondrial reste inchangé. Ceci pourrait s'expliquer par une baisse d'expression ou d'activité des SOD qui convertissent les $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 ou encore par une augmentation d'expression d'une enzyme détoxifiante les H_2O_2 (catalase, glutathion peroxydase...). La SOD mitochondriale (SOD2 ou MnSOD), protéine de la matrice, pourrait

interagir fonctionnellement avec ANT4, bien que cette interaction n'est pas été identifiée par l'étude de l'interactome d'ANT (Verrier, Deniaud et al. 2004). Il est cependant difficile d'imaginer qu'une modification de l'activité de la SOD2 n'est pas de répercussion sur la concentration d'O₂⁻ mitochondriaux. Nos résultats ont montrés le rôle anti-apoptotique d'ANT4 suite aux traitements de cellules cancéreuses par deux traitements différents spécifiques de la voie intrinsèque : LND et Sts. Dans ce cas la surexpression d'ANT produit le même effet que la surexpression d'ANT2. L'étude des paramètres mitochondriaux a montré une activité inhibitrice d'ANT4 à l'inverse d'ANT3. Dans le cas du traitement LND, nos résultats sur la non-activation de la voie intrinsèque expliquent l'absence d'activation de la caspase 9. Cependant, le traitement par Sts des cellules ANT4 induit le clivage de la caspase 9 alors qu'il ne permet pas l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose. Le clivage de la caspase 9 présuppose une sortie de cyt *c* de l'espace inter-membranaire. Aucune perméabilisation n'étant détectée par le test calcéine/cobalt qui reflète la perméabilisation de la MIM, il s'agirait ici d'une perméabilisation de la MEM impliquant des canaux Bax/Bak ou Bax/VDAC. Le traitement Sts des cellules ANT4 ne conduisant pas à une fragmentation de l'ADN (SubG1), il semble que le clivage observé de la caspase 9 ne correspond pas à une activation de cette caspase. La pro-caspase 9 est, en effet, capable de s'auto-activer en l'absence de la formation de l'apoptosome mais donne une caspase 9 inactive, incapable d'activer la cascade des caspases exécutrices (Stennicke, Deveraux et al. 1999; Twiddy and Cain 2007). Une autre hypothèse serait la présence d'un taux élevé d'inhibiteurs de caspases (IAPs) dans les cellules surexprimant ANT4. L'expression élevée de ces protéines anti-apoptotiques permettrait de garantir l'effet anti-apoptotique des cellules ANT4. Cependant cela n'explique pas l'effet inhibiteur sur la PMM malgré la diminution de Bcl-2 dans les cellules ANT4. L'inhibition de la PMM pourrait être expliquée par l'augmentation d'expression de Bcl-x_L ou une baisse d'expression de Bax qui n'ont pas été étudiés.

Dans cette étude nous avons démontré que l'isoforme ANT4 a un rôle anti-apoptotique dans des cellules cancéreuses. Ce rôle semble comparable à celui de l'isoforme ANT2. Les différentes isoformes seraient capables d'interagir avec des partenaires différents qui favoriseraient soit la fonction translocateur, soit la fonction pore. Il serait donc intéressant de cibler certaines isoformes d'ANT dans un but thérapeutique. ANT4 est anti-apoptotique mais son expression est cantonnée chez l'Homme au foie, au cerveau et aux testicules. L'ANT2 quant à elle est fortement exprimée dans les cellules prolifératives, les lignées tumorales et les tumeurs humaines (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). De par son profil d'expression, ANT2 semble une cible préférentielle dans le traitement anti-tumoral ((Sharaf El Dein, Mayola et al. 2011), voir en annexe). Plusieurs études ont tenté de cibler l'isoforme ANT2 en

diminuant son expression dans des modèles de cancer *in vitro* et *in vivo*. Le Bras et al ont mis évidence une sensibilisation de cellules tumorales à la mort cellulaire suite à la diminution de l'expression d'ANT2 par ARN interférence (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). Par la même technique, Jang et al ont montré une induction d'apoptose *in vitro* et une régression tumorale *in vivo* (Jang, Choi et al. 2008). Ces études montrent l'intérêt de cibler ANT2 à des fins thérapeutiques. L'élaboration de thérapies capables de moduler l'expression d'ANT2 ou d'interagir directement et de façon spécifique avec ANT2 serait particulièrement intéressante. De même, induire la conformation de pore d'ANT en modifiant les interactions avec des protéines anti-apoptotiques, comme Bcl-2, constituerait une thérapie anti-cancéreuse prometteuse. Certains agents ont déjà été identifiés pour leur capacité à induire la fonction de pore d'ANT *in vitro* sur des protéoliposomes ANT (voir Annexe, tableau 1). Des peptides avec des séquences BH3, des acides gras à chaîne courte (propionate/acétate), le ganglioside 3-7-aldéhyde et un peptide dérivé de la protéine virale Vpr (Vpr 52-96, TEAM-VP) sont capables d'induire la voie mitochondriale de l'apoptose sur lignées cellulaires et d'induire l'ouverture d'un pore ANT (Zamzami, El Hamel et al. 2000; Jacotot, Ferri et al. 2001; Jan, Belzacq et al. 2002; Brenner, Kniep et al. 2010). Ces peptides et ces molécules qui ciblent ANT pourraient servir d'agents thérapeutiques anti-cancéreux. D'autres molécules plus étudiées comptent ANT parmi leurs cibles (voir Annexe, tableau 2). Arsénite et Lonidamine sont capables d'induire la conformation de pore d'ANT ainsi que l'apoptose de cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo*. De plus Arsénite est utilisé dans le traitement de cancers hématologiques (leucémie promyélocytaire, myélome multiple) et Lonidamine est en essai clinique de phase II contre le glioblastome et le cancer des ovaires (Larochette, Decaudin et al. 1999; Belzacq, El Hamel et al. 2001; Oudard, Carpentier et al. 2003). Cibler ANT et induire sa conformation de pore membranaire est donc une stratégie thérapeutique anti-tumorale prometteuse.

Certaines cellules tumorales, comme les mélanomes, présentent une résistance à la mort cellulaire particulièrement élevée. La chimiorésistance acquise du mélanome en fait un cancer agressif car aucun traitement disponible ne permet de l'éliminer. Cette caractéristique du mélanome est le résultat de l'activation de plusieurs voies de survie (NF- κ B, MAPK, PI3K/Akt) associé à un niveau élevé d'expression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1, ML-IAP...). D'autres stratégies permettent au mélanome de tirer partie des stress cellulaires (stress du RE, stress oxydant, altérations de l'ADN) pour amplifier l'activation des voies de survie et augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques. De plus, certains effecteurs des voies de survie participent à la progression tumorale et au développement de

métastases (par exemple, mTOR activé en aval d'Akt est associé à un mauvais pronostic du mélanome, (Populo, Soares et al. 2011)). Plusieurs thérapies ciblées sont en cours de développement pour inhiber spécifiquement des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Mcl-1) ou des membres des voies de survie (B-Raf, PI3K, mTOR). Notre étude a porté sur l'étude de deux molécules (WFA et PBG) issues de plantes médicinales et qui suscitent beaucoup d'intérêt actuellement pour leur caractéristique anti-tumorale. Les publications sur ces molécules mettent en avant leurs effets pléiotropes sur de nombreux modèles de cancer *in vitro* et *in vivo*. Nos travaux ont eu pour but d'étudier les effets de WFA sur des cellules de mélanome et d'établir les mécanismes d'action de PBG sur la mort cellulaire des mélanomes. Nous avons montré que WFA induit la mort des cellules de mélanome par apoptose. WFA est responsable du déclenchement des événements de l'apoptose mitochondriale. Ces événements mènent à une perméabilisation complète des membranes mitochondriales avec relargage du cyt *c* et activation de la voie des caspases. L'ouverture du PTP ne semble pas, dans ce cas, pouvoir expliquer la perméabilisation de la membrane interne. L'inhibiteur du PTP, CsA, n'a aucune incidence sur les événements mitochondriaux. Csa inhibe spécifiquement la liaison de cyclophiline D sur ANT. Des résultats préliminaires montrent qu'un inhibiteur de VDAC, Dids, n'a pas d'effet non plus. Nous avons montré que Bax est impliqué mais il peut intervenir soit comme membre d'un canal, soit comme régulateur positif. Il s'agirait soit d'un problème de spécificité des inhibiteurs pharmaceutiques, soit d'un pore de composition protéique différente de celle que nous connaissons. Nous avons vu que WFA ne semble pas agir sur la mitochondrie directement mais via la production d'EAO. WFA induit des O₂⁻ et H₂O₂ mais il semble que l'inhibition de l'H₂O₂ par la catalase suffirait à stopper la mort induite par WFA. L'inhibition de paramètres mitochondriaux et de la fragmentation nucléaire par l'antioxydant NAC nous mène à conclure à un effet pro-oxydant de WFA qui déclenche la mort apoptotique par la voie intrinsèque. Cette apoptose est facilitée par une diminution de l'expression de Bcl-2, inhibiteur de la PMM. Nos résultats sur l'expression de la protéine Bcl-2 confirment certains résultats de la littérature (Oh, Lee et al. 2008; Stan, Hahm et al. 2008). Les résultats concernant la protéine Mcl-1 diffèrent des données obtenues sur cellules leucémiques (Oh, Lee et al. 2008) mais confirment les résultats obtenus sur cellules de carcinome mammaire (Stan, Hahm et al. 2008). La forte augmentation du niveau de Mcl-1 observée par western blot est contradictoire avec une action pro-apoptotique de WFA malgré l'apparition de la forme Mcl-1S qui est pro-apoptotique. Cela pourrait s'expliquer par la fonction d'inhibition du protéasome déjà décrite pour WFA (Yang, Shi et al. 2007). En effet, la protéine Mcl-1 a un cycle de vie relativement rapide car elle est dégradée par le protéasome (Warr and Shore 2008). Une inhibition du protéasome pourrait ainsi résulter en une

accumulation de protéines Mcl-1 polyubiquitinées. Nos résultats ne nous permettent pas de savoir si les protéines Mcl-1 de nos cellules inhibent des protéines pro-apoptotiques ou si elles sont inactives mais accumulées faute de dégradation protéosomale.

Nos résultats, concernant l'action de PBG sur les mélanomes, montrent l'induction de deux types de mort cellulaire. PBG est capable de déclencher une mort apoptotique ou une mort aux caractéristiques nécrotiques. La mort nécrotique induite par PBG ne semble pas être de la nécroptose, la nécrose induite récemment décrite par Hitomi et al (Hitomi, Christofferson et al. 2008). PBG, dans toutes les cellules testées va mener à l'activation de la voie mitochondriale. Tout comme pour WFA, les EAO ont un rôle central dans le déclenchement de ces événements. Une nouveauté apportée par notre étude, en plus de la mise en évidence de la nécrose, est l'implication du RE. Nos expériences sur organites isolés montrent une putative action directe, et donc une nouvelle cible pour PBG. Cependant, comme pour l'étude sur WFA, il ne s'agit pas d'organites isolés de cellules cancéreuses qui pourraient montrer des résultats différents. Sur nos cellules, nous avons étudié l'expression de la chaperonne Grp78, protéine clé de l'initiation de la réponse UPR, impliquée dans les trois signalisations de réponse au stress du RE. L'augmentation de l'expression de la chaperonne Grp78 penche pour une implication du RE et l'induction d'un stress RE qu'il serait intéressant d'approfondir. Les effets de PBG, jusqu'au déclenchement de la voie mitochondriale, seraient semblables dans le cas de l'induction de l'apoptose comme dans le cas de l'induction de la nécrose. Nous avons identifié la divergence de ces deux signalisations au niveau de la cascade des caspases. Les cellules dans lesquelles PBG induit de l'apoptose voient les caspases initiatrice (caspase 9) et exécutive (caspase 3) activées. Dans la lignée cellulaire où PBG induit de la nécrose (SK28), la caspase 9 est activée mais pas la caspase 3. La nécrose adviendrait donc faute d'activation des caspases exécutrices dans la lignée SK28. Ces résultats peuvent s'expliquer soit par une spécificité de cette lignée cellulaire, soit par une spécificité de cette molécule. La nécrose, dans certains cas, constitue une mort par défaut due à une déplétion en ATP nécessaire à l'activation des caspases (Leist, Single et al. 1997). Nous avons remarqué que la lignée SK28 permet l'activation des caspases suite au traitement par STS, il nous semble donc que la lignée SK28 présente un taux d'ATP suffisant pour permettre l'activation des caspases. Après traitement par PBG de la lignée SK28, on observe un clivage de la caspase 9 (plus visible à 4 μ M de PBG). Il semblerait donc que PBG ne diminue pas assez la concentration en ATP pour empêcher l'activation de la caspase 9 dans ces cellules. Une spécificité de la lignée SK28 par rapport aux autres lignées testées est le taux basal d'EAO. La figure 4 du manuscrit portant sur l'étude WFA montre les taux d'O₂⁻ et de H₂O₂ dans les quatre lignées de mélanome. La ligne SK28 présente presque 20% d'O₂⁻ détectés par la sonde MitoSoxRed et

environ 40% de H₂O₂ détectés par la sonde carboxy-DFFHDA. Les EAO et les H₂O₂ en particulier sont capables d'inhiber l'activité des caspases (Hampton and Orrenius 1997; Hampton, Fadeel et al. 1998). L'activation de la caspase 3 serait peut être inhibée par le taux élevé d'EAO dans les cellules SK28. Il est aussi possible que cette spécificité provienne de la molécule PBG. En effet, la molécule ménadione qui est une naphthoquinone comme PBG est capable d'induire l'apoptose (Caricchio, Kovalenko et al. 1999; Criddle, Gillies et al. 2006) mais également la nécrose (Sata, Klonowski-Stumpe et al. 1997; Niemczyk, Majczak et al. 2004). Nos résultats sur cellules SK28 traitées par la PBG rejoignent ceux de l'étude de Verrax et al de 2004 sur une lignée de carcinome hépatocellulaire traitée par ménadione (Verrax, Cadrobbi et al. 2004). Dans cette étude, ménadione induit une mort cellulaire non-apoptotique indépendante de l'activation de la caspase 3 en présence d'ascorbate qui potentialise la production d'EAO (et plus particulièrement de H₂O₂) par la ménadione. L'induction de la mort cellulaire par les naphthoquinones passe par la production d'EAO et plus particulièrement des H₂O₂ dans le cas de la nécrose. Les lignées qui, comme SK28, présentent une concentration élevée en H₂O₂ pourraient être plus sensibles à l'induction de la nécrose plutôt qu'à l'apoptose. La même équipe utilisant ménadione et ascorbate a montré, dans une lignée de carcinome mammaire, que ce traitement induit un stress oxydant capable de déclencher un stress du RE (Dejeans, Tajeddine et al. 2010). Le mécanisme d'action de PBG pourrait être le même dans notre cas. PBG, une fois entré dans les cellules, provoquerait une augmentation du taux d'EAO qui induirait un stress du RE et une activation de la voie mitochondriale. Le stress oxydant (et plus particulièrement H₂O₂) peut, en effet, déclencher un relargage de Ca²⁺ par le RE (Sauer, Diedershagen et al. 1997; Volk, Hensel et al. 1997). Le déclenchement d'un stress RE permettrait d'amplifier l'activation de la voie mitochondriale. Selon le taux initial d'EAO intracellulaire on observe alors l'induction soit de l'apoptose, soit de la nécrose.

Dans notre modèle, l'action de WFA et PBG semble avoir pour point de départ la production d'EAO. Nos résultats montrent que c'est la fonction pro-oxydante de nos deux molécules qui déclenche la signalisation de mort cellulaire. WFA induit la formation d'O₂⁻ que nous avons localisé au niveau de la mitochondrie par le marquage MitoSoxRed. Cependant, ces O₂⁻ ne sont pas nécessairement produits au niveau de la membrane mitochondriale. Ils peuvent être produits par des complexes NOXs au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des organites cellulaires. NOX4 a été identifié comme une oncoprotéine dans le carcinome mammaire (Graham, Kulawiec et al. 2010). Graham et al ont montré que NOX4 agit via la production d'EAO à la mitochondrie. WFA pourrait interagir avec les NOXs au niveau des membranes et augmenter le niveau d'O₂⁻. Les NOX4 étant surexprimés dans les mélanomes,

WFA pourrait induire majoritairement des $O_2^{\cdot-}$ à la membrane mitochondriale. PBG est une quinone dont la cytotoxicité est décrite pour faire intervenir un cycle redox (Kappus 1986). A leur entrée dans la cellule les quinones subissent une réduction d'un électron par l'enzyme microsomale NADPH-cytochrome P450 réductase ou l'enzyme mitochondriale NADH ubiquinone oxydo-réductase. La semi-quinone qui est générée par cette réaction va participer à des réactions d'oxydo-réduction et former des $O_2^{\cdot-}$ (Kappus 1986). Inbaraj et Chignell ont montré, dans des kératinocytes, que ce mécanisme est bien la principale source de toxicité de PBG (Inbaraj and Chignell 2004). Les $O_2^{\cdot-}$ générés par PBG sont convertis en H_2O_2 qui lors de leur détoxification vont diminuer la concentration de glutathion réduit (GSH, antioxydant cellulaire). WFA et PBG agissent donc en surchargeant les cellules en EAO et pour PBG en diminuant les réserves d'antioxydant cellulaire. La protéine Bcl-2 joue un rôle dans la régulation des EAO (Chen and Pervaiz 2009; Susnow, Zeng et al. 2009). Il protège les cellules d'un stress oxydant au niveau de la mitochondrie en régulant la fraction mitochondriale de GSH (Zimmermann, Loucks et al. 2007). Le taux d'expression de Bcl-2 est donc le reflet du taux d'antioxydant mitochondrial, ce qui expliquerait que les lignées MEL501 et SK28 soient les moins sensibles à l'effet de WFA. La baisse du niveau d'expression de Bcl-2 par WFA induit une diminution du blocage des protéines pro-apoptotiques et de la réserve de GSH mitochondriale. Les fonctions d'inhibition de la PMM et d'antioxydant de Bcl-2 sont toutes les deux inhibées ce qui participe à l'induction de l'apoptose. De plus, il a été montré que les EAO contrôlent l'expression des membres de la famille Bcl-2 (Li, Ueta et al. 2004). Li et al ont montré que les EAO sont capables d'inhiber l'expression de Bcl-2 (Li, Ueta et al. 2004). L'inhibition de l'expression de Bcl-2 suite au traitement par WFA serait donc une conséquence du rôle pro-oxydant de WFA.

Dans nos cellules de mélanome, les effets de WFA et PBG reposent donc sur leur effet pro-oxydant. Nous avons vu dans l'introduction que le stress oxydant est impliqué dans la résistance des mélanomes et notamment via l'activation des voies MAPK et NF- κ B. Le stress oxydant est donc une cible thérapeutique intéressante pour traiter les cancers et le mélanome en particulier. L'action pro-oxydante de WFA et PBG en font des molécules prometteuses pour le traitement du mélanome. Leur efficacité pourrait être renforcée par le buthionine sulfoximine, molécule capable de dépléter les cellules en GSH.

Nous avons étudiés les mécanismes d'action de WFA et PBG dans un modèle de lignées cellulaires de mélanome. L'utilisation de quatre lignées nous permet de prendre en compte l'hétérogénéité des tumeurs. Le modèle cellulaire est indispensable dans l'étude de mécanismes cellulaire et moléculaire. Cependant, nous sommes amenés à nous interroger sur

la pertinence de ce modèle. Jusqu'où les lignées cellulaires de mélanomes reproduisent-elles la tumeur de mélanome ? Et, a fortiori, les mécanismes mis en évidence adviendraient-ils dans les tumeurs de mélanomes ? Avant de tester de nouvelles molécules sur nos lignées de mélanome, nous avons testé des molécules utilisées en chimiothérapie ou en tests cliniques (cisplatine, lonidamine, melphalan, arsénic trioxide, tunicamycine). Nous avons aussi utilisé staurosporine comme témoin positif de l'induction d'apoptose. Ces molécules ne permettent pas l'amélioration de la survie des patients atteints d'un mélanome. Cependant, nos cellules de mélanomes sont tuées par ces molécules, bien qu'à une dose supérieure de celle utilisée pour la plupart des lignées cancéreuses. Il semble que les lignées cellulaires ne reproduisent pas la résistance caractéristique des tumeurs de mélanome. Notre modèle ne prend pas en considération le microenvironnement tumoral. Certes les relations des cellules tumorales de mélanomes avec les kératinocytes et les fibroblastes sont altérées et les interactions directes mélanocytes-kératinocytes sont perdues (Haass, Smalley et al. 2004). L'étude du microenvironnement des tumeurs est récente et il est possible que de nouvelles interactions impliquées dans la résistance des mélanomes sera mise à jour. Une autre différence entre le modèle cellulaire et le tissu tumoral est la quantité d'oxygène, paramètre important quand on s'intéresse au stress oxydant. Dans la peau, comme dans les autres tissus, les cellules sont en conditions hypoxiques (10 à 0,5% d'O₂) (Bedogni and Powell 2009) qui ne sont pas reproduites dans nos conditions de culture cellulaire. Bedogni et Powell rapporte que l'hypoxie au niveau de la peau améliore la prolifération des mélanocytes et favoriserait leur transformation maligne, en partie due à la stabilisation de HIF-1 α (hypoxia inducing factor 1 α) (Bedogni and Powell 2009). L'hypoxie est également impliquée dans l'activation de signalisations induisant l'angiogénie, la migration et les métastases (Bedogni and Powell 2009). La condition hypoxique participe donc au développement et à la progression du mélanome (Michaylira and Nakagawa 2006). De plus, Les EAO sont augmentés en hypoxie et ils régulent positivement l'expression de HIF-1 α (Lluis, Buricchi et al. 2007). Le taux élevé d'EAO *in vivo* pourrait favoriser l'action des molécules pro-oxydantes WFA et PBG. Notre étude PBG préliminaire dans un modèle de souris immunodéficientes xéno greffées avec des cellules de mélanome humain montrent des résultats différents de l'étude *in vitro*. PBG semble efficace au moins pour ralentir la croissance tumorale. Nos résultats ne penchent pas pour l'induction d'une signalisation de mort cellulaire par PBG *in vivo* mais plutôt vers un effet anti-angiogénique. Les tumeurs formées par les cellules SK28 présentent une plus faible vascularisation que les Lu1205 et sûrement un taux d'EAO plus élevé. Dans les deux types de tumeurs on a observé un effet anti-angiogénique de PBG. Cet effet semble plus fort dans les tumeurs SK28 (plus de la moitié de vaisseaux en moins). Il s'agit d'un effet prometteur et il

serait intéressant d'étudier les mécanismes mis en jeu. Le modèle *in vivo* que nous avons utilisé nous a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes d'action de PBG dans les cellules de mélanome. Cependant les souris immunodéficientes xéno greffées avec des cellules humaines présentent des limites pour reproduire le microenvironnement tumoral et notamment l'interaction avec les macrophages intra-épidermiques. Notre modèle cellulaire pourrait être amélioré par la culture cellulaire en 3-D, la culture en incubateur hypoxique voire la co-culture avec des cellules du microenvironnement des mélanomes. Il est évidemment nécessaire de passer du modèle *in vitro* au modèle *in vivo*, mais la présence des cellules immunitaires serait intéressante pour évaluer tous les mécanismes impliqués par les traitements testés.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdel-Malek, Z. A., A. L. Kadekaro, et al. (2010). "Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure." Pigment Cell Melanoma Res **23**(2): 171-86.
- Acharya, B. R., B. Bhattacharyya, et al. (2008). "The natural naphthoquinone plumbagin exhibits antiproliferative activity and disrupts the microtubule network through tubulin binding." Biochemistry **47**(30): 7838-45.
- Adameyko, I., F. Lallemand, et al. (2009). "Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin." Cell **139**(2): 366-79.
- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-6.
- Agarwal, R., S. Diwanay, et al. (1999). "Studies on immunomodulatory activity of *Withania somnifera* (Ashwagandha) extracts in experimental immune inflammation." J Ethnopharmacol **67**(1): 27-35.
- Aggarwal, S., Y. Takada, et al. (2004). "Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling." Int J Cancer **111**(5): 679-92.
- Ahmad, A., S. Banerjee, et al. (2008). "Plumbagin-induced apoptosis of human breast cancer cells is mediated by inactivation of NF-kappaB and Bcl-2." J Cell Biochem **105**(6): 1461-71.
- Ahmad, M., S. Saleem, et al. (2005). "Neuroprotective effects of *Withania somnifera* on 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in rats." Hum Exp Toxicol **24**(3): 137-47.
- Amiri, K. I., L. W. Horton, et al. (2004). "Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma." Cancer Res **64**(14): 4912-8.
- Amstad, P. A., H. Liu, et al. (2001). "BCL-2 is involved in preventing oxidant-induced cell death and in decreasing oxygen radical production." Redox Rep **6**(6): 351-62.
- Ashkenazi, A. (2002). "Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily." Nat Rev Cancer **2**(6): 420-30.
- Aziz, M. H., N. E. Dreckschmidt, et al. (2008). "Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer." Cancer Res **68**(21): 9024-32.
- Aziz, S. A., L. B. Jilaveanu, et al. (2010). "Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma." Clin Cancer Res **16**(24): 6029-39.
- Baldwin, A. S. (2001). "Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB." J Clin Invest **107**(3): 241-6.
- Bargagna-Mohan, P., A. Hamza, et al. (2007). "The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin." Chem Biol **14**(6): 623-34.
- Barkla, D. H. and P. R. Gibson (1999). "The fate of epithelial cells in the human large intestine." Pathology **31**(3): 230-8.
- Basanez, G., J. C. Sharpe, et al. (2002). "Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature." J Biol Chem **277**(51): 49360-5.
- Bauer, M. K., A. Schubert, et al. (1999). "Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis." J Cell Biol **147**(7): 1493-502.

- Becker, B., A. Roesch, et al. (2004). "Discrimination of melanocytic tumors by cDNA array hybridization of tissues prepared by laser pressure catapulting." J Invest Dermatol **122**(2): 361-8.
- Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- Bedikian, A. Y., M. Millward, et al. (2006). "Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group." J Clin Oncol **24**(29): 4738-45.
- Bedogni, B. and M. B. Powell (2009). "Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin." Pigment Cell Melanoma Res **22**(2): 166-74.
- Belzacq-Casagrande, A. S., C. Martel, et al. (2009). "Pharmacological screening and enzymatic assays for apoptosis." Front Biosci **14**: 3550-62.
- Belzacq, A. S., C. El Hamel, et al. (2001). "Adenine nucleotide translocator mediates the mitochondrial membrane permeabilization induced by lonidamine, arsenite and CD437." Oncogene **20**(52): 7579-87.
- Belzacq, A. S., H. L. Vieira, et al. (2002). "The adenine nucleotide translocator in apoptosis." Biochimie **84**(2-3): 167-76.
- Belzacq, A. S., H. L. Vieira, et al. (2003). "Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity." Cancer Res **63**(2): 541-6.
- Bernards, R. and R. A. Weinberg (2002). "A progression puzzle." Nature **418**(6900): 823.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(7): 517-29.
- Berridge, M. V., P. M. Herst, et al. (2009). "Targeting mitochondrial permeability in cancer drug development." Mol Nutr Food Res **53**(1): 76-86.
- Beyaert, R., B. Vanhaesebroeck, et al. (1993). "Sensitization of tumor cells to tumor necrosis factor action by the protein kinase inhibitor staurosporine." Cancer Res **53**(11): 2623-30.
- Bhatia, S., S. S. Tykodi, et al. (2009). "Treatment of metastatic melanoma: an overview." Oncology (Williston Park) **23**(6): 488-96.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson, et al. (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." Nature **432**(7015): 332-7.
- Birck, A., V. Ahrenkiel, et al. (2000). "Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies." J Invest Dermatol **114**(2): 277-80.
- Boatright, K. M. and G. S. Salvesen (2003). "Mechanisms of caspase activation." Curr Opin Cell Biol **15**(6): 725-31.
- Boiko, A. D., O. V. Razorenova, et al. (2010). "Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271." Nature **466**(7302): 133-7.
- Bollag, G., P. Hirth, et al. (2010). "Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma." Nature **467**(7315): 596-9.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-7.
- Bouillet, P., S. Cory, et al. (2001). "Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim." Dev Cell **1**(5): 645-53.
- Brar, S. S., T. P. Kennedy, et al. (2002). "An NAD(P)H oxidase regulates growth and transcription in melanoma cells." Am J Physiol Cell Physiol **282**(6): C1212-24.
- Brar, S. S., T. P. Kennedy, et al. (2001). "Reactive oxygen species from NAD(P)H:quinone oxidoreductase constitutively activate NF-kappaB in malignant melanoma cells." Am J Physiol Cell Physiol **280**(3): C659-76.
- Braun, S., F. D. Vogl, et al. (2005). "A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer." N Engl J Med **353**(8): 793-802.
- Breckenridge, D. G., M. Germain, et al. (2003). "Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways." Oncogene **22**(53): 8608-18.

- Brenner, C., B. Kniep, et al. (2010). "GD3-7-aldehyde is an apoptosis inducer and interacts with adenine nucleotide translocase." Biochem Biophys Res Commun **391**(1): 248-53.
- Brenner, C. and G. Kroemer (2000). "Apoptosis. Mitochondria--the death signal integrators." Science **289**(5482): 1150-1.
- Brenner, C., M. Le Bras, et al. (2003). "Insights into the mitochondrial signaling pathway: what lessons for chemotherapy?" J Clin Immunol **23**(2): 73-80.
- Breslow, A. (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." Ann Surg **172**(5): 902-8.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature **369**(6483): 756-8.
- Burdon, R. H. (1995). "Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation." Free Radic Biol Med **18**(4): 775-94.
- Burdon, R. H. (1996). "Control of cell proliferation by reactive oxygen species." Biochem Soc Trans **24**(4): 1028-32.
- Caricchio, R., D. Kovalenko, et al. (1999). "Apoptosis provoked by the oxidative stress inducer menadione (Vitamin K(3)) is mediated by the Fas/Fas ligand system." Clin Immunol **93**(1): 65-74.
- Carriere, A., A. Galinier, et al. (2006). "[Physiological and physiopathological consequences of mitochondrial reactive oxygen species]." Med Sci (Paris) **22**(1): 47-53.
- Cerroni, L., H. P. Soyer, et al. (1995). "bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi." Am J Dermatopathol **17**(1): 7-11.
- Chambers, A. F., A. C. Groom, et al. (2002). "Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites." Nat Rev Cancer **2**(8): 563-72.
- Chambers, A. F. and A. B. Tuck (1993). "Ras-responsive genes and tumor metastasis." Crit Rev Oncog **4**(2): 95-114.
- Chautan, M., G. Chazal, et al. (1999). "Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway." Curr Biol **9**(17): 967-70.
- Checker, R., D. Sharma, et al. (2009). "Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition of NF-kappaB activation in lymphocytes." Int Immunopharmacol **9**(7-8): 949-58.
- Cheli, Y., M. Ohanna, et al. (2010). "Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes." Pigment Cell Melanoma Res **23**(1): 27-40.
- Chen, C. A., H. H. Chang, et al. (2010). "Plumbagin, Isolated from *Plumbago zeylanica*, Induces Cell Death through Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells." Pancreatology **9**(6): 797-809.
- Chen, K. G., G. Szakacs, et al. (2005). "Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5alpha and ABCB 5beta) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes." Pigment Cell Res **18**(2): 102-12.
- Chen, K. G., J. C. Valencia, et al. (2009). "Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **22**(6): 740-9.
- Chen, X., Y. Ding, et al. (2002). "Overexpression of glucose-regulated protein 94 (Grp94) in esophageal adenocarcinomas of a rat surgical model and humans." Carcinogenesis **23**(1): 123-30.
- Chen, Z. X. and S. Pervaiz (2007). "Bcl-2 induces pro-oxidant state by engaging mitochondrial respiration in tumor cells." Cell Death Differ **14**(9): 1617-27.
- Chen, Z. X. and S. Pervaiz (2009). "BCL-2: pro-or anti-oxidant?" Front Biosci (Elite Ed) **1**: 263-8.
- Chenard, M. P., L. O'Siorain, et al. (1996). "High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma." Int J Cancer **69**(6): 448-51.
- Cheng, A. L., C. H. Hsu, et al. (2001). "Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions." Anticancer Res **21**(4B): 2895-900.

- Chiu, M. I., H. Katz, et al. (1994). "RAP1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12574-8.
- Cho, Y. S., S. Challa, et al. (2009). "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation." Cell **137**(6): 1112-23.
- Choi, M. J., E. J. Park, et al. (2011). "Endoplasmic reticulum stress mediates withaferin A-induced apoptosis in human renal carcinoma cells." Toxicol In Vitro.
- Chung, J., T. C. Grammer, et al. (1994). "PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase." Nature **370**(6484): 71-5.
- Chwieralski, C. E., T. Welte, et al. (2006). "Cathepsin-regulated apoptosis." Apoptosis **11**(2): 143-9.
- Clapham, D. E. (1995). "Calcium signaling." Cell **80**(2): 259-68.
- Clapham, D. E. (2007). "Calcium signaling." Cell **131**(6): 1047-58.
- Clark, W. H., Jr., L. From, et al. (1969). "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin." Cancer Res **29**(3): 705-27.
- Clement, M. V., A. Ponton, et al. (1998). "Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu." FEBS Lett **440**(1-2): 13-8.
- Clement, M. V. and I. Stamenkovic (1996). "Superoxide anion is a natural inhibitor of FAS-mediated cell death." Embo J **15**(2): 216-25.
- Conradt, B. (2009). "Genetic control of programmed cell death during animal development." Annu Rev Genet **43**: 493-523.
- Costantini, P., A. S. Belzacq, et al. (2000). "Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis." Oncogene **19**(2): 307-14.
- Costin, G. E. and V. J. Hearing (2007). "Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress." Faseb J **21**(4): 976-94.
- Coussens, L. M., C. L. Tinkle, et al. (2000). "MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis." Cell **103**(3): 481-90.
- Coutant, F., L. Perrin-Cocon, et al. (2002). "Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine." J Immunol **169**(4): 1688-95.
- Criddle, D. N., S. Gillies, et al. (2006). "Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells." J Biol Chem **281**(52): 40485-92.
- Croft, S. L., A. T. Evans, et al. (1985). "The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*." Ann Trop Med Parasitol **79**(6): 651-3.
- Croghan, G. A., V. J. Suman, et al. (2010). "A study of paclitaxel, carboplatin, and bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma: a phase 2 consortium study." Cancer **116**(14): 3463-8.
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." Biochem J **341** (Pt 2): 233-49.
- Crompton, M., S. Virji, et al. (1998). "Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore." Eur J Biochem **258**(2): 729-35.
- Cruz, J., J. S. Reis-Filho, et al. (2003). "Expression of c-met tyrosine kinase receptor is biologically and prognostically relevant for primary cutaneous malignant melanomas." Oncology **65**(1): 72-82.
- Csordas, G., P. Varnai, et al. (2010). "Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface." Mol Cell **39**(1): 121-32.
- Curtin, J. A., J. Fridlyand, et al. (2005). "Distinct sets of genetic alterations in melanoma." N Engl J Med **353**(20): 2135-47.

- Cusack, J. C., Jr., R. Liu, et al. (2001). "Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition." Cancer Res **61**(9): 3535-40.
- Dalle, S., T. Martin-Denavit, et al. (2006). "[Genotypic hypervariability of melanoma: a therapeutic challenge]." Med Sci (Paris) **22**(2): 178-82.
- Danen, E. H., T. J. de Vries, et al. (1996). "E-cadherin expression in human melanoma." Melanoma Res **6**(2): 127-31.
- Dantzer, F., V. Schreiber, et al. (1999). "Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair." Biochimie **81**(1-2): 69-75.
- Davies, H., G. R. Bignell, et al. (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-54.
- de Paiva, S. R., M. R. Figueiredo, et al. (2003). "Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(7): 959-61.
- Dean, E. J., T. Ward, et al. (2010). "A small molecule inhibitor of XIAP induces apoptosis and synergises with vinorelbine and cisplatin in NSCLC." Br J Cancer **102**(1): 97-103.
- Decaudin, D., I. Marzo, et al. (1998). "Mitochondria in chemotherapy-induced apoptosis: a prospective novel target of cancer therapy (review)." Int J Oncol **12**(1): 141-52.
- Degterev, A., J. Hitomi, et al. (2008). "Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins." Nat Chem Biol **4**(5): 313-21.
- Degterev, A., Z. Huang, et al. (2005). "Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury." Nat Chem Biol **1**(2): 112-9.
- Degterev, A. and J. Yuan (2008). "Expansion and evolution of cell death programmes." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 378-90.
- Dejeans, N., N. Tajeddine, et al. (2010). "Endoplasmic reticulum calcium release potentiates the ER stress and cell death caused by an oxidative stress in MCF-7 cells." Biochem Pharmacol **79**(9): 1221-30.
- Demaurex, N. and C. Distelhorst (2003). "Cell biology. Apoptosis--the calcium connection." Science **300**(5616): 65-7.
- Deniaud, A., C. Brenner, et al. (2004). "Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr." Mitochondrion **4**(2-3): 223-33.
- Deniaud, A., O. Sharaf el dein, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis." Oncogene **27**(3): 285-99.
- Deveraux, Q. L. and J. C. Reed (1999). "IAP family proteins--suppressors of apoptosis." Genes Dev **13**(3): 239-52.
- Deveraux, Q. L., R. Takahashi, et al. (1997). "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases." Nature **388**(6639): 300-4.
- Devi, P. U., K. Akagi, et al. (1996). "Withaferin A: a new radiosensitizer from the Indian medicinal plant *Withania somnifera*." Int J Radiat Biol **69**(2): 193-7.
- Devi, P. U., R. Kamath, et al. (2000). "Radiosensitization of a mouse melanoma by withaferin A: in vivo studies." Indian J Exp Biol **38**(5): 432-7.
- Devi, P. U., B. S. Rao, et al. (1998). "Effect of plumbagin on the radiation induced cytogenetic and cell cycle changes in mouse Ehrlich ascites carcinoma in vivo." Indian J Exp Biol **36**(9): 891-5.
- Devi, P. U., A. C. Sharada, et al. (1995). "In vivo growth inhibitory and radiosensitizing effects of withaferin A on mouse Ehrlich ascites carcinoma." Cancer Lett **95**(1-2): 189-93.
- Dhawan, P. and A. Richmond (2002). "A novel NF-kappa B-inducing kinase-MAPK signaling pathway up-regulates NF-kappa B activity in melanoma cells." J Biol Chem **277**(10): 7920-8.
- Dick, J. E. (2003). "Breast cancer stem cells revealed." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 3547-9.

- Ding, Y., Z. J. Chen, et al. (2005). "Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone." J Pharm Pharmacol **57**(1): 111-6.
- Doerner, A., M. Pauschinger, et al. (1997). "Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans." FEBS Lett **414**(2): 258-62.
- Dolce, V., P. Scarcia, et al. (2005). "A fourth ADP/ATP carrier isoform in man: identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution." FEBS Lett **579**(3): 633-7.
- Dong, L., J. Wen, et al. (2010). "Melanocyte-stimulating hormone directly enhances UV-Induced DNA repair in keratinocytes by a xeroderma pigmentosum group A-dependent mechanism." Cancer Res **70**(9): 3547-56.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." Physiol Rev **82**(1): 47-95.
- Duffy, M. J. (2002). "Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies." Clin Chem **48**(8): 1194-7.
- Duffy, M. J. (2004). "The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy." Curr Pharm Des **10**(1): 39-49.
- Duffy, M. J., P. M. McGowan, et al. (2008). "Cancer invasion and metastasis: changing views." J Pathol **214**(3): 283-93.
- Durga, R., P. Sridhar, et al. (1990). "Effects of plumbagin on antibiotic resistance in bacteria." Indian J Med Res **91**: 18-20.
- Eckelman, B. P. and G. S. Salvesen (2006). "The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases." J Biol Chem **281**(6): 3254-60.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, et al. (2006). "Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family." EMBO Rep **7**(10): 988-94.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-74.
- el-Deiry, W. S. (1997). "Role of oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents." Curr Opin Oncol **9**(1): 79-87.
- Elliott, A. M. and M. A. Al-Hajj (2009). "ABC8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome." Mol Cancer Res **7**(1): 79-87.
- Elward, K., M. Griffiths, et al. (2005). "CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells." J Biol Chem **280**(43): 36342-54.
- Emanuel, P. O., R. G. Phelps, et al. (2008). "Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma." J Cutan Pathol **35**(3): 292-7.
- Eng, C. P., S. N. Sehgal, et al. (1984). "Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors." J Antibiot (Tokyo) **37**(10): 1231-7.
- Engel, J., R. Eckel, et al. (2003). "The process of metastasis for breast cancer." Eur J Cancer **39**(12): 1794-806.
- Ermakova, S. P., B. S. Kang, et al. (2006). "(-)-Epigallocatechin gallate overcomes resistance to etoposide-induced cell death by targeting the molecular chaperone glucose-regulated protein 78." Cancer Res **66**(18): 9260-9.
- Ernfors, P. (2010). "Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes." Exp Cell Res **316**(8): 1397-407.
- Eskes, R., B. Antonsson, et al. (1998). "Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions." J Cell Biol **143**(1): 217-24.
- Estrela, J. M., A. Ortega, et al. (2006). "Glutathione in cancer biology and therapy." Crit Rev Clin Lab Sci **43**(2): 143-81.
- Eton, O., M. Talpaz, et al. (1996). "Phase II trial of recombinant human interleukin-2 and interferon-alpha-2a: implications for the treatment of patients with metastatic melanoma." Cancer **77**(5): 893-9.

- Eu, J. P., J. Sun, et al. (2000). "The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions." Cell **102**(4): 499-509.
- Falsey, R. R., M. T. Marron, et al. (2006). "Actin microfilament aggregation induced by withaferin A is mediated by annexin II." Nat Chem Biol **2**(1): 33-8.
- Farr, S. B., D. O. Natvig, et al. (1985). "Toxicity and mutagenicity of plumbagin and the induction of a possible new DNA repair pathway in *Escherichia coli*." J Bacteriol **164**(3): 1309-16.
- Fernandez, P. M., S. O. Tabbara, et al. (2000). "Overexpression of the glucose-regulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions." Breast Cancer Res Treat **59**(1): 15-26.
- Fesik, S. W. and Y. Shi (2001). "Structural biology. Controlling the caspases." Science **294**(5546): 1477-8.
- Fetterer, R. H. and M. W. Fleming (1991). "Effects of plumbagin on development of the parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum*." Comp Biochem Physiol C **100**(3): 539-42.
- Fischer, U., R. U. Janicke, et al. (2003). "Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates." Cell Death Differ **10**(1): 76-100.
- Fitzpatrick, T. B. and A. S. Breathnach (1963). "[the Epidermal Melanin Unit System]." Dermatol Wochenschr **147**: 481-9.
- Flaherty, K. T., I. Puzanov, et al. (2010). "Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma." N Engl J Med **363**(9): 809-19.
- Foyouzi-Youssefi, R., S. Arnaudeau, et al. (2000). "Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5723-8.
- Frank, N. Y., A. Margaryan, et al. (2005). "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." Cancer Res **65**(10): 4320-33.
- Friedman, R. J. and D. S. Rigel (1985). "The clinical features of malignant melanoma." Dermatol Clin **3**(2): 271-83.
- Fruehauf, J. P. and V. Trapp (2008). "Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma?" Expert Rev Anticancer Ther **8**(11): 1751-7.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). "The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition." Biochem J **384**(Pt 2): 201-32.
- Fulda, S. (2010). "Modulation of apoptosis by natural products for cancer therapy." Planta Med **76**(11): 1075-9.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). "Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for diagnosis and treatment of human diseases." Recent Pat Anticancer Drug Discov **1**(1): 81-9.
- Fulda, S., L. Galluzzi, et al. (2010). "Targeting mitochondria for cancer therapy." Nat Rev Drug Discov **9**(6): 447-64.
- Gallerne, C., Z. Touat, et al. (2010). "The fourth isoform of the adenine nucleotide translocator inhibits mitochondrial apoptosis in cancer cells." Int J Biochem Cell Biol **42**(5): 623-9.
- Galluzzi, L., S. A. Aaronson, et al. (2009). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes." Cell Death Differ **16**(8): 1093-107.
- Galluzzi, L., N. Larochette, et al. (2006). "Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy." Oncogene **25**(34): 4812-30.
- Garbe, C., K. Peris, et al. (2010). "Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline." Eur J Cancer **46**(2): 270-83.
- Garraway, L. A., H. R. Widlund, et al. (2005). "Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma." Nature **436**(7047): 117-22.

- Germain, M., E. B. Affar, et al. (1999). "Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7." J Biol Chem **274**(40): 28379-84.
- Gilchrest, B. A., H. Y. Park, et al. (1996). "Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation." Photochem Photobiol **63**(1): 1-10.
- Giorgi, C., D. De Stefani, et al. (2009). "Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1817-27.
- Giorgi, C., A. Romagnoli, et al. (2008). "Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death." Curr Mol Med **8**(2): 119-30.
- Giraud, S., C. Bonod-Bidaud, et al. (1998). "Expression of human ANT2 gene in highly proliferative cells: GRBOX, a new transcriptional element, is involved in the regulation of glycolytic ATP import into mitochondria." J Mol Biol **281**(3): 409-18.
- Giraud, E., M. Inoue, et al. (2004). "An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis." J Clin Invest **114**(5): 623-33.
- Goding, C. and F. L. Meyskens, Jr. (2006). "Microphthalmic-associated transcription factor integrates melanocyte biology and melanoma progression." Clin Cancer Res **12**(4): 1069-73.
- Goldstein, L. J., H. Galski, et al. (1989). "Expression of a multidrug resistance gene in human cancers." J Natl Cancer Inst **81**(2): 116-24.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2005). "Redundant cell death mechanisms as relics and backups." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1490-6.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." Trends Biochem Sci **32**(1): 37-43.
- Gomathinayagam, R., S. Sowmyalakshmi, et al. (2008). "Anticancer mechanism of plumbagin, a natural compound, on non-small cell lung cancer cells." Anticancer Res **28**(2A): 785-92.
- Gong, J., N. Chen, et al. (2005). "Melanoma inhibitor of apoptosis protein is expressed differentially in melanoma and melanocytic naevus, but similarly in primary and metastatic melanomas." J Clin Pathol **58**(10): 1081-5.
- Gougeon, M. L., R. Olivier, et al. (1991). "[Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients]." C R Acad Sci III **312**(11): 529-37.
- Graham, K. A., M. Kulawiec, et al. (2010). "NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria." Cancer Biol Ther **10**(3): 223-31.
- Greenman, C., P. Stephens, et al. (2007). "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes." Nature **446**(7132): 153-8.
- Grover, A., A. Shandilya, et al. (2010). "Blocking the chaperone kinome pathway: Mechanistic insights into a novel dual inhibition approach for supra-additive suppression of malignant tumors." Biochem Biophys Res Commun **404**(1): 498-503.
- Grover, A., A. Shandilya, et al. (2010). "Probing the anticancer mechanism of prospective herbal drug Withaferin A on mammals: a case study on human and bovine proteasomes." BMC Genomics **11 Suppl 4**: S15.
- Grover, A., A. Shandilya, et al. (2010). "Inhibition of the NEMO/IKK β association complex formation, a novel mechanism associated with the NF- κ B activation suppression by Withania somnifera's key metabolite withaferin A." BMC Genomics **11 Suppl 4**: S25.
- Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell **127**(4): 679-95.
- Gupta, S. K., I. Mohanty, et al. (2004). "Cardioprotection from ischemia and reperfusion injury by Withania somnifera: a hemodynamic, biochemical and histopathological assessment." Mol Cell Biochem **260**(1-2): 39-47.

- Gutteridge, J. M. (1994). "Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection." *Chem Biol Interact* **91**(2-3): 133-40.
- Gutteridge, J. M. and B. Halliwell (2000). "Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future." *Ann N Y Acad Sci* **899**: 136-47.
- Gyrd-Hansen, M. and P. Meier (2010). "IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 561-74.
- Haass, N. K. and M. Herlyn (2005). "Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma." *J Invest Dermatol Symp Proc* **10**(2): 153-63.
- Haass, N. K., K. S. Smalley, et al. (2004). "The role of altered cell-cell communication in melanoma progression." *J Mol Histol* **35**(3): 309-18.
- Hajnoczky, G., G. Csordas, et al. (2000). "Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals." *Cell Calcium* **28**(5-6): 349-63.
- Halestrap, A. P. and C. Brenner (2003). "The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death." *Curr Med Chem* **10**(16): 1507-25.
- Halestrap, A. P., K. Y. Woodfield, et al. (1997). "Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase." *J Biol Chem* **272**(6): 3346-54.
- Haluska, F. G., H. Tsao, et al. (2006). "Genetic alterations in signaling pathways in melanoma." *Clin Cancer Res* **12**(7 Pt 2): 2301s-2307s.
- Hamburger, A. W. and S. E. Salmon (1977). "Primary bioassay of human tumor stem cells." *Science* **197**(4302): 461-3.
- Hamm, C., S. Verma, et al. (2008). "Biochemotherapy for the treatment of metastatic malignant melanoma: a systematic review." *Cancer Treat Rev* **34**(2): 145-56.
- Hampton, M. B., B. Fadeel, et al. (1998). "Redox regulation of the caspases during apoptosis." *Ann N Y Acad Sci* **854**: 328-35.
- Hampton, M. B. and S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." *FEBS Lett* **414**(3): 552-6.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Haqq, C., M. Nosrati, et al. (2005). "The gene expression signatures of melanoma progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6092-7.
- Hatzivassiliou, G., K. Song, et al. (2010). "RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth." *Nature* **464**(7287): 431-5.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, et al. (2009). "MAM: more than just a housekeeper." *Trends Cell Biol* **19**(2): 81-8.
- He, S., L. Wang, et al. (2009). "Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha." *Cell* **137**(6): 1100-11.
- Heidorn, S. J., C. Milagre, et al. (2010). "Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF." *Cell* **140**(2): 209-21.
- Held, M. A., D. P. Curley, et al. (2010). "Characterization of melanoma cells capable of propagating tumors from a single cell." *Cancer Res* **70**(1): 388-97.
- Hersey, P. and X. D. Zhang (2008). "Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* **21**(3): 358-67.
- Hewitt, R. and K. Dano (1996). "Stromal cell expression of components of matrix-degrading protease systems in human cancer." *Enzyme Protein* **49**(1-3): 163-73.
- Higgins, V. J., N. Alic, et al. (2002). "Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress." *Yeast* **19**(3): 203-14.
- Hiscutt, E. L., D. S. Hill, et al. (2010). "Targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein to increase the efficacy of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis for melanoma therapy." *J Invest Dermatol* **130**(9): 2250-8.

- Hitomi, J., D. E. Christofferson, et al. (2008). "Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway." Cell **135**(7): 1311-23.
- Hocker, T. L., M. K. Singh, et al. (2008). "Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside." J Invest Dermatol **128**(11): 2575-95.
- Hodgkinson, C. A., K. J. Moore, et al. (1993). "Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein." Cell **74**(2): 395-404.
- Hoek, K., D. L. Rimm, et al. (2004). "Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas." Cancer Res **64**(15): 5270-82.
- Hoek, K. S. and C. R. Goding (2010). "Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **23**(6): 746-59.
- Hossini, A. M., J. Eberle, et al. (2003). "Conditional expression of exogenous Bcl-X(S) triggers apoptosis in human melanoma cells in vitro and delays growth of melanoma xenografts." FEBS Lett **553**(3): 250-6.
- Hotchkiss, R. S., A. Strasser, et al. (2009). "Cell death." N Engl J Med **361**(16): 1570-83.
- Hsu, M. Y., M. J. Wheelock, et al. (1996). "Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas." J Investig Dermatol Symp Proc **1**(2): 188-94.
- Hsu, Y. L., C. Y. Cho, et al. (2006). "Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) induces apoptosis and cell cycle arrest in A549 cells through p53 accumulation via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated phosphorylation at serine 15 in vitro and in vivo." J Pharmacol Exp Ther **318**(2): 484-94.
- Huang, Q., Q. L. Deveraux, et al. (2000). "Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1427-32.
- Huang, S., M. Van Arsdall, et al. (2002). "Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice." J Natl Cancer Inst **94**(15): 1134-42.
- Ibrahim, N. and F. G. Haluska (2009). "Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms." Annu Rev Pathol **4**: 551-79.
- Inbaraj, J. J. and C. F. Chignell (2004). "Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes." Chem Res Toxicol **17**(1): 55-62.
- Ives, N. J., R. L. Stowe, et al. (2007). "Chemotherapy compared with biochemotherapy for the treatment of metastatic melanoma: a meta-analysis of 18 trials involving 2,621 patients." J Clin Oncol **25**(34): 5426-34.
- Jacotot, E., K. F. Ferri, et al. (2001). "Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2." J Exp Med **193**(4): 509-19.
- Jaeger, J., D. Koczan, et al. (2007). "Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues." Clin Cancer Res **13**(3): 806-15.
- Jaeschke, H. and J. J. Lemasters (2003). "Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury." Gastroenterology **125**(4): 1246-57.
- Jagannath, S., B. Barlogie, et al. (2004). "A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma." Br J Haematol **127**(2): 165-72.
- Jan, G., A. S. Belzacq, et al. (2002). "Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria." Cell Death Differ **9**(2): 179-88.
- Jang, J. Y., Y. Choi, et al. (2008). "Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression in vivo." BMC Cancer **8**: 160.
- Jang, J. Y., Y. Choi, et al. (2008). "Suppression of adenine nucleotide translocase-2 by vector-based siRNA in human breast cancer cells induces apoptosis and inhibits tumor growth in vitro and in vivo." Breast Cancer Res **10**(1): R11.

- Jiang, C. C., L. H. Chen, et al. (2007). "Tunicamycin sensitizes human melanoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by up-regulation of TRAIL-R2 via the unfolded protein response." Cancer Res **67**(12): 5880-8.
- Jiang, C. C., L. H. Chen, et al. (2007). "Inhibition of MEK sensitizes human melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." Cancer Res **67**(20): 9750-61.
- Johnson, J. P. (1999). "Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma." Cancer Metastasis Rev **18**(3): 345-57.
- Joseph, E. W., C. A. Pratilas, et al. (2010). "The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(33): 14903-8.
- Kadekar, A. L., R. Kavanagh, et al. (2005). "alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes." Cancer Res **65**(10): 4292-9.
- Kaileh, M., W. Vanden Berghe, et al. (2007). "Withaferin a strongly elicits I κ B kinase beta hyperphosphorylation concomitant with potent inhibition of its kinase activity." J Biol Chem **282**(7): 4253-64.
- Kang, M. H. and C. P. Reynolds (2009). "Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy." Clin Cancer Res **15**(4): 1126-32.
- Kaplin, A. I., C. D. Ferris, et al. (1994). "Purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Thiol reagents act directly on receptor protein." J Biol Chem **269**(46): 28972-8.
- Kappus, H. (1986). "Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling." Biochem Pharmacol **35**(1): 1-6.
- Karin, M. and A. Lin (2002). "NF-kappaB at the crossroads of life and death." Nat Immunol **3**(3): 221-7.
- Kawiak, A., J. Piosik, et al. (2007). "Induction of apoptosis by plumbagin through reactive oxygen species-mediated inhibition of topoisomerase II." Toxicol Appl Pharmacol **223**(3): 267-76.
- Kerr, J. F. (1965). "A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes." J Pathol Bacteriol **90**(2): 419-35.
- Kerr, J. F. (2002). "History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept." Toxicology **181-182**: 471-4.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Keuling, A. M., K. E. Felton, et al. (2009). "RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737-mediated apoptosis in melanoma: role for a caspase-8-dependent pathway." PLoS One **4**(8): e6651.
- Kini, D. P., S. Pandey, et al. (1997). "Antitumor and antifertility activities of plumbagin controlled release formulations." Indian J Exp Biol **35**(4): 374-9.
- Kirkwood, J. M., A. A. Tarhini, et al. (2008). "Next generation of immunotherapy for melanoma." J Clin Oncol **26**(20): 3445-55.
- Kirshner, J. R., S. He, et al. (2008). "Elesclomol induces cancer cell apoptosis through oxidative stress." Mol Cancer Ther **7**(8): 2319-27.
- Kluger, H. M., M. M. McCarthy, et al. (2007). "The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization." J Transl Med **5**: 6.
- Knudson, C. M. and N. M. Brown (2008). "Mitochondria potential, bax "activation," and programmed cell death." Methods Mol Biol **414**: 95-108.
- Koduru, S., R. Kumar, et al. (2010). "Notch-1 inhibition by Withaferin-A: a therapeutic target against colon carcinogenesis." Mol Cancer Ther **9**(1): 202-10.
- Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." Nature **427**(6973): 461-5.

- Korsmeyer, S. J., M. C. Wei, et al. (2000). "Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c." Cell Death Differ **7**(12): 1166-73.
- Krasilnikov, M., V. Adler, et al. (1999). "Contribution of phosphatidylinositol 3-kinase to radiation resistance in human melanoma cells." Mol Carcinog **24**(1): 64-9.
- Krishnaswamy, M. and K. K. Purushothaman (1980). "Plumbagin: A study of its anticancer, antibacterial & antifungal properties." Indian J Exp Biol **18**(8): 876-7.
- Kroemer, G. (2003). "Mitochondrial control of apoptosis: an introduction." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 433-5.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- Kroemer, G. and J. C. Reed (2000). "Mitochondrial control of cell death." Nat Med **6**(5): 513-9.
- Krueger, A., S. Baumann, et al. (2001). "FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis." Mol Cell Biol **21**(24): 8247-54.
- Krungkrai, J., R. Kanchanarithsak, et al. (2002). "Mitochondrial NADH dehydrogenase from Plasmodium falciparum and Plasmodium berghei." Exp Parasitol **100**(1): 54-61.
- Kuete, V., S. Alibert-Franco, et al. (2011). "Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype." Int J Antimicrob Agents **37**(2): 156-61.
- Kuete, V., J. G. Tangmouo, et al. (2009). "Diospyrone, crassiflorone and plumbagin: three antimycobacterial and antigonorrhoeal naphthoquinones from two Diospyros spp." Int J Antimicrob Agents **34**(4): 322-5.
- Kulkarni, R. R., P. S. Patki, et al. (1991). "Treatment of osteoarthritis with a herbomineral formulation: a double-blind, placebo-controlled, cross-over study." J Ethnopharmacol **33**(1-2): 91-5.
- Kuo, P. L., Y. L. Hsu, et al. (2006). "Plumbagin induces G2-M arrest and autophagy by inhibiting the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells." Mol Cancer Ther **5**(12): 3209-21.
- Kuo, T. H., H. R. Kim, et al. (1998). "Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2." Oncogene **17**(15): 1903-10.
- Kupchan, S. M., R. W. Doskotch, et al. (1965). "The isolation and structural elucidation of a novel steroidal tumor inhibitor from Acnistus arborescens." J Am Chem Soc **87**(24): 5805-6.
- Kwee, J. K., E. Mitidieri, et al. (1991). "Lowered superoxide dismutase in highly metastatic B16 melanoma cells." Cancer Lett **57**(3): 199-202.
- Lahat, G., Q. S. Zhu, et al. (2010). "Vimentin is a novel anti-cancer therapeutic target; insights from in vitro and in vivo mice xenograft studies." PLoS One **5**(4): e10105.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." Nature **367**(6464): 645-8.
- Larochette, N., D. Decaudin, et al. (1999). "Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore." Exp Cell Res **249**(2): 413-21.
- Lartigue, L., C. Medina, et al. (2008). "An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis." J Cell Sci **121**(Pt 21): 3515-23.
- Larue, L., M. Kumasaka, et al. (2003). "Beta-catenin in the melanocyte lineage." Pigment Cell Res **16**(3): 312-7.
- Lauber, K., E. Bohn, et al. (2003). "Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal." Cell **113**(6): 717-30.
- Lazar-Molnar, E., H. Hegyesi, et al. (2000). "Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma." Cytokine **12**(6): 547-54.

- Lazebnik, Y. A., S. H. Kaufmann, et al. (1994). "Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE." *Nature* **371**(6495): 346-7.
- Le Bras, M., A. Borgne-Sanchez, et al. (2006). "Chemosensitization by knockdown of adenine nucleotide translocase-2." *Cancer Res* **66**(18): 9143-52.
- Le Bras, M., M. V. Clement, et al. (2005). "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death." *Histol Histopathol* **20**(1): 205-19.
- Le Bras, M., I. Rouy, et al. (2006). "The modulation of inter-organelle cross-talk to control apoptosis." *Med Chem* **2**(1): 1-12.
- Lecis, D., C. Drago, et al. (2010). "Novel SMAC-mimetics synergistically stimulate melanoma cell death in combination with TRAIL and Bortezomib." *Br J Cancer* **102**(12): 1707-16.
- Lee, J., E. R. Hahm, et al. (2010). "Withaferin A inhibits activation of signal transducer and activator of transcription 3 in human breast cancer cells." *Carcinogenesis* **31**(11): 1991-8.
- Lee, T. J., H. J. Um, et al. (2009). "Withaferin A sensitizes TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated up-regulation of death receptor 5 and down-regulation of c-FLIP." *Free Radic Biol Med* **46**(12): 1639-49.
- Leist, M., B. Single, et al. (1997). "Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis." *J Exp Med* **185**(8): 1481-6.
- Leiter, U., R. M. Schmid, et al. (2000). "Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma." *Arch Dermatol Res* **292**(5): 225-32.
- Lemasters, J. J., T. P. Theruvath, et al. (2009). "Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death." *Biochim Biophys Acta* **1787**(11): 1395-401.
- Letai, A., M. C. Bassik, et al. (2002). "Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics." *Cancer Cell* **2**(3): 183-92.
- Li, D., E. Ueta, et al. (2004). "Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination." *Cancer Sci* **95**(8): 644-50.
- Li, G., K. Satyamoorthy, et al. (2001). "N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells." *Cancer Res* **61**(9): 3819-25.
- Li, J. and A. S. Lee (2006). "Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer." *Curr Mol Med* **6**(1): 45-54.
- Li, L. Y., X. Luo, et al. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature* **412**(6842): 95-9.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell* **91**(4): 479-89.
- Lin, M. T. and M. F. Beal (2006). "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases." *Nature* **443**(7113): 787-95.
- Lin, Y., S. Choksi, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation." *J Biol Chem* **279**(11): 10822-8.
- Liu, C., X. Wu, et al. (2010). "Antisense oligonucleotide targeting Livin induces apoptosis of human bladder cancer cell via a mechanism involving caspase 3." *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 63.
- Liu, X., C. N. Kim, et al. (1996). "Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c." *Cell* **86**(1): 147-57.
- Lluis, J. M., F. Buricchi, et al. (2007). "Dual role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia signaling: activation of nuclear factor- κ B via c-SRC and oxidant-dependent cell death." *Cancer Res* **67**(15): 7368-77.
- Lorigan, P., T. Eisen, et al. (2008). "Systemic therapy for metastatic malignant melanoma--from deeply disappointing to bright future?" *Exp Dermatol* **17**(5): 383-94.

- Luciani, D. S., K. S. Gwiazda, et al. (2009). "Roles of IP3R and RyR Ca²⁺ channels in endoplasmic reticulum stress and beta-cell death." *Diabetes* **58**(2): 422-32.
- Lunardi, J. and G. Attardi (1991). "Differential regulation of expression of the multiple ADP/ATP translocase genes in human cells." *J Biol Chem* **266**(25): 16534-40.
- Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors." *Cell* **94**(4): 481-90.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?" *Nat Rev Cancer* **4**(12): 966-77.
- Mabuchi, S., M. Ohmichi, et al. (2004). "Inhibition of NFkappaB increases the efficacy of cisplatin in in vitro and in vivo ovarian cancer models." *J Biol Chem* **279**(22): 23477-85.
- MacKie, R. M., A. Hauschild, et al. (2009). "Epidemiology of invasive cutaneous melanoma." *Ann Oncol* **20 Suppl 6**: vi1-7.
- Madesh, M. and G. Hajnoczky (2001). "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release." *J Cell Biol* **155**(6): 1003-15.
- Maira, S. M., F. Stauffer, et al. (2009). "PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?" *Biochem Soc Trans* **37**(Pt 1): 265-72.
- Malik, F., A. Kumar, et al. (2007). "Reactive oxygen species generation and mitochondrial dysfunction in the apoptotic cell death of human myeloid leukemia HL-60 cells by a dietary compound withaferin A with concomitant protection by N-acetyl cysteine." *Apoptosis* **12**(11): 2115-33.
- Mandal, C., A. Dutta, et al. (2008). "Withaferin A induces apoptosis by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in leukemic cells of lymphoid and myeloid origin through mitochondrial death cascade." *Apoptosis* **13**(12): 1450-64.
- Martins, L. M., I. Iaccarino, et al. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif." *J Biol Chem* **277**(1): 439-44.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis." *Science* **281**(5385): 2027-31.
- Marzo, I., C. Brenner, et al. (1998). "The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins." *J Exp Med* **187**(8): 1261-71.
- Mates, J. M. and F. M. Sanchez-Jimenez (2000). "Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy." *Int J Biochem Cell Biol* **32**(2): 157-70.
- Mathew, R., A. K. Kruthiventi, et al. (2010). "Inhibition of mycobacterial growth by plumbagin derivatives." *Chem Biol Drug Des* **76**(1): 34-42.
- Mayo, L. D., J. E. Dixon, et al. (2002). "PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy." *J Biol Chem* **277**(7): 5484-9.
- McCarthy, M. M., E. Pick, et al. (2008). "HSP90 as a marker of progression in melanoma." *Ann Oncol* **19**(3): 590-4.
- McCubrey, J. A., M. M. Lahair, et al. (2006). "Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways." *Antioxid Redox Signal* **8**(9-10): 1775-89.
- McGill, G. G., M. Horstmann, et al. (2002). "Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability." *Cell* **109**(6): 707-18.
- McNulty, S. E., N. B. Tohidian, et al. (2001). "RelA, p50 and inhibitor of kappa B alpha are elevated in human metastatic melanoma cells and respond aberrantly to ultraviolet light B." *Pigment Cell Res* **14**(6): 456-65.
- Melo, A. M., M. L. Jardim, et al. (1974). "[First observations on the topical use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer]." *Rev Inst Antibiot (Recife)* **14**(1-2): 9-16.

- Mena, S., M. Benlloch, et al. (2007). "Bcl-2 and glutathione depletion sensitizes B16 melanoma to combination therapy and eliminates metastatic disease." Clin Cancer Res **13**(9): 2658-66.
- Meyskens, F. L., Jr., S. E. McNulty, et al. (2001). "Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes." Free Radic Biol Med **31**(6): 799-808.
- Michaylira, C. Z. and H. Nakagawa (2006). "Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression." Cancer Biol Ther **5**(5): 476-9.
- Mikhail, M., E. Velazquez, et al. (2005). "PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation." Clin Cancer Res **11**(14): 5153-7.
- Mikolai, J., A. Erlandsen, et al. (2009). "In vivo effects of Ashwagandha (*Withania somnifera*) extract on the activation of lymphocytes." J Altern Complement Med **15**(4): 423-30.
- Miramar, M. D., P. Costantini, et al. (2001). "NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor." J Biol Chem **276**(19): 16391-8.
- Mishra, L. C., B. B. Singh, et al. (2000). "Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review." Altern Med Rev **5**(4): 334-46.
- Mitchell, P. and J. Moyle (1967). "Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation." Nature **213**(5072): 137-9.
- Modjtahedi, N., F. Giordanetto, et al. (2006). "Apoptosis-inducing factor: vital and lethal." Trends Cell Biol **16**(5): 264-72.
- Mohan, R., H. J. Hammers, et al. (2004). "Withaferin A is a potent inhibitor of angiogenesis." Angiogenesis **7**(2): 115-22.
- Mohanty, I., D. S. Arya, et al. (2004). "Mechanisms of cardioprotective effect of *Withania somnifera* in experimentally induced myocardial infarction." Basic Clin Pharmacol Toxicol **94**(4): 184-90.
- Monfar, M., K. P. Lemon, et al. (1995). "Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP." Mol Cell Biol **15**(1): 326-37.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." Nat Rev Cancer **4**(11): 839-49.
- Myoui, A., R. Nishimura, et al. (2003). "C-SRC tyrosine kinase activity is associated with tumor colonization in bone and lung in an animal model of human breast cancer metastasis." Cancer Res **63**(16): 5028-33.
- Nair, S., R. R. Nair, et al. (2008). "Radiosensitizing effects of plumbagin in cervical cancer cells is through modulation of apoptotic pathway." Mol Carcinog **47**(1): 22-33.
- Nakanishi, C. and M. Toi (2005). "Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs." Nat Rev Cancer **5**(4): 297-309.
- Natali, P. G., M. R. Nicotra, et al. (1993). "Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression." Br J Cancer **68**(4): 746-50.
- Nazeem, S., A. S. Azmi, et al. (2009). "Plumbagin induces cell death through a copper-redox cycle mechanism in human cancer cells." Mutagenesis **24**(5): 413-8.
- Ndlovu, N., C. Van Lint, et al. (2009). "Hyperactivated NF- κ B and AP-1 transcription factors promote highly accessible chromatin and constitutive transcription across the interleukin-6 gene promoter in metastatic breast cancer cells." Mol Cell Biol **29**(20): 5488-504.
- Nelson, A. A. and H. Tsao (2009). "Melanoma and genetics." Clin Dermatol **27**(1): 46-52.
- Nguyen, M., R. C. Marcellus, et al. (2007). "Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19512-7.

- Niemczyk, E., A. Majczak, et al. (2004). "A possible involvement of plasma membrane NAD(P)H oxidase in the switch mechanism of the cell death mode from apoptosis to necrosis in menadione-induced cell injury." *Acta Biochim Pol* **51**(4): 1015-22.
- Nihal, M., N. Ahmad, et al. (2005). "Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma." *Int J Cancer* **114**(4): 513-21.
- Nishimura, E. K., S. R. Granter, et al. (2005). "Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche." *Science* **307**(5710): 720-4.
- Norberg, E., V. Gogvadze, et al. (2008). "An increase in intracellular Ca²⁺ is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death." *Cell Death Differ* **15**(12): 1857-64.
- O'Connor, O. A., J. Wright, et al. (2005). "Phase II clinical experience with the novel proteasome inhibitor bortezomib in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma." *J Clin Oncol* **23**(4): 676-84.
- O'Day, S., R. Gonzalez, et al. (2009). "Phase II, randomized, controlled, double-blinded trial of weekly elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone for stage IV metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **27**(32): 5452-8.
- Oakes, S. A., J. T. Opferman, et al. (2003). "Regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺ dynamics by proapoptotic BCL-2 family members." *Biochem Pharmacol* **66**(8): 1335-40.
- Oakes, S. A., L. Scorrano, et al. (2005). "Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(1): 105-10.
- Oberley, T. D., W. Zhong, et al. (2000). "Localization of antioxidant enzymes and oxidative damage products in normal and malignant prostate epithelium." *Prostate* **44**(2): 144-55.
- Oh, J. H. and T. K. Kwon (2009). "Withaferin A inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inactivation of Akt and NF-kappaB in human pulmonary epithelial cells." *Int Immunopharmacol* **9**(5): 614-9.
- Oh, J. H., T. J. Lee, et al. (2008). "Induction of apoptosis by withaferin A in human leukemia U937 cells through down-regulation of Akt phosphorylation." *Apoptosis* **13**(12): 1494-504.
- Olie, R. A., C. Hafner, et al. (2002). "Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages." *J Invest Dermatol* **118**(3): 505-12.
- Olofsson, K. E., L. Andersson, et al. (2008). "Nanomolar concentrations of lysophosphatidylcholine recruit monocytes and induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* **370**(2): 348-52.
- Orrenius, S., B. Zhivotovsky, et al. (2003). "Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 552-65.
- Ossowski, L. and J. A. Aguirre-Ghiso (2010). "Dormancy of metastatic melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* **23**(1): 41-56.
- Otera, H., S. Ohsakaya, et al. (2005). "Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space." *Embo J* **24**(7): 1375-86.
- Ott, M., J. D. Robertson, et al. (2002). "Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1259-63.
- Oudard, S., A. Carpentier, et al. (2003). "Phase II study of lonidamine and diazepam in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme." *J Neurooncol* **63**(1): 81-6.
- Ozoren, N. and W. S. El-Deiry (2002). "Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL." *Neoplasia* **4**(6): 551-7.
- Park, H. R., S. Chijiwa, et al. (2007). "Relative and absolute configuration of versipelostatin, a down-regulator of molecular chaperone GRP78 expression." *Org Lett* **9**(8): 1457-60.

- Pastorino, J. G., N. Shulga, et al. (2002). "Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis." *J Biol Chem* **277**(9): 7610-8.
- Pervaiz, S., J. Cao, et al. (2001). "Activation of the RacGTPase inhibits apoptosis in human tumor cells." *Oncogene* **20**(43): 6263-8.
- Pervaiz, S. and M. V. Clement (2002). "A permissive apoptotic environment: function of a decrease in intracellular superoxide anion and cytosolic acidification." *Biochem Biophys Res Commun* **290**(4): 1145-50.
- Pervaiz, S. and M. V. Clement (2004). "Tumor intracellular redox status and drug resistance--serendipity or a causal relationship?" *Curr Pharm Des* **10**(16): 1969-77.
- Pervaiz, S. and M. V. Clement (2007). "Superoxide anion: oncogenic reactive oxygen species?" *Int J Biochem Cell Biol* **39**(7-8): 1297-304.
- Pervaiz, S., J. K. Ramalingam, et al. (1999). "Superoxide anion inhibits drug-induced tumor cell death." *FEBS Lett* **459**(3): 343-8.
- Petit, F., D. Arnoult, et al. (2003). "Intrinsic and extrinsic pathways signaling during HIV-1 mediated cell death." *Biochimie* **85**(8): 795-811.
- Petit, P. X., H. Lecoeur, et al. (1995). "Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis." *J Cell Biol* **130**(1): 157-67.
- Picardo, M., P. Grammatico, et al. (1996). "Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma." *J Invest Dermatol* **107**(3): 322-6.
- Pinton, P., C. Giorgi, et al. (2008). "Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis." *Oncogene* **27**(50): 6407-18.
- Plati, J., O. Bucur, et al. (2008). "Dysregulation of apoptotic signaling in cancer: molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *J Cell Biochem* **104**(4): 1124-49.
- Poon, I. K., M. D. Hulett, et al. (2010). "Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance." *Cell Death Differ* **17**(3): 381-97.
- Populo, H., P. Soares, et al. (2011). "mTOR pathway activation in cutaneous melanoma is associated with poorer prognosis characteristics." *Pigment Cell Melanoma Res* **24**(1): 254-7.
- Poste, G. and I. J. Fidler (1980). "The pathogenesis of cancer metastasis." *Nature* **283**(5743): 139-46.
- Poulikakos, P. I., C. Zhang, et al. (2010). "RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF." *Nature* **464**(7287): 427-30.
- Powolny, A. A. and S. V. Singh (2008). "Plumbagin-induced apoptosis in human prostate cancer cells is associated with modulation of cellular redox status and generation of reactive oxygen species." *Pharm Res* **25**(9): 2171-80.
- Prasad, V. S., P. U. Devi, et al. (1996). "Radiosensitizing effect of plumbagin on mouse melanoma cells grown in vitro." *Indian J Exp Biol* **34**(9): 857-8.
- Quintana, E., M. Shackleton, et al. (2008). "Efficient tumour formation by single human melanoma cells." *Nature* **456**(7222): 593-8.
- Raisova, M., A. M. Hossini, et al. (2001). "The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis." *J Invest Dermatol* **117**(2): 333-40.
- Rakosy, Z., L. Vizkeleti, et al. (2007). "EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis." *Int J Cancer* **121**(8): 1729-37.
- Ralph, S. J. and J. Neuzil (2009). "Mitochondria as targets for cancer therapy." *Mol Nutr Food Res* **53**(1): 9-28.
- Ramsay, J. A., L. From, et al. (1995). "bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin." *Mod Pathol* **8**(2): 150-4.

- Rasool, M. and P. Varalakshmi (2006). "Immunomodulatory role of *Withania somnifera* root powder on experimental induced inflammation: An in vivo and in vitro study." *Vascul Pharmacol* **44**(6): 406-10.
- Rasool, M. and P. Varalakshmi (2006). "Suppressive effect of *Withania somnifera* root powder on experimental gouty arthritis: An in vivo and in vitro study." *Chem Biol Interact* **164**(3): 174-80.
- Rauci, A., R. Palumbo, et al. (2007). "HMGB1: a signal of necrosis." *Autoimmunity* **40**(4): 285-9.
- Ravagnan, L., I. Marzo, et al. (1999). "Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore." *Oncogene* **18**(16): 2537-46.
- Ravagnan, L., T. Roumier, et al. (2002). "Mitochondria, the killer organelles and their weapons." *J Cell Physiol* **192**(2): 131-7.
- Reed, J. C. (1994). "Bcl-2 and the regulation of programmed cell death." *J Cell Biol* **124**(1-2): 1-6.
- Reed, J. C. (1996). "Balancing cell life and death: bax, apoptosis, and breast cancer." *J Clin Invest* **97**(11): 2403-4.
- Richardson, P. G., C. S. Mitsiades, et al. (2011). "Inhibition of heat shock protein 90 (HSP90) as a therapeutic strategy for the treatment of myeloma and other cancers." *Br J Haematol*.
- Riedl, S. J. and G. S. Salvesen (2007). "The apoptosome: signalling platform of cell death." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 405-13.
- Rieux-Laucat, F., A. Fischer, et al. (2003). "Cell-death signaling and human disease." *Curr Opin Immunol* **15**(3): 325-31.
- Riker, A. I., S. A. Enkemann, et al. (2008). "The gene expression profiles of primary and metastatic melanoma yields a transition point of tumor progression and metastasis." *BMC Med Genomics* **1**: 13.
- Rizzuto, R., P. Pinton, et al. (2003). "Calcium and apoptosis: facts and hypotheses." *Oncogene* **22**(53): 8619-27.
- Rizzuto, R. and T. Pozzan (2006). "Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences." *Physiol Rev* **86**(1): 369-408.
- Roach, H. I. and N. M. Clarke (2000). "Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate." *J Bone Joint Surg Br* **82**(4): 601-13.
- Rodolfo, M., M. Daniotti, et al. (2004). "Genetic progression of metastatic melanoma." *Cancer Lett* **214**(2): 133-47.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 519-29.
- Ross, D. A., J. H. Laing, et al. (2006). "Long term follow-up of c-myc, p53 and proliferation measurements in malignant melanoma." *Eur J Surg Oncol* **32**(1): 80-4.
- Roy, N., Q. L. Deveraux, et al. (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." *Embo J* **16**(23): 6914-25.
- Rutkowski, D. T. and R. J. Kaufman (2007). "That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress." *Trends Biochem Sci* **32**(10): 469-76.
- Sabatini, D. M., H. Erdjument-Bromage, et al. (1994). "RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs." *Cell* **78**(1): 35-43.
- Saelens, X., N. Festjens, et al. (2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death." *Oncogene* **23**(16): 2861-74.
- Saenz-Santamaria, M. C., J. A. Reed, et al. (1994). "Immunohistochemical expression of BCL-2 in melanomas and intradermal nevi." *J Cutan Pathol* **21**(5): 393-7.

- Sala, E., L. Mologni, et al. (2008). "BRAF silencing by short hairpin RNA or chemical blockade by PLX4032 leads to different responses in melanoma and thyroid carcinoma cells." Mol Cancer Res **6**(5): 751-9.
- Saldana-Caboverde, A. and L. Kos (2010). "Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **23**(2): 160-70.
- Salmon-Chemin, L., A. Lemaire, et al. (2000). "Parallel synthesis of a library of 1,4-naphthoquinones and automated screening of potential inhibitors of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*." Bioorg Med Chem Lett **10**(7): 631-5.
- Salvesen, G. S. and V. M. Dixit (1999). "Caspase activation: the induced-proximity model." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10964-7.
- Samadi, A. K., R. Mukerji, et al. (2010). "A novel RET inhibitor with potent efficacy against medullary thyroid cancer in vivo." Surgery **148**(6): 1228-36; discussion 1236.
- Samadi, A. K., X. Tong, et al. (2010). "Withaferin A, a cytotoxic steroid from *Vassobia breviflora*, induces apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma." J Nat Prod **73**(9): 1476-81.
- Samejima, K., S. Tone, et al. (2001). "CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis." J Biol Chem **276**(48): 45427-32.
- Sander, C. S., F. Hamm, et al. (2003). "Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer." Br J Dermatol **148**(5): 913-22.
- Sandur, S. K., H. Ichikawa, et al. (2006). "Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents." J Biol Chem **281**(25): 17023-33.
- Sandur, S. K., M. K. Pandey, et al. (2010). "5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, a vitamin K3 analogue, suppresses STAT3 activation pathway through induction of protein tyrosine phosphatase, SHP-1: potential role in chemosensitization." Mol Cancer Res **8**(1): 107-18.
- Sata, N., H. Klonowski-Stumpe, et al. (1997). "Menadione induces both necrosis and apoptosis in rat pancreatic acinar AR4-2J cells." Free Radic Biol Med **23**(6): 844-50.
- Sauer, H., H. Diederhagen, et al. (1997). "Calcium-dependence of hydrogen peroxide-induced c-fos expression and growth stimulation of multicellular prostate tumor spheroids." FEBS Lett **419**(2-3): 201-5.
- Sauer, H., M. Wartenberg, et al. (2001). "Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation." Cell Physiol Biochem **11**(4): 173-86.
- Scaffidi, C., S. Fulda, et al. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." Embo J **17**(6): 1675-87.
- Schatton, T. and M. H. Frank (2008). "Cancer stem cells and human malignant melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **21**(1): 39-55.
- Schmitt, C. J., W. W. Franke, et al. (2007). "Homo- and heterotypic cell contacts in malignant melanoma cells and desmoglein 2 as a novel solitary surface glycoprotein." J Invest Dermatol **127**(9): 2191-206.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis." Science **300**(5616): 135-9.
- Selzer, E., H. Schlagbauer-Wadl, et al. (1998). "Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines." Melanoma Res **8**(3): 197-203.
- Sharaf El Dein, O., E. Mayola, et al. (2011). "The Adenine Nucleotide Translocase 2, a Mitochondrial Target for Anticancer Biotherapy." Curr Drug Targets.
- Shevde, L. A. and D. R. Welch (2003). "Metastasis suppressor pathways--an evolving paradigm." Cancer Lett **198**(1): 1-20.

- Shih, Y. W., Y. C. Lee, et al. (2009). "Plumbagin inhibits invasion and migration of liver cancer HepG2 cells by decreasing productions of matrix metalloproteinase-2 and urokinase- plasminogen activator." Hepato Res **39**(10): 998-1009.
- Shimizu, S., T. Kanaseki, et al. (2004). "Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes." Nat Cell Biol **6**(12): 1221-8.
- Shimizu, S., Y. Matsuoka, et al. (2001). "Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells." J Cell Biol **152**(2): 237-50.
- Shuda, M., N. Kondoh, et al. (2003). "Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis." J Hepatol **38**(5): 605-14.
- Singh, D., A. Aggarwal, et al. (2007). "Withania somnifera inhibits NF-kappaB and AP-1 transcription factors in human peripheral blood and synovial fluid mononuclear cells." Phytother Res **21**(10): 905-13.
- Singh, S. K., C. Hawkins, et al. (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." Nature **432**(7015): 396-401.
- Soengas, M. S. and S. W. Lowe (2003). "Apoptosis and melanoma chemoresistance." Oncogene **22**(20): 3138-51.
- Solit, D. and N. Rosen (2010). "Oncogenic RAF: a brief history of time." Pigment Cell Melanoma Res **23**(6): 760-2.
- Solit, D. B., L. A. Garraway, et al. (2006). "BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition." Nature **439**(7074): 358-62.
- Solit, D. B., I. Osman, et al. (2008). "Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma." Clin Cancer Res **14**(24): 8302-7.
- Song, M. S., Y. K. Park, et al. (2001). "Induction of glucose-regulated protein 78 by chronic hypoxia in human gastric tumor cells through a protein kinase C-epsilon/ERK/AP-1 signaling cascade." Cancer Res **61**(22): 8322-30.
- Sparano, J. A., R. I. Fisher, et al. (1993). "Randomized phase III trial of treatment with high-dose interleukin-2 either alone or in combination with interferon alfa-2a in patients with advanced melanoma." J Clin Oncol **11**(10): 1969-77.
- Srinivas, G., L. A. Annab, et al. (2004). "Antisense blocking of BRCA1 enhances sensitivity to plumbagin but not tamoxifen in BG-1 ovarian cancer cells." Mol Carcinog **39**(1): 15-25.
- Srinivas, P., G. Gopinath, et al. (2004). "Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells." Mol Carcinog **40**(4): 201-11.
- Srinivasan, S., R. S. Ranga, et al. (2007). "Par-4-dependent apoptosis by the dietary compound withaferin A in prostate cancer cells." Cancer Res **67**(1): 246-53.
- St Clair, D., Y. Zhao, et al. (2005). "Modulation of skin tumorigenesis by SOD." Biomed Pharmacother **59**(4): 209-14.
- Stan, S. D., E. R. Hahm, et al. (2008). "Withaferin A causes FOXO3a- and Bim-dependent apoptosis and inhibits growth of human breast cancer cells in vivo." Cancer Res **68**(18): 7661-9.
- Stan, S. D., Y. Zeng, et al. (2008). "Ayurvedic medicine constituent withaferin a causes G2 and M phase cell cycle arrest in human breast cancer cells." Nutr Cancer **60 Suppl 1**: 51-60.
- Steeg, P. S. (2003). "Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells." Nat Rev Cancer **3**(1): 55-63.
- Steeg, P. S. (2006). "Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges." Nat Med **12**(8): 895-904.
- Stennicke, H. R., Q. L. Deveraux, et al. (1999). "Caspase-9 can be activated without proteolytic processing." J Biol Chem **274**(13): 8359-62.
- Straus, S. E., M. Sneller, et al. (1999). "An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome." Ann Intern Med **130**(7): 591-601.

- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Susnow, N., L. Zeng, et al. (2009). "Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress." Semin Cancer Biol **19**(1): 42-9.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al. (2001). "X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes." J Biol Chem **276**(29): 27058-63.
- Szabo, I., V. De Pinto, et al. (1993). "The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel." FEBS Lett **330**(2): 206-10.
- Szabo, I. and M. Zoratti (1992). "The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore." J Bioenerg Biomembr **24**(1): 111-7.
- Szabo, I. and M. Zoratti (1993). "The mitochondrial permeability transition pore may comprise VDAC molecules. I. Binary structure and voltage dependence of the pore." FEBS Lett **330**(2): 201-5.
- Szakacs, G., J. P. Annereau, et al. (2004). "Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells." Cancer Cell **6**(2): 129-37.
- Szegezdi, E., S. E. Logue, et al. (2006). "Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis." EMBO Rep **7**(9): 880-5.
- Takata, M., H. Murata, et al. (2010). "Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **23**(1): 64-71.
- Tang, L., V. A. Tron, et al. (1998). "Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma." Clin Cancer Res **4**(8): 1865-71.
- Taylor, R. C., S. P. Cullen, et al. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(3): 231-41.
- Thasni, K. A., S. Rakesh, et al. (2008). "Estrogen-dependent cell signaling and apoptosis in BRCA1-blocked BG1 ovarian cancer cells in response to plumbagin and other chemotherapeutic agents." Ann Oncol **19**(4): 696-705.
- Thiery, J. P. (2002). "Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression." Nat Rev Cancer **2**(6): 442-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-90.
- Thomas, A. J. and C. A. Erickson (2008). "The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest." Pigment Cell Melanoma Res **21**(6): 598-610.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science **267**(5203): 1456-62.
- Thorpe, G. W., C. S. Fong, et al. (2004). "Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(17): 6564-9.
- Tian, F. and S. W. Lee (2010). "X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target in metastatic melanoma." J Invest Dermatol **130**(9): 2169-72.
- Tilak, J. C., S. Adhikari, et al. (2004). "Antioxidant properties of Plumbago zeylanica, an Indian medicinal plant and its active ingredient, plumbagin." Redox Rep **9**(4): 219-27.
- Timar, J., B. Gyorffy, et al. (2010). "Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma: too much for too little?" Clin Exp Metastasis **27**(6): 371-87.
- Trachootham, D., J. Alexandre, et al. (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" Nat Rev Drug Discov **8**(7): 579-91.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-44.
- Twiddy, D. and K. Cain (2007). "Caspase-9 cleavage, do you need it?" Biochem J **405**(1): e1-2.
- Udart, M., J. Utikal, et al. (2001). "Chromosome 7 aneusomy. A marker for metastatic melanoma? Expression of the epidermal growth factor receptor gene and chromosome

- 7 aneusomy in nevi, primary malignant melanomas and metastases." Neoplasia **3**(3): 245-54.
- Ueda, S., H. Masutani, et al. (2002). "Redox control of cell death." Antioxid Redox Signal **4**(3): 405-14.
- Uong, A. and L. I. Zon (2010). "Melanocytes in development and cancer." J Cell Physiol **222**(1): 38-41.
- van Kempen, L. C., K. E. de Visser, et al. (2006). "Inflammation, proteases and cancer." Eur J Cancer **42**(6): 728-34.
- van Loo, G., P. Schotte, et al. (2001). "Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation." Cell Death Differ **8**(12): 1136-42.
- Vaquero, E. C., M. Edderkaoui, et al. (2004). "Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells." J Biol Chem **279**(33): 34643-54.
- Vaux, D. L. and J. Silke (2003). "Mammalian mitochondrial IAP binding proteins." Biochem Biophys Res Commun **304**(3): 499-504.
- Veierod, M. B., H. O. Adami, et al. (2010). "Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(1): 111-20.
- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, et al. (2000). "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." Cell **102**(1): 43-53.
- Verrax, J., J. Cadrobbi, et al. (2004). "Ascorbate potentiates the cytotoxicity of menadione leading to an oxidative stress that kills cancer cells by a non-apoptotic caspase-3 independent form of cell death." Apoptosis **9**(2): 223-33.
- Verrax, J., H. Taper, et al. (2008). "Targeting cancer cells by an oxidant-based therapy." Curr Mol Pharmacol **1**(1): 80-92.
- Verrier, F., A. Deniaud, et al. (2004). "Dynamic evolution of the adenine nucleotide translocase interactome during chemotherapy-induced apoptosis." Oncogene **23**(49): 8049-64.
- Vieira, H. L., A. S. Belzacq, et al. (2001). "The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxynitrite, and 4-hydroxynonenal." Oncogene **20**(32): 4305-16.
- Volk, T., M. Hensel, et al. (1997). "Transient Ca²⁺ changes in endothelial cells induced by low doses of reactive oxygen species: role of hydrogen peroxide." Mol Cell Biochem **171**(1-2): 11-21.
- Vucic, D., H. R. Stennicke, et al. (2000). "ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas." Curr Biol **10**(21): 1359-66.
- Wang, C. C., Y. M. Chiang, et al. (2008). "Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells." Cancer Lett **259**(1): 82-98.
- Wang, E., M. C. Panelli, et al. (2004). "Melanoma-restricted genes." J Transl Med **2**(1): 34.
- Wang, J. C. and J. E. Dick (2005). "Cancer stem cells: lessons from leukemia." Trends Cell Biol **15**(9): 494-501.
- Warr, M. R. and G. C. Shore (2008). "Unique biology of Mcl-1: therapeutic opportunities in cancer." Curr Mol Med **8**(2): 138-47.
- Weeraratna, A. T. (2005). "A Wnt-er wonderland--the complexity of Wnt signaling in melanoma." Cancer Metastasis Rev **24**(2): 237-50.
- Wei, M. C., W. X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.
- Weigelt, B., A. M. Glas, et al. (2003). "Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15901-5.

- Weigelt, B., Z. Hu, et al. (2005). "Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer." Cancer Res **65**(20): 9155-8.
- Wellbrock, C., P. Fischer, et al. (1999). "PI3-kinase is involved in mitogenic signaling by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xiphophorus melanoma receptor kinase in fish melanoma." Exp Cell Res **251**(2): 340-9.
- Weydert, C., B. Roling, et al. (2003). "Suppression of the malignant phenotype in human pancreatic cancer cells by the overexpression of manganese superoxide dismutase." Mol Cancer Ther **2**(4): 361-9.
- Whiteman, D. C., X. P. Zhou, et al. (2002). "Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma." Int J Cancer **99**(1): 63-7.
- Widlak, P., L. Y. Li, et al. (2001). "Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I." J Biol Chem **276**(51): 48404-9.
- Wolter, K. G., M. Verhaegen, et al. (2007). "Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins." Cell Death Differ **14**(9): 1605-16.
- Wondrak, G. T. (2009). "Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities." Antioxid Redox Signal **11**(12): 3013-69.
- Xu, K. H. and D. P. Lu (2010). "Plumbagin induces ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia cells in vivo." Leuk Res **34**(5): 658-65.
- Xu, L., S. S. Shen, et al. (2008). "Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases." Mol Cancer Res **6**(5): 760-9.
- Xu, Y., S. Huang, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation." J Biol Chem **281**(13): 8788-95.
- Yamaura, M., J. Mitsushita, et al. (2009). "NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression." Cancer Res **69**(6): 2647-54.
- Yang, C. S. and X. Wang (2010). "Green tea and cancer prevention." Nutr Cancer **62**(7): 931-7.
- Yang, H., G. Shi, et al. (2007). "The tumor proteasome is a primary target for the natural anticancer compound Withaferin A isolated from "Indian winter cherry"." Mol Pharmacol **71**(2): 426-37.
- Yang, J. and A. Richmond (2001). "Constitutive I κ B kinase activity correlates with nuclear factor- κ B activation in human melanoma cells." Cancer Res **61**(12): 4901-9.
- Ye, H., C. Cande, et al. (2002). "DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor." Nat Struct Biol **9**(9): 680-4.
- Yu, D., S. S. Wang, et al. (1994). "c-erbB-2/neu overexpression enhances metastatic potential of human lung cancer cells by induction of metastasis-associated properties." Cancer Res **54**(12): 3260-6.
- Yu, Y., A. Hamza, et al. (2010). "Withaferin A targets heat shock protein 90 in pancreatic cancer cells." Biochem Pharmacol **79**(4): 542-51.
- Yuan, J., S. Shaham, et al. (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme." Cell **75**(4): 641-52.
- Zaid, H., S. Abu-Hamad, et al. (2005). "The voltage-dependent anion channel-1 modulates apoptotic cell death." Cell Death Differ **12**(7): 751-60.
- Zamora, M., M. Granell, et al. (2004). "Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells." FEBS Lett **563**(1-3): 155-60.

- Zamzami, N., C. El Hamel, et al. (2000). "Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis." Oncogene **19**(54): 6342-50.
- Zamzami, N., N. Larochette, et al. (2005). "Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1478-80.
- Zamzami, N., P. Marchetti, et al. (1995). "Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death." J Exp Med **182**(2): 367-77.
- Zhang, D. W., J. Shao, et al. (2009). "RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis." Science **325**(5938): 332-6.
- Zhao, Y., K. K. Kinningham, et al. (2001). "Overexpression of MnSOD protects murine fibrosarcoma cells (FSa-II) from apoptosis and promotes a differentiation program upon treatment with 5-azacytidine: involvement of MAPK and NFkappaB pathways." Antioxid Redox Signal **3**(3): 375-86.
- Zhou, X. P., O. Gimm, et al. (2000). "Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation." Am J Pathol **157**(4): 1123-8.
- Zhuang, L., C. S. Lee, et al. (2007). "Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma." Mod Pathol **20**(4): 416-26.
- Zhuang, L., R. A. Scolyer, et al. (2009). "Expression of glucose-regulated stress protein GRP78 is related to progression of melanoma." Histopathology **54**(4): 462-70.
- Zimmermann, A. K., F. A. Loucks, et al. (2007). "Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria." J Biol Chem **282**(40): 29296-304.
- Zoratti, M. and I. Szabo (1995). "The mitochondrial permeability transition." Biochim Biophys Acta **1241**(2): 139-76.
- Zorov, D. B., C. R. Filburn, et al. (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med **192**(7): 1001-14.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova, et al. (2006). "Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 509-17.

ANNEXE

Revue : The Adenine Nucleotide Translocase 2, a Mitochondrial Target for Anticancer Biotherapy.

Sharaf El Dein O, Mayola E, Chopineau J, Brenner C.

Curr Drug Targets. 2011 Jan 26. (Epub ahead of print)

La protéine mitochondriale ANT est impliquée dans le déclenchement de la perméabilisation des membranes mitochondriales (PMM) et la formation d'un pore létal suite au déclenchement d'une signalisation apoptotique. Les résultats de l'étude de l'isoforme ANT4 dans l'apoptose montrent que les isoformes interagissent avec des partenaires différents pour favoriser la fonction translocateur ADP/ATP ou la fonction pore létal (Gallerne, Touat et al. 2010). L'isoforme anti-apoptotique ANT2 est surexprimée dans des lignées cancéreuses et des tissus tumoraux (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006). Son invalidation par ARN interférence permet la sensibilisation de cellules cancéreuses à l'apoptose *in vitro* (Le Bras, Borgne-Sanchez et al. 2006) et *in vivo* (Jang, Choi et al. 2008). L'ANT et plus particulièrement ANT2 sont des cibles potentielles pour induire l'apoptose des cellules tumorales.

Nous rappelons ici le rôle d'ANT dans la signalisation apoptotique. Nous présentons les molécules et peptides capables d'interagir avec ANT et d'induire sa fonction pore pour sensibiliser les cellules cancéreuses à l'apoptose. Enfin, nous discutons l'intérêt de la modulation de l'expression d'ANT2 comme stratégie thérapeutique anti-tumorale.