

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

PAR

GEOFFROY BÉLANGER

**ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE NOUVEAUX COMPOSÉS DE TYPE
HYBRIDE œSTROGÈNE-CISPLATINE POUR LE TRAITEMENT DES
CANCERS DU SEIN, DE L'OVaire ET DE L'UTÉRUS**

NOVEMBRE 2008

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord mon directeur de recherche, Dr. Éric Asselin, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières, qui m'a fait découvrir le monde de la recherche. Merci d'avoir cru en moi et m'avoir permis de réaliser ce mémoire de maîtrise. Sa grande disponibilité et son support durant mon cheminement académique furent très appréciés. Je remercie également mon codirecteur de recherche, Dr. Gervais Bérubé, professeur à l'Université du Québec à Trois-Rivières, pour m'avoir aidé à mieux comprendre la chimie. Merci pour son dynamisme, son support et sa grande disponibilité. Je remercie également les membres de son équipe qui ont participé à la synthèse de molécules testées, particulièrement Caroline Descôteaux et Josée Provancher-Mandville. Je remercie tout spécialement mes collègues de laboratoire pour leur aide et leur esprit d'équipe. Plus particulièrement, je désire remercier Sophie Parent, Valérie Leblanc et Céline Van Themsche pour leur aide technique, leur compétence et leur expertise. Finalement, je tiens à remercier ma copine Marie-Claude Gagnon pour ses encouragements, son support et sa patience.

À vous tous, merci.

RÉSUMÉ

En 2007, le cancer le plus couramment diagnostiqué au Canada chez la femme est le cancer du sein. Le cisplatine est l'agent chimiothérapeutique le plus utilisé pour le traitement de différents cancers. Cet agent occasionne de nombreux effets secondaires qui ne sont pas associés au cancer. Il est donc important de développer de nouvelles molécules qui ciblent les cellules cancéreuses. Le récepteur à l'œstrogène est une cible qui a attiré beaucoup d'attention au cours des dernières années. Il est exprimé dans plusieurs types de cancers : de 60 à 70 % des cancers du sein, de 70 à 73 % des cancers de l'utérus et 61 % des cancers de l'ovaire. Des nouvelles familles de molécules hybrides 17β -œstradiol-platine(II) (E2-Pt(II)) ciblant les cellules cancéreuses ont été synthétisées. Ces molécules ont été testées pour leur potentiel chimiothérapeutique. La partie cytotoxique Pt(II) des nouveaux agents chimiothérapeutiques est liée au 17β -œstradiol par une chaîne alkyl de longueur variable en position 16 sur le noyau stéroïdien. L'objectif de ce projet était de déterminer les effets cytotoxiques de ces molécules en utilisant des cellules cancéreuses du sein hormonodépendantes à l'œstrogène, cellules cancéreuses qui expriment le RE α (RE α +) et des cellules cancéreuses du sein hormonoindépendante de l'œstrogène, cellules cancéreuses qui n'expriment pas le RE α (RE α -). Les molécules ont montré une excellente affinité pour les isoformes α et β du RE lors de l'étude de liaison des molécules aux RE α et RE β . L'activité biologique des molécules a été évaluée *in vitro* dans un premier temps par essai de prolifération cellulaire, dans un second temps par immunobuvardage des protéines recueillies après un traitement de 24 heures et dans un troisième temps par l'observation au microscope des cellules en apoptose colorées avec le colorant Hoechst 33258 après un traitement de 24 heures. La plupart des lignées cellulaires du cancer du sein ont montré une inhibition de prolifération cellulaire lorsqu'elles étaient en contact avec les molécules. Les molécules E₂-Pt(II) ont montré une efficacité d'inhibition de prolifération de trois à dix fois plus importante que le cisplatine. L'étude des protéines recueillies révélées par immunobuvardage et l'observation au microscope des cellules

après un traitement de 24 heures ont confirmé que les molécules avaient le pouvoir d'induire les mécanismes d'apoptose. Un hybride E₂-Pt(II) a montré jusqu'à 80% de cellules mortes par apoptose, contre seulement 50% pour le cisplatine. L'activité biologique des molécules a été évaluée *in vivo* à l'aide de souris athymiques (NU/NU) xénogreffées avec des cellules MCF-7 (RE α +) et MDA-MB-468 (RE α -) et de rate dont le cancer avait été induit par injection d'un carcinogène, le N-nitrosométhylurée (NMU). Les hybrides E₂-Pt(II) ont montré une réduction de la taille des tumeurs que présentaient les souris et les rates similaire au cisplatine, mais avec une plus faible concentration. Il convient de noter que les animaux traités avec les molécules E₂-Pt(II) n'ont pas présenté d'effet secondaire en comparaison aux traitements au cisplatine, dont les animaux traités présentaient une perte de poids et une déshydratation. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les molécules E₂-Pt(II) ont un grand potentiel pour le traitement des cancers du sein, en montrant une meilleure efficacité et sélectivité que les agents cytotoxiques actuels.

Mots clés : 17 β -œstradiol, cancers hormonodépendants, cancer du sein, cancer de l'utérus, cancer de l'ovaire, récepteur à l'œstrogène, cisplatine, œstrogène, chimiothérapie et apoptose.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	II
RÉSUMÉ	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	XII
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
1 Introduction	1
1.1 Les œstrogènes	2
1.1.1 Les récepteurs à l'œstrogène α et β	5
1.1.2 Structures et domaines fonctionnels des REs α et β	6
1.1.3 La voie génomique.....	8
1.1.4 La voie non génomique.....	10
1.1.5 Les REs et le cancer	14
1.2 Les cancers hormonodépendants.....	15
1.2.1 Le cancer de l'utérus	15
1.2.1 Le cancer du sein.....	17
1.2.3 Le cancer de l'ovaire.....	19

1.3 Les traitements du cancer	21
1.3.1 La chirurgie	23
1.3.2 La radiothérapie	24
1.3.3 L'hormonothérapie.....	25
1.3.4 La thérapie biologique	27
1.3.5 La chimiothérapie.....	28
1.4 Les agents chimiothérapeutiques.....	29
1.4.1 Le cisplatine ; historique et mode d'action	30
1.4.2 Problèmes reliés aux agents chimiothérapeutiques d'aujourd'hui.....	34
1.4.3 Stratégies pour contrecarrer la chimiorésistance.....	35
1.5 L'apoptose et ses acteurs	38
1.5.1 L'activation et la cascade des caspases	39
1.5.2 L'implication de PARP dans l'apoptose	41
1.6 La contrepartie de l'apoptose : les « sentiers de survie cellulaire »	41
1.6.1 La voie de signalisation PI3K/Akt	42
1.6.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose.....	43
1.7 Présentation des molécules	48
1.7.1 Travaux antérieurs.....	49
1.8 Buts du projet de maîtrise.....	50
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	52
2.1 Culture cellulaire.....	52
2.2 Présentation des structures des composés anticancéreux testés	52
2.3 Test d'affinité du REα et du REβ.....	55
2.4 Évaluation de l'effet des composés hybrides sur la prolifération des cellules de carcinome mammaire par essais de prolifération (MTT)	57

2.5 Évaluation des voies de signalisation cellulaire activées par les molécules testées.....	58
2.6 Extraction des protéines et analyse par Western Blot.....	58
2.7 Évaluation de l'activation du récepteur alpha	59
2.8 Effets des molécules d'intérêt sur des tumeurs <i>in vivo</i>	62
2.8.1 Les souris	63
2.8.2 Les rates	63
2.9 Analyse statistique.....	64
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	65
3.1 Affinité des molécules testées pour les récepteurs à l'œstrogène.....	65
3.2 Inhibition de la prolifération des cellules REα+ et REα- induite par les molécules testées.....	67
3.3 Évaluation des voies de signalisation cellulaire activées par les molécules testées.....	72
3.4 Évaluation de la mort cellulaire.....	81
3.5 Évaluation de l'activation du récepteur alpha	82
3.6 Effets des molécules d'intérêt sur des tumeurs <i>in vivo</i>	85
CHAPITRE 4 DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	89
BIBLIOGRAPHIE	113
ANNEXE A	138

ANNEXE B	139
ANNEXE C	140
ANNEXE D	141
ANNEXE E	142
ANNEXE F	144
ANNEXE G	145

LISTE DES TABLEAUX

1.1 : Description des différents grades de tumeurs selon leur différenciation cellulaire.....	21
1.2 : Description des différents éléments de base pour le système de classification TNM.....	23
3.1 : EC50 de l'affinité des molécules hybrides 4a-c , du cisplatine (2) et de l'E ₂ (1) avec le RE α et le RE β	67
3.2 : IC50 des molécules hybrides 4a-d et cisplatine (2) pour 72 heures tirés de la figure 3.2.C.	69
3.3 : IC50 des molécules hybrides 5a-e pour 72 heures tirés de la figure 3.3.C.....	72

LISTE DES FIGURES

1.1 : Présentation de la structure du 17 β -œstradiol (1)	2
1.2 : Diagramme décrivant les voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes	4
1.3 : Représentation schématique des domaines structuraux et fonctionnels des REs α et β et de leur homologie.....	7
1.4 : Représentation schématique des voies génomiques et non génomiques induites par les REs.....	11
1.5 : Image des glandes endométriales et structure schématique de l'utérus au cours du cycle menstruel.....	16
1.6 : Diagramme décrivant les hormones impliquées dans le développement mammaire et structure schématique du sein humain adulte.....	18
1.7 : Représentation schématique des différentes structures de l'ovaire durant le cycle menstruel.....	20
1.8 : Présentation de la structure chimique du cisplatine (2)	30
1.9 : Diagramme décrivant les différents mécanismes d'action utilisés par les agents chimiothérapeutiques	32
1.10 : Schéma représentant les différents acteurs de l'apoptose et des sentiers de la survie cellulaire	47
1.11 : Représentation schématique des structures générales des trois familles de molécules développées.....	49
2 1 : Structure des molécules de référence, le E ₂ (1), le cisplatine (2) et l'hybride E ₂ -Pt(II) de la deuxième famille (3).....	54
2 2 : Stuctures des molécules hybrides E ₂ -Pt(II) de la première famille (4a-d) testées dans le cadre de ce projet de maîtrise.....	54
2 3 : Structure des molécules hybrides E ₂ -Pt(II) de la troisième famille (5a-e) testées dans le cadre de ce projet de maîtrise.....	55
2 4 : Principe schématisé du test de l'affinité	56
2 5 : Carte schématisée du plasmide Translucent ERE Reporter Vector, 4.8 Kb	60

3.1 : Affinité de liaison au RE α et au RE β du 17 β -oestradiol (1), des molécules hybrides 4a-c et du cisplatine (2)	66
3.2 : Effet des molécules hybrides 4a-d en comparaison avec le cisplatine (2) sur la prolifération cellulaire	68
3.3 : Effet des molécules hybrides 5a-e sur la prolifération cellulaire.....	71
3.4 : Abondance de la protéine Akt.....	74
3.5 : Abondance de la protéine P-Akt.....	75
3.6 : Abondance de la protéine XIAP.....	77
3.7 : Abondance de la protéine PARP Clivée	78
3.8 : Expression de la caspase-3 clivée, de la caspase-7 clivée et de la caspase-9 clivée.....	80
3.9 : Effet apoptotique des molécules hybrides 3 et 4c et le cisplatine (2).....	82
3.10 : Luminescence observée avec l'ajout d'œstrogène (1) et de l'hybride 4c	84
3.11 : Effet antitumoral du cisplatine (2) et de l'hybride 4c sur des lignées cancéreuses du sein xenogreffées sur des souris athymiques	87
3.12 : Effet antitumoral du cisplatine (2) et de l'hybride 4b sur des carcinomes mammaires de rates induits par injection de NMU.....	88

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

α	alpha
ADN	acide désoxyribonucléique
AF-1	domaine de transactivation indépendant de l'hormone
AF-2	domaine de transactivation dépendant de l'hormone
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Alis	inhibiteurs de l'aromatase
AMP _c	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	« activator protein-1 », protéine activatrice-1
APAF-1	apoptotic protease activating factor 1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNpol II	acide ribonucléique polymérase II
Asp	résidus aspartates
ATCC	« American Type Culture Collection »
ATF-2	« activation transcription factor-2 »
ATP7B	protéine «copper-transporting P-type adénosine triphosphate
β	bêta
BGS	« Bovin Growth Serum », sérum de croissance bovin
BIR	« Baculovirus Inhibitor Repeat »
BRCA1	« breast cancer 1 »
BRCA2	« breast cancer 2 »
BRUCE	« BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme »
°C	degré Celcius
CARD	domaine de recrutement des caspases
caspases	« cysteinyl aspartate-specific proteases »
c-fos	protooncogène important dans régulation de la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et le processus de transformation cellulaire

cm ²	centimètre carré
CO ₂	dioxyde de carbone
COOH	carboxylée
COX-1	cyclo-oxygénase 1
COX-2	cyclo-oxygénase 2
CTL	lymphocytes cytotoxiques T
CTR1	protéine « copper transporter 1 »
CREB	« cAMP response element-binding »
DBD	« DNA Binding Domain », domaine de fixation de l'ADN
D-box	« distal box »
D.C.	traitement au « dextran charcoal »
DHEA	déhydroépiandrostérone
DNA-PK	protéine kinase dépendante de l'ADN
dsRNA	« double-stranded RNA »
E ₁	œstrone
E ₂	œstrogène, 17 β -œstradiol
E ₃	oestriole
EA	enzyme accepteur
EC ₅₀	concentration effective à 50 %
ECG	électrocardiogramme
ED	enzyme donneur
Elk-1	« E-26-like protein 1 »
E ₂ -Pt(II)	molécule hybride 17 β -œstradiol-platine(II)
ERE	élément de réponse à l'œstrogène
ERIN	« ER action indicator »
et al.	lorsqu'il y a plus de trois auteurs de l'ouvrage
EtOH	éthanol
FIGO	Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique
FSC	facteur de stimulation des colonies
γ	gamma
G	force gravitationnelle de la terre

G α	sous-unité alpha de la protéine G
G $\beta\gamma$	sous-unités bêta et gamma de la protéine G
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GPCR	famille des récepteurs couplés à une protéine G
GPR30-	n'exprime pas le récepteur GPR30
GPR30+	exprime le récepteur GPR30
GSH	glutathione
h	heure
HCl	acide chlorhydrique
HER	« human epidermal growth factor receptor-2 »
HRP	« horse radish peroxidase »
IAPs	inhibiteurs de caspases
IC ₅₀	concentration d'inhibition à 50 %
I κ B	inhibiteur de NF- κ B
IKK	protéine I κ B-Kinase
i.p.	intrapéritonéale
i.v.	intraveineux
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
kg	kilogramme
LDB	«Ligand Domain Binding», domaine de liaison du ligand
M	molaire
MAPK	« mitogen-activating protein kinase », protéines kinases activées par des mitogènes
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	millimolaire
MT	métallothionéine
MTT	3-(4,5-diméthyle tyazol-2-yl)-2,5 diphényltetrazolium bromide

NaCl	chlorure de sodium
NCI	National Cancer Institute
NF-κB	« nuclear factor-kappa B »
NH ₂	aminée
NK	« natural killer »
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
NMU	N-nitrosométhylurée
Nu/Nu	mutation sur les deux allèles du gène Foxn1 causant une déficience dans le développement et la fonction du thymus
p85 α	sous-unité régulatrice de PI3K
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
PARP	polyadénosine diphospho-ribose polymérase
PAX2	gène «paired-box 2»
P-box	« proximal box »
PBS	tampon phosphate salin
PGE2	prostaglandine E2
phase G ₀	phase G ₀ du cycle cellulaire
phase G1	phase G1 du cycle cellulaire
phase G ₂	phase G2 du cycle cellulaire
phase M	phase M du cycle cellulaire
phase S	phase S du cycle cellulaire
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKB	protéine kinase B
protéine G	protéine transductrice de signaux par fixation du nucléotide guanine
RE	récepteur à l'œstrogène
RE α -	cellules n'exprimant pas le RE α
RE α +	cellules exprimant le RE α
RE α	isoforme α du récepteur à l'œstrogène

RE β	isoforme β du récepteur à l'œstrogène
RE β -	cellules n'exprimant pas le RE β
RE β +	cellules exprimant le RE β
REA	répresseur de l'activité du récepteur à l'œstrogène
REm	récepteur à l'œstrogène membranaire
REs	plusieurs récepteurs à l'œstrogène
RING	« really Interesting New Gene »
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SEM	erreur standard de la moyenne
shRNA	« short hairpin RNA », ARN en forme d'épingle à cheveux
siRNAs	« small interfering RNAs »
Smac/DIABLO	« Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI »
Sp1	« specificity protein 1 »
STAT	« signal transducers and activators of transcription protein »,
SRF	« serum response factor », facteur de réponse sérique
T	testostérone
TAB1	« TAK1-binding protein 1 »
TAK1	« transforming growth factor-beta-activated kinase 1 »
TNF	« tumor necrosis factor »
TNM	système de classification « tumor lymph nodes metastasis »
μ g	microgramme
UICC	union internationale contre le cancer
μ l	microlitre
μ M	micromolaire
V	volt
XAF1	« XIAP-associated factor 1 »
XIAP	IAP lié au chromosome X
%	pourcentage

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1 Introduction

L'œstrogène (E₂ (1)) (le chiffre en caractère gras fait référence à la structure présentée à la figure 1.1), nommé aussi le 17 β -œstradiol, est une hormone importante chez la femme. Normalement, l'E₂ (1) influence chez les mammifères plusieurs processus physiologiques et systèmes importants, tels la reproduction (Heffner, 2003), la densité osseuse (Shearman et al., 2004) et le système cardiovasculaire (Pearce and Jordan, 2004). L'E₂ (1) est par contre aussi impliqué dans le développement et la progression de nombreux dysfonctionnements de l'organisme, dont l'ostéoporose (Rossouw et al., 2002, Shearman et al., 2004), les maladies neurodégénératives (Shulman, 2002, Kompoliti, 2003, Sherwin, 2003), les maladies cardiovasculaires (Pollak et al., 2004, Shearman et al., 2003) et de nombreux types de cancers, dont le cancer du sein (Henderson and Feigelson, 2000, Yue et al., 2005, Deroo and Korach, 2006), le cancer des ovaires (Syed et al., 2001), le cancer colorectal (Foley et al., 2000), le cancer de la prostate (Bosland, 2000, Carruba, 2007) et le cancer de l'endomètre (Grady et al., 1995, Yarbro, 2005). Au Canada, le cancer du sein est le type de cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme et la deuxième plus importante cause de décès par cancer chez la femme. Le cancer de l'endomètre se situe au neuvième rang en importance parmi les causes de décès par cancer chez la femme. Le cancer des ovaires est la cinquième cause de décès par cancer chez la femme. La somme des pourcentages de décès estimés en 2007 pour le cancer du sein (15,5 %), de l'ovaire (5,0 %) et de l'endomètre (2,2 %) atteint 22,7 %. Cette somme est à peine inférieure au pourcentage de décès du cancer du poumon (26,0 %) (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007). À eux seuls, ces cancers hormonodépendants (voir section 1.2) constituent une cause majeure de problèmes de santé chez la femme.

1.1 Les œstrogènes

L' E_2 (1) dont la structure est présentée à la figure 1.1, est une hormone stéroïdienne qui régule la croissance, la différenciation et la fonction de certains tissus du corps humain (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Les précurseurs des hormones stéroïdiennes sont les androgènes. Ces précurseurs sont produits par les organes qui synthétisent les stéroïdes. Ces organes sont les testicules chez l'homme et les ovaires chez la femme, ainsi que les glandes surrénales chez les deux sexes. L'œstrone (E_1) et l'œstradiol (E_2) (1), sont les œstrogènes les plus puissants et sont essentiellement synthétisés et sécrétés par les ovaires chez la femme (Heffner, 2003). L'apport d'œstrogène par les glandes surrénales à l'organisme est faible, sauf dans le cas de la femme ménopausée, où la production d'androgènes par les glandes surrénales peut devenir substantielle (Heffner, 2003). Les androgènes peuvent être convertis directement en œstrone au niveau de la peau et du tissu adipeux. Cette conversion est considérée comme une source importante d'œstrogène chez les femmes obèses et implique de considérer l'obésité comme un facteur de risque des cancers du sein, de l'utérus et des ovaires, comme il sera mentionné aux sections 1.2.1, 1.2.2 et 1.2.3. L'œstriole (E_3) est un œstrogène moins actif que les deux précédents.

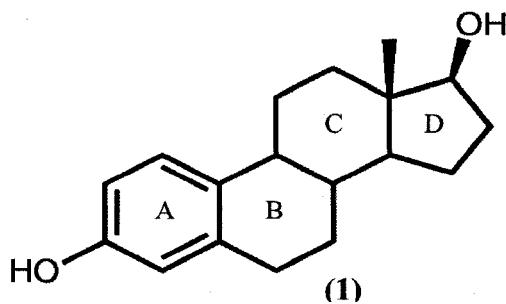


FIGURE 1.1 : Présentation de la structure du 17β -œstradiol (1) (Perron et al., 2005). La structure tétracyclique de l'œstrogène est composée de trois cycles à 6 carbones (A, B et C) et un cycle à 5 carbones (D). Le cycle A est aromatique. Les cycles A et D possèdent chacun un groupement OH. Le chiffre en caractère gras sous la structure chimique sert à différencier les différentes molécules présentées dans ce travail.

L' E_3 est synthétisé au niveau des tissus périphériques et n'est pas d'origine ovarienne. Cet œstrogène est synthétisé à partir des androgènes dans le placenta ainsi qu'à partir de l' E_1 et de l' E_2 (1) dans les tissus périphériques (Heffner, 2003).

La figure 1.2 décrit la synthèse de l' E_2 (1) à partir du cholestérol. Tous les organes producteurs de stéroïdes synthétisent le cholestérol à partir d'acétate (Heffner, 2003). Le placenta n'ayant pas la machinerie cellulaire nécessaire pour synthétiser le cholestérol à partir d'acétate, il dépend des androgènes produits par les glandes surrénales maternelles et fœtales pour produire l' E_2 (1) (Heffner, 2003). L' E_2 (1) est produit généralement à partir du cholestérol, selon plusieurs modifications enzymatiques (voir la figure 1.2) (Heffner, 2003). La plupart des enzymes servant dans la synthèse des stéroïdes appartiennent au groupe des cytochromes P450 oxydases (Heffner, 2003). Comme on peut l'observer sur la figure 1.2, la pregnénolone est produite directement à partir du cholestérol grâce à l'enzyme de clivage latéral, la protéine P450_{sc}. Par la suite, la synthèse de l' E_2 (1) se fait selon deux voies alternatives : la voie de la progestérone et la voie de la 17 α -hydroxypregnénolone. La voie de la progestérone est initiée par la 3 β -OH-déhydrogénase, qui produit la progestérone à partir de la pregnénolone. La progestérone est ensuite modifiée par l'enzyme 17 α -hydroxylase pour former la 17 α -hydroxyprogestérone, qui est ensuite transformée en androstenedione par la 17,20-ligase. La voie de la 17 α -hydroxypregnénolone est initiée à partir de la prégnénolone par l'enzyme 17 α -hydroxylase. La 17 α -hydroxypregnénolone peut rejoindre la voie de la progestérone en étant modifiée par la 3 β -OH-déhydrogénase, ce qui formera la 17 α -hydroxyprogestérone. De plus, la 17 α -hydroxypregnénolone peut former la déhydroépiandrostérone (DHEA) en subissant une transformation par l'enzyme 17,20-ligase. La DHEA peut être transformée en androstenediol par l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase. L'action de l'enzyme 17 β -hydroxystéroïde déhydrogénase peut être réversible et former la DHEA à partir de l'androstenediol. La DHEA et l'androstenediol rejoignent la voie de la progestérone par l'action de l'enzyme 3 β -OH-déhydrogénase, ce qui transformera la DHEA en androstenedione et l'androstenediol en testostérone (T). L'androstenedione peut former la T par l'action de

la 17β -hydroxystéroïde déhydrogénase et inversement. L'androstènedione et la T forment respectivement l'œstrone (E₁) et l'œstradiol (1) par l'action d'aromatase. De plus, l'E₁ peut former l'E₂ par l'action de la 17β -hydroxystéroïde déhydrogénase et inversement (voir la figure 1.2) (Heffner, 2003).

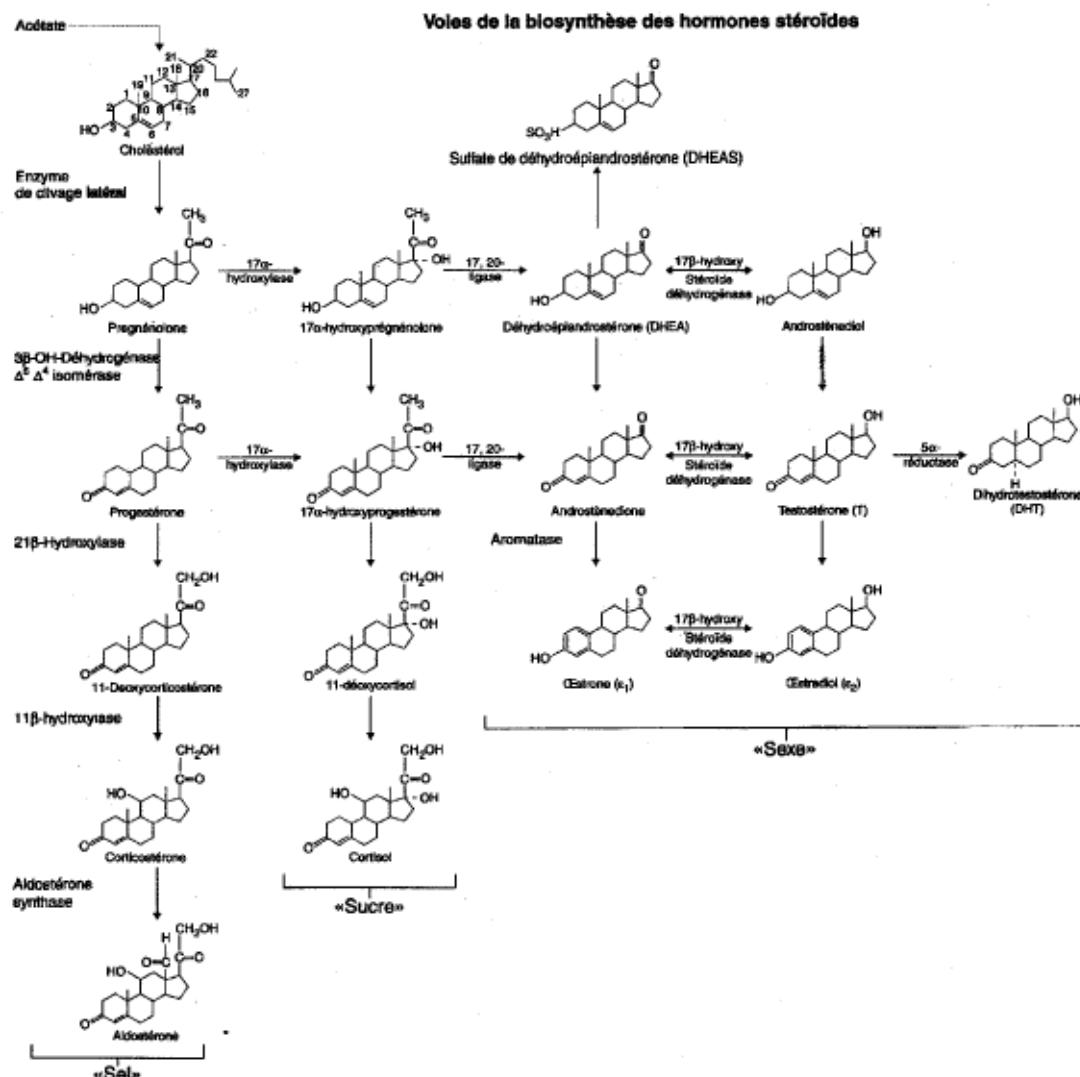


FIGURE 1.2 : Diagramme décrivant les voies de biosynthèse des hormones stéroïdiennes (Heffner, 2003, page 14). L'œstradiol est synthétisé à partir du cholestérol par une succession de modifications enzymatiques réversibles et irréversibles. Outre l'œstradiol, d'autres hormones telles l'œstrone, la testostérone, le cortisol et l'aldostérone peuvent être synthétisées grâce à cette même voie de synthèse.

1.1.1 Les récepteurs à l'œstrogène α et β

Les effets biologiques des E₂ (1) sont généralement transposés via les récepteurs à l'œstrogène (REs) α et β (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Ces récepteurs font partie de la super famille des récepteurs nucléaires (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). En 1986, deux groupes de recherche ont cloné pour la première fois l'isoforme α du RE (RE α) (Nilsson et al., 2001, Green et al., 1986, Greene et al., 1986, Walter et al., 1985), qui est constitué de 595 acides aminées et a un poids moléculaire de 66,2 kDa (Greene et al., 1986). Dix ans plus tard, l'isoforme β du RE (RE β) a été cloné à partir de la prostate d'un rat (Kuiper et al., 1996). Le ER β est une protéine de 530 acides aminés avec un poids moléculaire de 59,2 kDa (Ogawa et al., 1998). Certains types cellulaires peuvent co-exprimer les deux isoformes des ERs, comme les cellules du cerveau, des seins, des os, du tractus gastro-intestinal, du système cardiovasculaire, du tractus urogénital et de la prostate (Pearce and Jordan, 2004, Gustafsson, 1999).

Depuis la découverte de ces deux récepteurs, plusieurs variantes du RE β ont été décrites (Nilsson et al., 2001). Les différentes variantes du RE β sont dues à une extension ou une amputation en acides aminés. Une extension ou une amputation s'opère soit à l'extrémité NH₂, soit à l'extrémité COOH ou dans le domaine de liaison du ligand (LDB) (Nilsson et al., 2001, Leygue et al., 1998a, Hanstein et al., 1999). Différentes variantes du RE α ont été décrites, mais aucun rôle biologique et physiologique n'a été mis en évidence (Nilsson et al., 2001, Zhang et al., 1996, Taylor et al., 1998). Les variantes du RE α sont généralement le résultat d'une amputation dans la séquence d'acides aminés qui peut s'opérer sensiblement dans les mêmes régions que le RE β (Nilsson et al., 2001, Zhang et al., 1996). Les conséquences d'amputation ou d'extension dans la séquence d'acides aminés des RE α et RE β sont tributaires de la fonction de cette séquence (Nilsson et al., 2001, Zhang et al., 1996).

1.1.2 Structures et domaines fonctionnels des REs α et β

Les REs font partie de la super famille des récepteurs nucléaires hormonaux stéroïde/thyroïde, puisque ces récepteurs montrent une architecture structurale similaire (Evans, 1988). Les REs sont divisés en six domaines : A, B, C, D, E et F (voir la figure 1.3) (Shibata et al., 1997, Nilsson et al., 2001). Ces domaines composent les régions fonctionnelles indépendantes des REs (Nilsson et al., 2001). De plus, le RE α et le RE β ont une homologie de structure pour ces domaines (Ogawa et al., 1998). Comme le montre la figure 1.3, les domaines C et E/F montrent respectivement des homologies de structure de 96 % et de 53 % entre le RE α et le RE β (Ogawa et al., 1998). Les domaines A/B et D montrent une homologie de structure de 30 % entre le RE α et le RE β (Ogawa et al., 1998).

L'extrémité NH₂ ou N-terminale correspond aux domaines A et B. Ces domaines correspondent à la fonction de transactivation indépendante de l'hormone (AF-1). La fonction AF-1 n'est pas présente pour le ER β (Hall and McDonnell, 2005). Le domaine C correspond à la région du récepteur qui se fixe sur l'acide désoxyribose nucléique (ADN) (DBD pour «DNA Binding Domain») (Nilsson et al., 2001, Kumar et al., 1987) et sert à la dimérisation des récepteurs via les structures en doigt de zinc (Nilsson et al., 2001, Shibata et al., 1997, Evans, 1988). Le domaine D est considéré comme la partie charnière du récepteur («Hinge») (Nilsson et al., 2001, Kumar et al., 1987) et contient le signal de localisation nucléaire du récepteur (Giguere et al., 1986, Shibata et al., 1997, Ylikomi et al., 1992, Tsai and O'Malley, 1994). Les domaines E et F correspondent à l'extrémité COOH ou C-terminale, et ont plusieurs fonctions. Le domaine E correspond aux fonctions suivantes : la liaison avec le ligand (LDB pour «Ligand Domain Binding») (Nilsson et al., 2001, Kumar et al., 1987), la transactivation dépendante de l'hormone (AF-2) (Shibata et al., 1997, Nilsson et al., 2001, Kraus et al., 1995), la dimérisation du récepteur, l'association aux protéines du choc thermique (Shibata et al., 1997) et la localisation nucléaire du récepteur (Nilsson et al., 2001, Shibata et al., 1997, Tsai and

O'Malley, 1994). Le domaine F possède des fonctions de modulation (Shibata et al., 1997)(voir la figure 1.3).

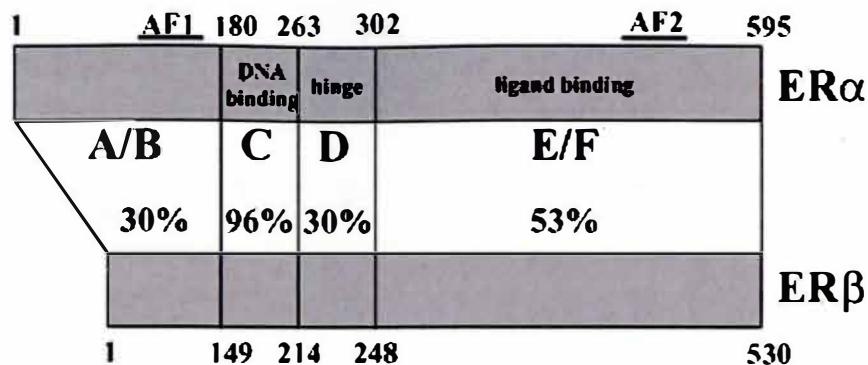


FIGURE 1.3 : Représentation schématique des domaines structuraux et fonctionnels des REs α et β et de leur homologie (Pearce and Jordan, 2004). Les domaines C des REs α et β sont hautement conservés (96% d'homologie) et permettent la liaison avec l'ADN. Les domaines E/F sont conservés avec 53% d'homologie et permettent la liaison avec le ligand. La transactivation dépendante de l'hormone se fait par la fonction d'activation (AF-2) présente pour les REs α et β dans la partie C-terminale (domaines E/F). La transactivation indépendante de l'hormone se fait par la fonction d'activation (AF-1) présente seulement pour le RE α dans la partie N-terminale (domaines A/B).

Les REs α et β entrent en fonction lorsqu'un ligand se fixe sur le LDB. Plusieurs molécules peuvent servir de ligand aux REs, comme les œstrogènes, les agonistes des œstrogènes et les antagonistes des œstrogènes. Ces molécules peuvent interagir avec le LDB des REs α et β (Nilsson et al., 2001, Kuiper et al., 1997). Il a de plus été montré que les REs α et β ont une affinité similaire pour l'E₂ (1) et d'autres ligands (Kuiper et al., 1997). Ainsi, l'activation des REs selon le modèle classique implique la fixation du ligand sur le LDB qui induit un changement de conformation stérique du récepteur (Kuiper et al., 1997, Nilsson et al., 2001, Tsai and O'Malley, 1994, Kraus et al., 1995). Par la suite, l'E₂ (1) véhicule son effet via deux voies cellulaires. La première voie, qualifiée de voie génomique ou de voie classique, passe par l'interaction entre les REs α

et β et l'ADN (Bjornstrom and Sjoberg, 2005, Nilsson et al., 2001). La deuxième voie, qualifiée de non génomique ou de voie rapide, ne nécessite pas d'interaction avec l'ADN pour induire des changements cellulaires (Bjornstrom and Sjoberg, 2005, Nilsson et al., 2001).

1.1.3 La voie génomique

Le mécanisme de la voie génomique est le résultat d'une interaction de trois éléments : le ligand (E₂ (1)), le récepteur affilié et l'ADN ciblé par le récepteur (Katzenellenbogen et al., 2000). L'interaction du ligand (E₂ (1)) avec le récepteur permet un changement de conformation du RE, ce qui entraîne une dissociation de la protéine de choc thermique hsp90 du RE stimulé (Sabbah et al., 1989, Chambraud et al., 1990), et par le fait même la libération du DBD. Le DBD est formé de deux doigts de zinc. Les doigts de zinc sont des structures peptidiques en forme de boucle dont le centre est constitué de zinc reliant les cystéines de la boucle. Chacun des doigts possède des boîtes d'acides aminés qui font contact avec l'ADN («P-box» et «D-box») (Fairall et al., 1993, Schwabe et al., 1993, Schwabe et al., 1990, Tsai and O'Malley, 1994). Ainsi, la libération du DBD permet à celui-ci de faire contact avec l'ADN, troisième élément essentiel à la voie génomique. Le DBD sert également à la dimérisation des REs, qui est essentielle à l'initiation de la transcription des gènes cibles de ces récepteurs (Sabbah et al., 1989). Il peut y avoir une homo- ou hétéro- dimérisation entre les isoformes α et β des REs pour interagir avec l'ADN (Cowley et al., 1997, Mosselman et al., 1996). Les REs lient l'ADN au niveau des séquences palindromiques des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) des gènes cibles via les structures de contact «P-box» et «D-box» (Klinge, 2001, Butt et al., 2005, Tsai and O'Malley, 1994). La séquence de nucléotides consensus des EREs liée par les REs est 5'-CAGGTCAnnnTGACCTG-3', où n représente un des quatre nucléotides (Klinge, 2001, Gruber et al., 2004). Cette séquence est située avant la région régulatrice des gènes cibles (Rollerova and Urbancikova,

2000). Une étude a montré que les deux isoformes, RE α et RE β , faisaient contact avec les mêmes nucléotides dans la séquence consensus de ERE (Gruber et al., 2004, Yi et al., 2002). Le RE α a par contre approximativement deux fois plus d'affinité avec le ERE (Gruber et al., 2004, Hyder et al., 1999).

Les liaisons des REs aux EREs sont renforcées par la phosphorylation des résidus de sérine dans les domaines A et B des REs (Klinge, 2001, Tzeng and Klinge, 1996). Cette liaison permet la formation et la fixation d'un complexe de transcription sur une région promotrice d'un gène cible. Cela permet la transcription de gènes cibles en acide ribonucléique messager (ARNm) grâce à l'acide ribonucléique polymérase II (ARNpol II) et, par la suite, la traduction en protéine de l'ARNm via la machinerie cellulaire présente (voir la figure 1.4) (Butt et al., 2005, Beekman et al., 1993, Elliston et al., 1990).

1.1.3.1 Les cofacteurs

En plus de l'interaction avec l'ADN, le changement de conformation induit par la liaison du ligand (E₂ (1)) permet l'interaction du RE avec des cofacteurs de transcription. La liaison des cofacteurs de transcription se fait sur les domaines de transactivation AF-1 et AF-2 (Pearce and Jordan, 2004). Les cofacteurs jouent un rôle dans la liaison du récepteur à son ligand et modulent le signal qui résulte de l'activation du récepteur. En effet, un cofacteur peut être répresseur ou activateur (Nilsson et al., 2001). Très peu de cofacteurs ont été identifiés comme spécifiques aux REs, la plupart ayant une interaction avec plusieurs récepteurs nucléaires. Seul un cofacteur spécifique à l'oestrogène a été identifié : le répresseur de l'activité du RE (REA), qui est de nature répressive. Ce corépresseur peut agir sur les deux isoformes α et β du RE (Montano et al., 1999). Contrairement aux autres corépresseurs non spécifiques, le REA agit préférentiellement sur des REs liés soit à leur ligand, soit à un agoniste ou un

antagoniste de leur ligand (Montano et al., 1999). Le REA agit en inhibant la transcription de l'ADN initiée par l'activation des ERs (Delage-Mourroux et al., 2000).

En résumé, les facteurs influençant l'activité génomique des REs sont la phosphorylation du récepteur, la nature des cofacteurs liés sur AF-1 et AF-2, la présence des facteurs de transcription nucléaires et l'environnement cellulaire (Tsai and O'Malley, 1994). De plus, les deux isoformes montrent une homologie de 53 % pour le domaine AF-2 et l'isoforme β ne possède pas de domaine AF-1 (voir la figure 1.3), ce qui conduit à la liaison de cofacteurs distincts et qui influence l'activité des différents REs (Nilsson et al., 2001, Pearce and Jordan, 2004, Hall and McDonnell, 2005).

1.1.4 La voie non génomique

De plus en plus, on constate que la cinétique d'action de l'E₂ (**1**) est très rapide. Les actions de l'E₂ (**1**) sont trop précoces pour être induites par la synthèse d'ARNm et la traduction en protéines (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Bien que le mécanisme d'action non génomique de l'E₂ (**1**) ne soit pas bien élucidé, plusieurs effets de l'E₂ (**1**) sont rapportés dans la littérature pour différents types cellulaires et associés à la voie non génomique de l'E₂ (**1**) (voir la figure 1.4) (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Il a été montré que plusieurs effets sont associés à la voie non génomique. Parmi ceux-ci, on retrouve la mobilisation intracellulaire du calcium (Impronta-Brears et al., 1999), la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase entraînant la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) (Aronica et al., 1994, Razandi et al., 1999), l'activation de certaines voies de signalisation dans une lignée cellulaire cancéreuse du sein telle que la voie des protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK) (Migliaccio et al., 1996) et la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Castoria et al., 2001). L'activation de ces deux voies a été mise en évidence dans la même lignée cellulaire (Migliaccio et al., 1996, Castoria et al., 2001). Il est à noter que

la voie de signalisation PI3K est une voie importante dans la survie cellulaire et elle sera expliquée plus en détail dans la section 1.6. Ces systèmes de signalisation sont généralement présents dans le cytoplasme de la cellule. Ces voies de signalisation sont parfois proches de la membrane plasmique et même associées, ce qui met en évidence la présence d'un récepteur à l'œstrogène membranaire (REm) (Norman et al., 2004).

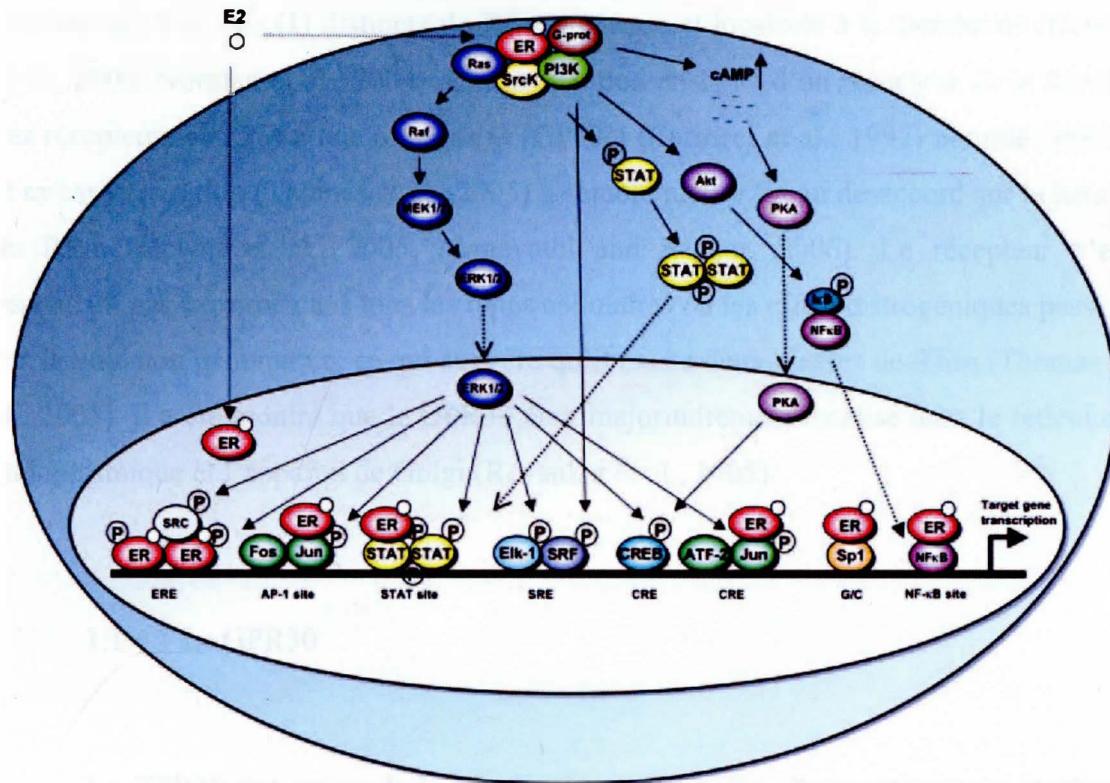


FIGURE 1.4 : Représentation schématique des voies génomiques et non génomiques induites par les REs (Bjornstrom and Sjoberg, 2005). L'E₂ peut se fixer au RE au niveau du noyau (voie génomique) ou au niveau de la membrane (voie non génomique). Dans le noyau, le complexe RE-E₂ peut lier l'ADN au niveau des séquences EREs ou lier des complexes de facteur de transcription tels que « activator protein-1 » (AP-1), « signal transducers and activators of transcription protein » (STAT), « activation transcription factor-2 » (ATF-2)/c-Jun, « specificity protein 1 » (Sp1) et « nuclear factor-kappa B » (NF-κB). Au niveau de la membrane le complexe RE-E₂ active la cascade de protéine kinase menant à la phosphorylation (P) des facteurs de transcription cibles tels que AP-1, STATs, « E-26-like protein 1 » (Elk-1), « serum response factor » (SRF), « cAMP response element-binding » (CREB) et NF-κB.

Malgré l'évidence des effets non génomiques de l'E₂ (1) via un REm, une controverse réside au niveau de la nature du REm. Dans un premier temps, certains auteurs ont proposé que le REm était le RE α nucléaire avec des modifications post-traductionnelles et associé avec des structures membranaires déjà en place, tels que des cavéolines, des protéines G ou des récepteurs tyrosines kinases (Hewitt et al., 2005, Nadal et al., 2001, Razandi et al., 1999, Bjornstrom and Sjoberg, 2005, Norman et al., 2004). Dans un second temps, d'autres auteurs ont proposé que le REm était une protéine qui fixe l'E₂ (1) distincte du RE α nucléaire et localisée à la membrane (Hewitt et al., 2005, Norman et al., 2004). L'identification en 1997 d'un récepteur de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) (Carmeci et al., 1997) nommé GPR30 et sa caractérisation (Thomas et al., 2005) a semblé mettre fin au désaccord sur la nature du REm (Hewitt et al., 2005, Manavathi and Kumar, 2006). Le récepteur n'est cependant pas exprimé dans tous les types cellulaires où les effets œstrogéniques passent par la voie non génomique, ce qui suggère qu'il existe deux classes de REm (Thomas et al., 2005). Il a été montré que le GPR30 était majoritairement localisé dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Revankar et al., 2005).

1.1.4.1 Le GPR30

Le GPR30 fait partie de la famille des GPRCs, famille constituée de protéines avec sept domaines transmembranaires (Ji et al., 1998). Ces récepteurs transmettent leur signal par une protéine G trimérique composée des sous-unités protéiques α , β et γ (Ji et al., 1998). Le signal induit la libération de la sous-unité protéique G α des sous-unités protéiques G $\beta\gamma$, ce qui permet de transmettre le signal via G α . Il a été montré que le GPR30 liait sélectivement l'œstrogène et des anti-œstrogènes comme le tamoxifène et le ICI 182,780. Les œstrogènes plus faibles (E₁ et E₃) ont une affinité plus faible pour le GPR30 que l'E₂ et ne peuvent activer ce récepteur (Thomas et al., 2005). Il a aussi été montré que le GPR30 agissait comme un récepteur à l'œstrogène membranaire qui transmettait le signal des composés œstrogéniques ayant une affinité de liaison à ce

récepteur élevée, résultant en une stimulation de la protéine G et une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase (Thomas et al., 2005). Il a par ailleurs été montré que le GPR30 stimulé par l'E₂ (1) induisait la mobilisation du calcium (Revankar et al., 2005) et l'activation des voies PI3K (Revankar et al., 2005, Vivacqua et al., 2006) et des MAPK (Filardo, 2002, Vivacqua et al., 2006). Ces évènements peuvent être classifiés en trois grandes voies de signalisations : la voie Ras-Raf-MEK-MAPK, la voie Src-PI3K-Akt-eNOS et la voie PLC-PKC-cAMP-PKA, et il peut y avoir une multitude d'interactions entre ces trois voies (Zhang and Trudeau, 2006). Il est à noter que ces voies de signalisation activées par l'E₂ (1) sont spécifiques aux types cellulaires dans lesquelles elles s'exercent.

Ces voies de signalisation peuvent moduler des facteurs de transcription. Des études ont par exemple montré que les voies de signalisation MAPK (Duan et al., 2001) et PI3K (Duan et al., 2002) peuvent réguler le facteur de réponse sérique (SRF) dans la lignée cancéreuse du sein MCF-7. Ce facteur est impliqué dans la régulation de l'expression de c-fos (Zhang and Trudeau, 2006). La protéine c-fos est un protooncogène reconnu dans la littérature pour jouer un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et le processus de transformation cellulaire (Duan et al., 2001). Il a été montré que l'activité de transcription de la protéine activatrice-1 (AP-1) était augmentée par la stimulation avec l'E₂ (1) via la voie MAPK (Bjornstrom and Sjoberg, 2004). La protéine AP-1 est reconnue pour contribuer à la régulation de la cycline D1 (Bjornstrom and Sjoberg, 2004, Marino et al., 2002), qui est un élément essentiel pour la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (Prall et al., 1997). Le gène de la cycline D1 peut être activé dans les cellules cancéreuses du sein par l'association du RE α activé par l'E₂ (1) avec la Src kinase et la p85 α (une sous-unité régulatrice de PI3K) (Castoria et al., 2001, Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Ces exemples montrent comment l'E₂ (1) peut induire la prolifération cellulaire par la voie génomique ou non génomique ou par la convergence des deux.

1.1.5 Les REs et le cancer

Les REs sont une cible importante pour le traitement et la prévention du cancer du sein. Il est accepté dans la littérature scientifique que l'interaction de l'E₂ (1) avec le RE α amène une augmentation de la prolifération cellulaire (Pearce and Jordan, 2004, Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Les cellules cancéreuses du sein et les cellules normales du sein répondent par contre différemment à la stimulation de l'E₂ (1) (Palmieri et al., 2002). L'influence du RE β sur la prolifération et le développement du cancer du sein n'est pas bien comprise et reste à préciser (Pearce and Jordan, 2004). Il est considéré dans la littérature que le RE β a un effet modulateur sur les effets induits par le RE α , puisque le RE β est exprimé dans les cellules normales et les cellules cancéreuses et qu'il peut lier l'E₂ (1) et s'hétérodimériser avec le RE α (Pearce and Jordan, 2004, Ogawa et al., 1998). Il a été montré que lorsqu'un tissu mammaire devient une tumeur, la quantité de RE α exprimée augmente et la quantité de RE β diminue (Leygue et al., 1998b). De plus, la majorité des REs exprimés par les cellules cancéreuses du sein sont de types RE α (Pearce and Jordan, 2004). Dans le cas du cancer ovarien, une majorité d'études soutient que le type α des REs est dominant dans les cancers ovariens résultant de l'avantage de croissance que procure la surexpression du RE α (Pearce and Jordan, 2004, Pujol et al., 1998). Dans le cas du cancer de l'endomètre, les différents REs sont exprimés dans 70 à 80 % des cas. Une étude récente a identifié un gène, le «paired-box 2» (PAX2), dont l'expression était augmentée après un traitement avec l'E₂ (1) ou avec le tamoxifène dans les cellules cancéreuses de l'endomètre, mais pas dans les cellules normales. Le RE α est recruté par le promoteur de PAX2 en réponse à un traitement avec l'E₂ (1) ou avec le tamoxifène. De plus, l'hypométhylation du promoteur de PAX2 dans les cellules cancéreuses comparée à l'hyperméthylation de ce même promoteur dans des cellules normales suggère que ce gène normalement silencieux est réactivé dans le cancer de l'endomètre (Deroo and Korach, 2006, Wu et al., 2005). L'activation du promoteur PAX2 est généralement accompagnée d'un taux de division cellulaire élevé. Enfin, il est à noter qu'il a été montré que PAX2 est aussi exprimé dans des tumeurs

primaires, incluant le cancer du sein et de l'ovaire (Wu et al., 2005, Silberstein et al., 2002, Muratovska et al., 2003). Ainsi, des chercheurs en viennent à conclure que PAX2, via l'activation par le RE α , serait à l'origine de nombreux cancers tel que le cancer du sein, de l'ovaire et de l'utérus (Wu et al., 2005).

1.2 Les cancers hormonodépendants

Un cancer est hormonodépendant lorsqu'il nécessite la stimulation d'une hormone pour sa survie. Ainsi, les cellules d'un cancer qui expriment le récepteur à l'E₂ (1) et nécessitent l'hormone sexuelle féminine, l'E₂ (1), pour proliférer sont considérées comme étant hormonodépendantes. De 60 % à 70 % des cancers du sein (Maucher and von Angerer, 1993), de 70 % à 73 % des cancers de l'utérus (Kounelis et al., 2000) et 61 % des cancers ovariens (Rao and Slotman, 1991) expriment le RE α . Ces cancers sont donc considérés comme étant hormonodépendants, car ils expriment le ER α (ER α +) et nécessitent l'hormone sexuelle féminine l'E₂ (1) pour proliférer.

1.2.1 Le cancer de l'utérus

Au Canada, 3 800 nouveaux cas de cancer de l'endomètre ont été diagnostiqués en 2007, et 730 décès en ont découlé. Ainsi, la probabilité qu'une femme soit atteinte d'un cancer de l'endomètre au Canada en 2007 est de 1 sur 42 et celle qu'une femme meure de ce même cancer est de 1 sur 176. L'incidence du cancer de l'endomètre était au premier rang des cancers gynécologiques et au quatrième rang de tous les autres types de cancers chez la femme (Parkin et al., 2005, Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007). Les facteurs reconnus pour augmenter les risques de cancer de l'endomètre sont l'obésité, l'âge, l'hypertension, le diabète, la nulliparité,

avoir souffert du cancer du côlon ou du cancer du sein auparavant dans sa vie, avoir souffert d'un problème et/ou d'une panne d'ovulation et avoir été exposée à un taux élevé d'E₂ (1) endogène et/ou exogène (Bast, 2000, Yarbro, 2005).

Le cancer de l'endomètre est subdivisé en deux types : le premier est nommé endométoïde et le second non-endométoïde. Seul le premier type est relié aux facteurs hormonaux (Deligdisch and Holinka, 1987, Sherman et al., 1995). Le carcinome endométoïde représente environ 80 % de tous les carcinomes de l'endomètre et peut être classé histologiquement en trois types d'adénocarcinome. Ils prennent généralement naissance à partir des cellules cylindriques qui composent les glandes tubuleuses de l'endomètre (voir la figure 1.5)(Bast, 2000, Yarbro, 2005).

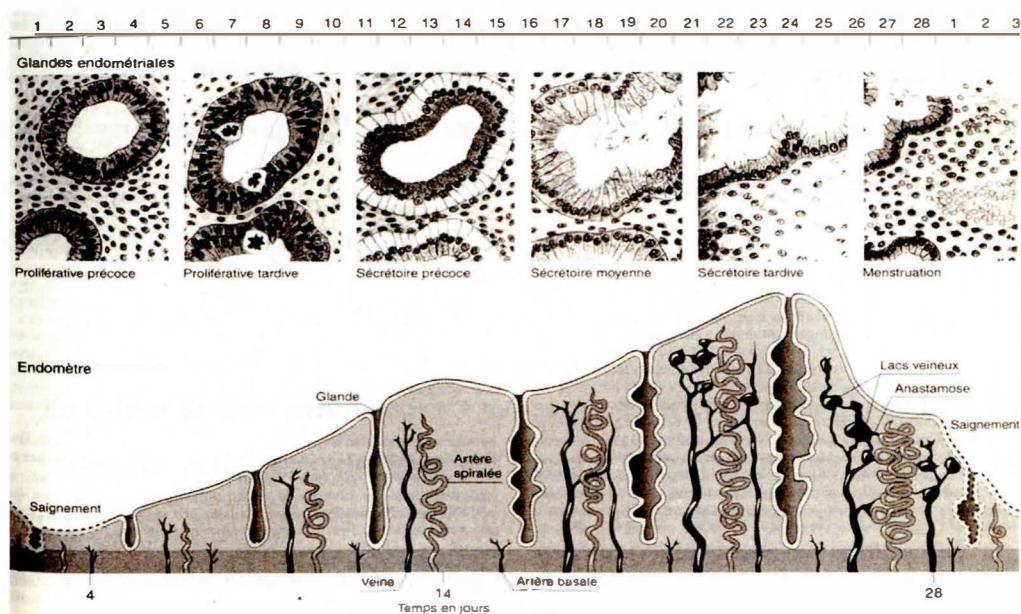


FIGURE 1.5 : Image des glandes endométriales et structure schématique de l'utérus au cours du cycle menstruel (Heffner, 2003, page 31). En haut : coupe histologique des glandes endométriales à différentes phases du cycle menstruel. Les glandes sont composées de cellules cylindriques au niveau desquelles 80% des cas de cancer de l'endomètre prennent naissance. En bas : schéma présentant l'évolution de l'endomètre au cours du cycle menstruel.

1.2.1 Le cancer du sein

En 2007 au Canada le cancer du sein était au premier rang en incidence par rapport à tous les autres types de cancers, juste après le cancer des poumons. Selon la société canadienne du cancer 18 800 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2007 et 5 100 décès en ont résulté. Ainsi, une femme sur 9 pouvait être atteinte d'un cancer du sein au Canada en 2007 et la probabilité qu'une femme meure de ce même cancer était estimée à 1 sur 27. Le cancer du sein est le cancer le plus souvent diagnostiqué chez la femme au Canada en 2007 (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007). Les facteurs qui augmentent le risque de développer un cancer du sein sont sensiblement les mêmes que ceux du cancer de l'ovaire (Ting et al., 2007), soit le sexe de l'individu, l'âge, les antécédents familiaux de cancer du sein, la présence de mutation sur les gènes BRCA1 et BRCA2, l'obésité, la nutrition, l'activité physique, l'apport exogène d'hormones tel que l'E₂ (1), l'exposition à des radiations ionisantes et les antécédents de cancer comme celui des ovaires et celui de l'endomètre (Dumitrescu and Cotarla, 2005).

Le cancer du sein prend souvent naissance à partir du tissu glandulaire du sein, soit à partir des cellules épithéliales des canaux galactophores ou dans les glandes productrices de lait (voir la figure 1.6). Le type de tumeur maligne retrouvé habituellement dans un cancer du sein est l'adénocarcinome; il peut être canalaire ou lobulaire. Tout comme l'adénocarcinome canalaire, l'adénocarcinome lobulaire peut être envahissant. La fréquence à laquelle ces deux types de cancer du sein sont retrouvés est respectivement de 70 % (carcinome canalaire) et de 10 % à 15 % (carcinome lobulaire). D'autres types de tumeurs envahissantes moins fréquentes sont aussi retrouvés, tels le carcinome médullaire (5 % à 7 %), le carcinome mucineux (3 %), le carcinome papillaire et le carcinome tubuleux (2 %) (Yarbro, 2005, Bast, 2000).

Les seins sont constitués de cellules épithéliales, de cellules adipeuses et de fibroblastes qui, normalement, répondent et sont régulés par l'interaction de plusieurs hormones. Certaines de ces hormones sont sécrétées par les cellules épithéliales, ce qui implique qu'elles ont une fonction autocrine. D'autres hormones sont produites par les cellules du stroma et elles contrôlent les cellules épithéliales de façon paracrine (Yarbro, 2005, Freiss et al., 1993). Puisqu'en temps normal les cellules sont régulées par ces hormones et qu'elles en possèdent leurs récepteurs, il est évident qu'un cancer provenant de ce type de cellule montre une certaine dépendance hormonale. Dans la littérature des études montrent que les cellules du cancer du sein peuvent synthétiser leur propre facteur de croissance pour ainsi s'auto-stimuler (Bast, 2000, Osborne and Arteaga, 1990, Osborne et al., 1990).

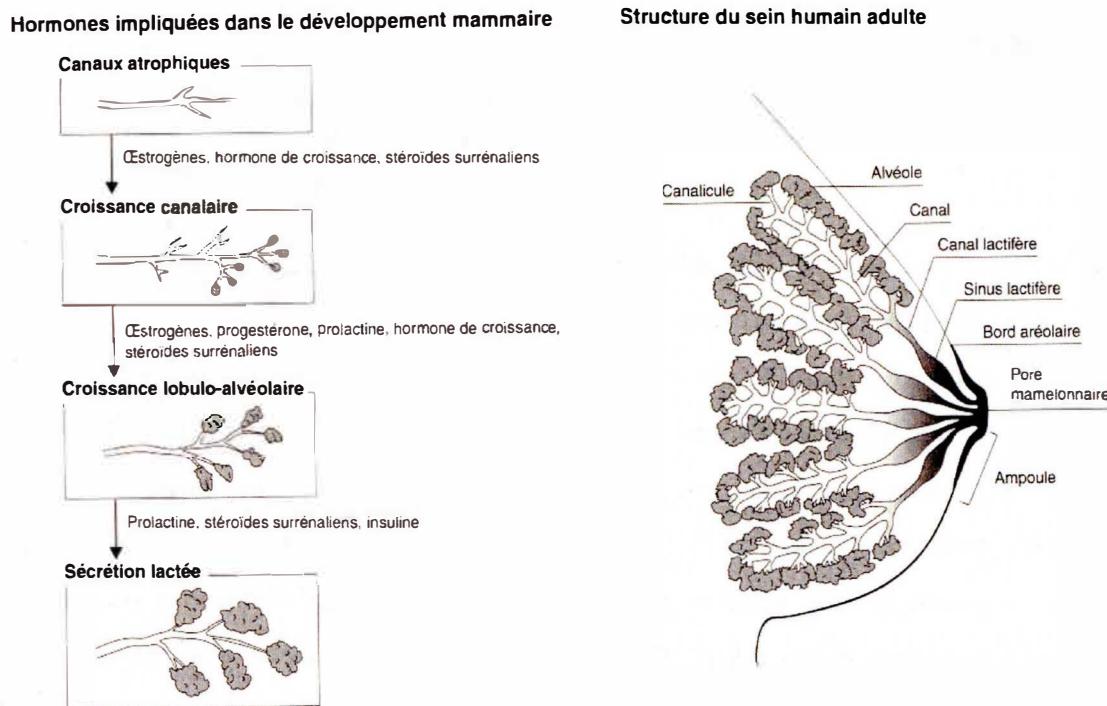


FIGURE 1.6 : Diagramme décrivant les hormones impliquées dans le développement mammaire et structure schématique du sein humain adulte (Heffner, 2003, page 56). Le cancer du sein prend généralement naissance à partir du tissu glandulaire du sein, des cellules épithéliales des canaux galactophores ou dans les glandes productrices de lait qui sont schématisés sur cette figure. L'œstrogène est la principale hormone stéroïdienne impliquée dans leur développement.

1.2.3 Le cancer de l'ovaire

Les statistiques canadiennes en 2007 pour le cancer de l'ovaire sont les suivantes : 2300 nouveaux cas de cancer de l'ovaire diagnostiqués, 1 550 décès attribuable à ce cancer, 1 femme sur 70 pouvant être atteinte de ce cancer et 1 sur 88 pouvant en mourir. Ces statistiques plaçaient le cancer de l'ovaire au cinquième rang par rapport à tous les autres types de cancers en terme d'incidence (Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada, 2007). Les facteurs de risque reconnus pour augmenter le développement d'un cancer de l'ovaire sont les antécédents familiaux d'un cancer (ovaire, sein, utérus, côlon), l'âge, l'apport d'hormone exogène par thérapie, le mode de vie (malnutrition, obésité), l'absence de grossesse, vivre dans un pays industrialisé, la présence de mutations génétiques et être de descendance juive Ashkenazi (Yarbro, 2005, Bast, 2000).

Le type de cancer ovarien rencontré le plus souvent est le cancer de type épithéial, qui représente 90 % des cas. Les cancers de type épithéliaux prennent naissance au niveau de la surface qui recouvre l'ovaire, l'épithélium ou la membrane séreuse (voir la figure 1.7). Les autres cancers ovariens sont de type non épithéial. Les cancers de type non épithéial prennent naissance des cellules du stroma des cordons sexuels ou des cellules germinales (voir la figure 1.7) (Yarbro, 2005, Bast, 2000). Les cancers de type épithéial sont classés d'après les cellules qui les composent et leur degré de différenciation. Ainsi, on retrouve dans 40 % des cas de cancer de l'ovaire de type épithéial des tumeurs séreuses qui peuvent être divisées selon les groupes suivants : l'adénocarcinome papillaire, le cystadénocarcinome papillaire et le carcinome papillaire de surface. Les autres cancers de type épithéial sont à 20 % des tumeurs endométrioïdes, à 6 % des tumeurs à cellules claires, à 1 % des tumeurs mucineuses et à 10 % des carcinomes mixtes. D'autres types de tumeurs sont rencontrées plus rarement, tels des tumeurs à cellules transitionnelles ou des carcinomes épidermoïdes (Yarbro, 2005, Bast, 2000).

Le cycle ovulatoire et ses effets sur l'épithélium de l'ovaire expliqueraient la genèse du cancer de l'ovaire. Deux théories se confrontent à ce sujet (Yarbro, 2005). D'un côté, la genèse du cancer de l'ovaire est expliquée par des ovulations constantes qui engendreraient une régénération constante de l'épithélium et des divisions cellulaires sans interruption, ce qui créerait une opportunité à des transformations cellulaires (Fathalla, 1971, Ozols et al., 2004, Godwin et al., 1992). D'un autre côté, la genèse du cancer de l'ovaire est expliquée par une stimulation excessive des cellules épithéliales de l'ovaire par les gonadotrophines produites par les cellules du stroma de l'ovaire, additionnée à la stimulation de l'E₂ (1) ou de précurseurs de l'E₂ (1). Ces stimulations des gonadotrophines et de l'E₂ (1) feraient entrer l'épithélium de l'ovaire en phase de prolifération menant à la formation de cellules malignes (Cramer and Welch, 1983, Ozols et al., 2004).

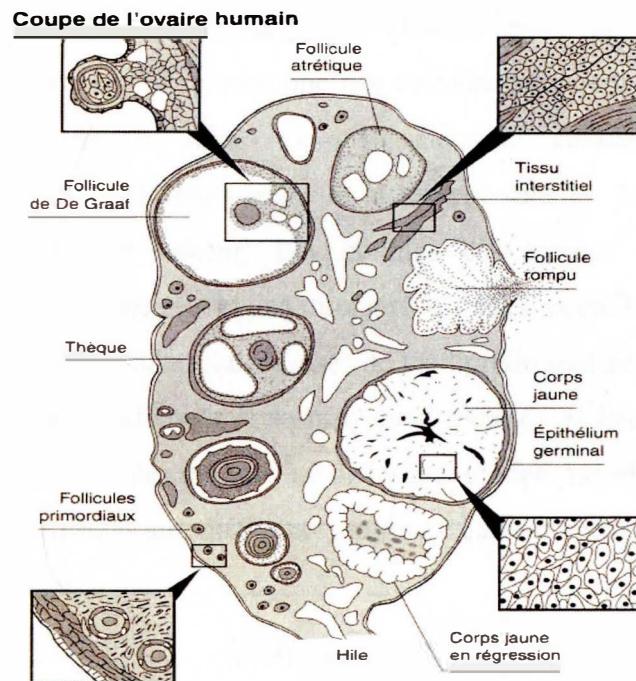


FIGURE 1.7 : Représentation schématique des différentes structures de l'ovaire durant le cycle menstruel (Heffner, 2003, page 30). Présentation des différents stades de la folliculogénèse durant le cycle menstruel dans le sens horaire à partir du bas à gauche. L'épithélium de l'ovaire, lieu de naissance de la majorité des cancers de l'ovaire, est schématisé dans le carré en bas à gauche.

1.3 Les traitements du cancer

Pour traiter les cancers mentionnés précédemment, des plans de traitement sont conçus selon l'état de santé général de l'individu traité et les caractéristiques du cancer dont la personne souffre. L'état de santé de la femme permet de savoir sa capacité à subir le traitement. L'évaluation de la santé de la femme traitée se fait par une radiographie thoracique, des analyses sanguines, des analyses d'urine et une surveillance cardiaque par électrocardiogramme (ECG) (Yarbro, 2005).

La caractérisation des cancers se fonde sur le type du cancer, son grade et son stade. Plusieurs systèmes de classification existent pour les différents cancers. Généralement, l'observation au microscope des cellules cancéreuses permet de classer histologiquement la tumeur selon sa différenciation cellulaire. Le degré de différenciation et la vitesse de croissance de la tumeur sont les facteurs de base pour déterminer le grade d'une tumeur. Les cellules cancéreuses de bas grade sont habituellement bien différenciées et les tumeurs qu'elles constituent se développent lentement. Par contre, les cellules cancéreuses de haut grade sont peu différenciées et les tumeurs se développent rapidement et se propagent plus tôt. Il faut mentionner qu'une grosse tumeur peut contenir des cellules de différents grades. Le tableau 1.1 explique le système de nombres attribués aux différents grades de cancers retrouvés (Sobin, 1997).

TABLEAU 1.1

Les différents grades de tumeurs selon leur différenciation cellulaire expliquée

Codes	Différenciation des cellules	Grades
GX		Impossible d'évaluer le grade
G1	Bien différencié	Bas
G2	Modérément différencié	Intermédiaire
G3	Peu différencié	Haut
G4	Indifférencié	Haut

(Sobin, 1997, www.cancer.ca, 2006)

La description du cancer classe un cancer selon son étendue dans un organisme. La taille de la tumeur, la propagation dans des tissus adjacents, l'atteinte des ganglions lymphatiques et la propagation vers d'autres organes sont les facteurs qui servent à déterminer le stade d'un cancer. Les données pour la classification se fondent en premier lieu sur les données recueillies en clinique par l'examen physique, l'étude d'imagerie, les résultats d'endoscopie et de biopsie et les résultats d'exploration chirurgicale (Sobin, 1997). La classification clinique permet de planifier le traitement initial, qui peut être modifié selon les observations effectuées en deuxième lieu lors de la classification pathologique. La classification pathologique est basée sur l'examen au microscope des tissus provenant de la tumeur primitive, des ganglions ou des métastases s'il y a lieu (Sobin, 1997). Cette deuxième partie permet de planifier un traitement supplémentaire ainsi qu'un suivi du cancer. Il existe plusieurs systèmes de classification selon les différents types de cancer.

Le système le plus utilisé pour les différents cancers est le système de classification « tumor lymph nodes metastasis » (TNM). Il est utilisé par l'Union internationale contre le cancer (UICC) et par l'American Joint Committee on Cancer (AJCC). Ce système de classification se base sur trois éléments (décrits dans le tableau 1.2). Le système de classification des tumeurs cancéreuses malignes TNM fut développé par Pierre Denoix (France) entre 1943 et 1952 (Sobin, 1997). Depuis, il n'a pas cessé d'évoluer et d'être corrigé avec les avancements de la science. Des lettres et des chiffres sont attribués aux lettres T, N et M, ce qui donne des informations supplémentaires et plus spécifiques. Chaque type de tumeur possède son système de classification TNM. Les normes et les définitions des stades du système de classification TNM correspondent à celles de la Fédération internationale de gynécologie et d'obstétrique (FIGO). Les différents stades sont décrits et expliqués dans les tableaux présentés en annexe A pour le cancer de l'utérus, en annexe B pour le cancer du sein et en annexe C et D pour le cancer de l'ovaire (Sobin, 1997).

Les plans de traitement utilisent plusieurs moyens pour traiter le cancer. La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie sont les techniques utilisées par la science médicale pour traiter le cancer. Ces techniques sont généralement employées en association les unes avec les autres. En conséquence, le traitement des cancers repose sur une stratégie qui attaque les cancers sur plusieurs fronts. Les parties qui suivent expliquent chacune de ces techniques.

TABLEAU 1.2

Description des différents éléments de base pour le système de classification TNM.

Codes	Descriptions
T	La taille de la tumeur primitive et son étendue dans les tissus environnants.
N	L'atteinte ou non des ganglions lymphatiques proximaux, taille des ganglions atteints ou nombre atteint.
M	La présence ou non de métastases dans des organes éloignés.

(Sobin, 1997, www.cancer.ca, 2006)

1.3.1 La chirurgie

Les premières chirurgies pour traiter le cancer remontent à l'époque de l'ancienne Égypte (Yarbro, 2005). La première chirurgie oncologique contemporaine fut pratiquée au début du 19^e siècle (Earle, 1965, Yarbro, 2005). Le but premier de la chirurgie est d'enlever la tumeur et tout le tissu affecté par le cancer. Elle peut aussi servir à réparer le tissu affecté par le cancer. De plus, la chirurgie permet de confirmer le diagnostic et de déterminer le stade du cancer et son étendue dans l'organisme par de multiples prélèvements au niveau des différents ganglions qui entourent la tumeur. De nos jours, plus de 60 % de tous les cancers sont traités par chirurgie et dans 90 % de tous les cancers, la chirurgie est utilisée pour le diagnostic ou la classification des tumeurs (Yarbro, 2005).

Les différents types de chirurgie pour traiter le cancer de l'utérus incluent l'hystérectomie totale ou élargie, la salpingo-ovarectomie bilatérale et l'exentération pelvienne. Il est possible que la vessie et le rectum soit retirés s'ils sont affectés par le cancer (Yarbro, 2005). Les différentes chirurgies pour traiter le cancer du sein vont d'une mastectomie totale suivie d'une reconstruction du sein à une chirurgie mammaire conservative et peut aller jusqu'à l'ablation des ganglions lymphatiques (Yarbro, 2005). Les différentes chirurgies pratiquées pour traiter le cancer de l'ovaire incluent l'hystérectomie abdominale totale, la salpingo-ovarectomie bilatérale, la cytologie péritonéale, l'omentectomie, les prélèvements de ganglions lymphatiques pelviens et para-aortiques, les multiples biopsies péritonéales, le grattage et biopsie du diaphragme, les prélèvements dans les adhérences intra-abdominales (Yarbro, 2005).

1.3.2 La radiothérapie

Le principe de la radiothérapie repose sur la destruction des cellules cancéreuses par des rayons X de haute énergie. La réponse cellulaire aux radiations est directement liée à son activité mitotique (Yarbro, 2005). Il a été montré que les cellules sont plus sensibles à la radioactivité durant la phase M et G₂ du cycle cellulaire (Yarbro, 2005). L'ADN et l'ARN sont altérés par l'énergie des radiations. Il a été montré *in vitro* que les radiations induisent quatre types de dommages aux molécules d'ADN : le changement ou la perte de base purique et pyrimidique dans la séquence des bases de la molécule d'ADN, la rupture des liens d'hydrogène entre les deux chaînes de la molécule d'ADN, une cassure dans une ou les deux chaînes de l'ADN et la liaison croisée des chaînes d'ADN préalablement cassées (Yarbro, 2005). Ainsi, les altérations et les cassures de la molécule d'ADN mènent à un dysfonctionnement cellulaire ou la mort cellulaire (Yarbro, 2005). De plus, la radiothérapie peut atteindre les cellules cancéreuses par un effet indirect. Les rayons à haute énergie peuvent être absorbés par l'eau qui compose majoritairement le milieu et l'environnement cellulaire. L'ionisation de l'eau produit des radicaux libres toxiques pour la cellule (Yarbro, 2005).

La radiothérapie est employée le plus souvent comme traitement adjuvant à la chirurgie et à la chimiothérapie (Yarbro, 2005, Morris et al., 1999, Rose et al., 1999). Elle peut être associée à la chirurgie, à la chimiothérapie et à la biothérapie en parallèle ou en alternance (Yarbro, 2005). Plusieurs agents chimiothérapeutiques sont utilisés pour leurs effets sensibilisants à la radiothérapie. Les plus utilisés sont le cisplatine (2), le paclitaxel et le doxorubicine (Yarbro, 2005). La radiothérapie peut être appliquée par deux voies différentes, soit les voies externe et interne. La voie externe (téléthérapie) consiste à utiliser une source externe qui émet des rayons à haute énergie vers la tumeur et les tissus qui l'entourent. La radiothérapie externe est généralement administrée pendant cinq jours sur trois à quatre semaines. La voie interne (brachythérapie) consiste à insérer une substance radioactive près de la tumeur, soit par un implant (curiethérapie), soit par l'injection d'un liquide radioactif (radiothérapie intrapéritonéale) (Yarbro, 2005). Le brachythérapie capitalise sur l'effet continu des radiations de la substance radioactive sur les cellules cancéreuses (Yarbro, 2005).

1.3.3 L'hormonothérapie

L'hormonothérapie a pour but de modifier le taux d'hormones dans le corps. Il en résulte généralement un ralentissement de la croissance de la tumeur et une diminution de la diffusion des cellules cancéreuses dans l'organisme. Les substances habituellement utilisées lors de l'hormonothérapie sont soit des analogues de stéroïdes, soit des stéroïdes ou des inhibiteurs d'enzyme tels des inhibiteurs de l'aromatase (AIs)(Yarbro, 2005). Le médicament le plus couramment utilisé pour traiter un cancer du sein métastatique ou récidivant est d'ailleurs un anti-œstrogénique (anologue de l'E₂ (1)) nommé tamoxifène (Novaldex). Le tamoxifène a malheureusement des effets œstrogéniques sur d'autres parties du corps comme les os, le système cardiovasculaire et l'utérus (Katzenellenbogen, 1996, Fisher et al., 1996). Ces effets œstrogéniques sur l'utérus augmentent les risques à long terme de développer un cancer de l'endomètre (Katzenellenbogen et al., 1997, Fisher et al., 1994, Jordan and Morrow, 1994,

Katzenellenbogen et al., 1996). Un autre anti-oestrogène nommé le raloxifène (aussi appelé dans le littérature LY 156,758 ou LY 139,481 ou kéoxifène ou Evista[®]) est utilisé pour traiter le cancer du sein puisqu'il possède une activité anti-oestrogénique au niveau du sein et de l'utérus (MacGregor and Jordan, 1998, Cummings et al., 1999, Delmas 1997). Le raloxifène a une activité oestrogénique sur les os et sur le système cardio-vasculaire (Cummings et al., 1999, Delmas 1997). Le raloxifène était surtout prescrit pour la prévention et le traitement de l'ostéoporose chez les femmes ménopausées. Une étude clinique a débuté en 1999 pour une durée de cinq ans. Le but de cette étude clinique était de comparer l'efficacité d'utilisation du tamoxifène et du raloxifène en prévention du cancer du sein chez des femmes ménopausées à haut risque pour ce cancer. Selon les résultats de cette étude le raloxifène est aussi efficace que le tamoxifène pour la prévention du cancer du sein tout en induisant moins d'effets secondaires, tels le cancer de l'utérus, des cataractes et des thromboembolies (Lee et al., 2008, Land et al., 2006, Vogel et al., 2006, Vogel, 2006).

Les androgènes sont plus efficaces avec les femmes en ménopause depuis plus de cinq ans. Les androgènes bloquent la sécrétion des gonadotrophines faites par la glande pituitaire et ainsi diminuent le taux endogène d'E₂ (1) (Yarbro, 2005). Le danazol est le stéroïde synthétique le plus utilisé pour le traitement du cancer du sein métastatique ou récidivant, car il présente le moins d'effets virilisants (Yarbro, 2005). Le mécanisme des agents progestatifs comme l'acétate de mégestrol est incertain. Ils montrent néanmoins une inhibition de l'effet stimulateur de l'E₂ (1). Ces hormones sont prescrites seulement si le traitement avec le tamoxifène n'a pas donné les résultats escomptés pour le cancer du sein (Yarbro, 2005). Des agents progestatifs sont par contre généralement utilisés pour traiter les cancers de l'endomètre récurrents. Une étude a montré une meilleure réponse au traitement avec de l'acétate de mèdroxyprogesterone pour les femmes ayant des tumeurs histologiquement bien différenciées et exprimant le récepteur à la progesterone (Thigpen et al., 1999, Yarbro, 2005).

Les AIs vont interférer directement dans la voie de synthèse de l'E₂ (1) (voir la figure 1.2) puisque l'enzyme aromatase est responsable, dans la voie de synthèse de l'E₂ (1), de la conversion de l'androstènedione en œstrone (Yarbro, 2005, Rose, 2003). Les AIs peuvent être non stéroïdiens et avoir un effet réversible sur l'enzyme, tels le letrozole (Femara) et l'anastrozole (Arimidex) (Yarbro, 2005), ou encore être stéroïdiens et avoir un effet irréversible, comme l'exemestane (Yarbro, 2005, Rose, 2003). Les effets secondaires les plus communs lors d'un traitement d'un cancer du sein métastatique ou récidivant avec les AIs sont une perte de la densité osseuse et des bouffées de chaleur (Yarbro, 2005).

1.3.4 La thérapie biologique

La thérapie biologique utilise des substances naturelles ou synthétiques pour renforcer le système immunitaire et réduire les effets secondaires provoqués par la chimiothérapie. Un exemple de thérapie biologique est l'administration du trastuzumab (Herceptin), qui est un anticorps monoclonal. Le trastuzumab permet de cibler spécifiquement le récepteur « human epidermal growth factor receptor-2 » (HER2/neu), un proto-oncogène qui participe au développement des cellules cancéreuses. L'HER-2 est une protéine transmembranaire retrouvée à la surface des cellules épithéliales, qui est aussi appelé c-erbB2. Cette dernière fait partie de la famille des récepteurs des facteurs de croissance épidermale humains. Le proto-oncogène HER-2 est surexprimé dans 25 % à 30 % des cancers du sein chez l'humain; la surexpression de HER-2 a été associée aux cancers récurrents et à la chimiorésistance (Cersosimo, 2003, Slamon et al., 1987, Slamon et al., 1989, Nahta and Esteva, 2003). Un autre exemple de thérapie biologique est l'utilisation de facteur de stimulation des colonies (FSC). L'érythropoïétine peut être administrée pour diminuer l'anémie causée par la chimiothérapie lors d'un traitement du cancer du sein (Yarbro, 2005, Bloomfield et al., 2003)

1.3.5 La chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement systémique qui consiste à faire circuler un agent anticancéreux (cytotoxique) dans tout l'organisme. L'agent cytotoxique peut ainsi détruire les cellules cancéreuses et atteindre les cellules qui auraient pu se détacher de la tumeur primitive. La chimiothérapie, tout comme la radiothérapie, peut être administrée à différents moments du traitement. Elle peut être néoadjuvante, adjuvante ou palliative à la chirurgie (Yarbro, 2005). Le type de cancer, son stade, son grade histologique et la taille de la tumeur s'il en reste après la chirurgie sont des facteurs qui influencent le moment où la chimiothérapie est administrée (Yarbro, 2005).

Comme mentionné précédemment, la chimiothérapie est désignée comme un traitement systémique pour le cancer puisque les agents cytotoxiques peuvent atteindre toutes les régions anatomiques de l'organisme. La voie d'administration habituelle pour les agents chimiothérapeutiques est l'injection intraveineuse. Les agents chimiothérapeutiques peuvent par contre être administrés par d'autres voies telles les voies orale, intramusculaire et sous-cutanée. De plus, des voies d'administration plus régionales peuvent être utilisées, telles les voies topique, intra-artérielle, intrapéritonéale, intrapleurale, intravésicale, intraventriculaire et intratumorale (Yarbro, 2005). La chimiothérapie est administrée généralement sous la forme d'un cycle qui comprend une période de traitement suivie d'une période de repos sans traitement d'une durée de trois à quatre semaines. La période de repos permet à l'organisme de récupérer. La durée du cycle de chimiothérapie dépend des agents chimiothérapeutiques administrés (Yarbro, 2005).

Plusieurs agents cytotoxiques peuvent être administrés simultanément, ce qui permet de diminuer les doses et de réduire les effets secondaires. L'association d'agents chimiothérapeutiques est plus efficace qu'un agent seul, puisque les agents cytotoxiques

affectent les cellules cancéreuses de différentes façons et à des moments distincts dans le cycle cellulaire. En conséquence, l'évolution d'une résistance aux agents chimiothérapeutiques est moins facile avec une association d'agents chimiothérapeutiques qu'avec un seul agent cytotoxique (Yarbro, 2005).

1.4 Les agents chimiothérapeutiques

Une collection d'agents chimiothérapeutiques a été développée pour le traitement des différents cancers et, encore aujourd'hui, d'autres agents cytotoxiques sont à l'étude (Yarbro, 2005). Le National Cancer Institute (NCI) coordonne l'examen de plus de 10000 composés par an, bien que moins de 1 % de ces composés passent à la phase d'étude clinique (Yarbro, 2005). Les agents chimiothérapeutiques sont intimement liés au cycle de division cellulaire, divisé en cinq phases : G_1 , S, G_2 , M et G_0 . Ces phases décrivent des périodes où différents processus cellulaires agissent et il en résulte à la fin du cycle, en G_0 , une prolifération cellulaire (deux cellules filles) ou une mort cellulaire. Les cellules cancéreuses se distinguent entre autres des cellules normales par une perte de contrôle de la division cellulaire, avec comme conséquence une rapide prolifération des cellules cancéreuses. L'induction de l'apoptose ou de la mort cellulaire programmée dans le cycle de division est un mécanisme cellulaire exploité par un grand nombre d'agents chimiothérapeutiques. La figure 1.9 présente les différents mécanismes d'actions des agents chimiothérapeutiques cytotoxiques. Les agents chimiothérapeutiques peuvent induire la mort cellulaire des cellules saines et cancéreuses par un ou plusieurs mécanismes (Yarbro, 2005). Par exemple, pour traiter les cancers de l'ovaire, du sein et de l'utérus des agents chimiothérapeutiques alkylant l'ADN sont utilisés. Le cyclophosphamide, le *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (*cis*-platine (2)), dont la structure est présentée à la figure 1.8, ainsi que le carboplatine sont des exemples d'agent alkylant l'ADN (Yarbro, 2005). Des anthracyclines comme le doxorubicine sont aussi utilisés pour traiter ces mêmes cancers. Les anthracyclines sont des antibiotiques antitumoraux formant des liens covalents avec l'ADN, mais ils forment

aussi des radicaux libres et peuvent inhiber l'enzyme topoisomérase II (Yarbro, 2005, Zhang et al., 1990, Zwelling, 1989). De plus, des taxanes, comme le paclitaxel (Taxol), sont utilisées pour traiter les cancers du sein, de l'utérus et de l'ovaire (Yarbro, 2005). Les taxanes agissent au niveau des microtubules en fixant les dimères de tubuline et en inhibant leur désassemblage (Yarbro, 2005, Schiff et al., 1979, Schiff and Horwitz, 1980).

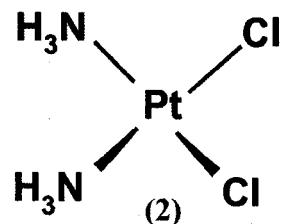


FIGURE 1.8 : Présentation de la structure chimique du cisplatine (2) (Perron et al., 2005). Le cisplatine est une molécule plane composée d'un atome de platine au centre avec deux atomes de chlore et deux amines. La disposition en *cis* des atomes de chlore confère au cisplatine sa toxicité.

1.4.1 Le cisplatine ; historique et mode d'action

Les effets du cisplatine (2) sur la division cellulaire sont connus depuis 1965. Ils furent découverts fortuitement par Barnett Rosenberg lors d'une étude sur les effets du champ électrique sur la croissance bactérienne. Le cisplatine (2) a été testé pour la première fois sur l'homme en 1972 (Jamieson and Lippard, 1999). Les composés à base de sel de platine comme le cisplatine (2), le carboplatin et l'oxaliplatin font partie d'une catégorie couramment utilisée d'agents chimiothérapeutiques hautement réactifs (Yarbro, 2005). Le cisplatine (2), un agent alkylant (Yarbro, 2005), est une molécule plane avec une disposition en *cis* des atomes de chlore, ce qui lui confère sa toxicité (voir figure 1.8) (Reedijk, 1999). En observant la figure 1.9, il est observable que les agents alkylants agissent au niveau de l'ADN. Le site le plus commun pour l'alkylation de l'ADN est la position N⁷ de la guanine (Hartley et al., 1986). L'effet cytotoxique

majeur des agents alkylants est le résultat de cette adduction qui déforme l'ADN, interférant ainsi avec la réplication et la transcription de l'ADN (Yarbro, 2005, Bohr et al., 1987).

Les premières études sur le cisplatine (2) ont montré que l'entrée de celui-ci dans la cellule se fait par diffusion passive (Jamieson and Lippard, 1999, Wang and Lippard, 2005). Cette conclusion était soutenue par plusieurs faits. L'absorption du cisplatine (2) se faisait de façon linéaire et n'était pas saturée à une concentration supérieure à 1,0 mM, aucune molécule de structure analogue au cisplatine (2) n'inhibait l'absorption de celui-ci et aucun pH optimal ne fut observé pour l'absorption du cisplatine (2) (Wang and Lippard, 2005). Dans le même ordre d'idée, une étude a identifié une protéine facilitant l'absorption du cisplatine (2). Cette étude a montré que la mutation ou la suppression du gène de la protéine «copper transporter 1» (CTR1) dans des levures et des cellules de souris provoquait une augmentation de la résistance au cisplatine (2) et une diminution du niveau de cisplatine (2) intracellulaire (Ishida et al., 2002). Une autre étude a montré qu'une surexpression du gène humain de CTR1 augmentait l'accumulation du cisplatine (2) dans des cellules de cancer ovarien (A2780) (Wang and Lippard, 2005, Holzer et al., 2004). La protéine CTR1 est connue pour être responsable de l'entrée du cuivre dans la cellule (Ohashi et al., 2003). Plus encore, la protéine «copper-transporting P-type adénosine triphosphate» (ATP7B), connue pour être responsable de la sortie du cuivre de la cellule, a été associée *in vitro* à la résistance au cisplatine (Wang and Lippard, 2005, Komatsu et al., 2000) et ce, pour plusieurs cancers (Wang and Lippard, 2005, Nakayama et al., 2002, Kanzaki et al., 2002). Ces observations lient l'entrée et la sortie cellulaire du cisplatine (2) aux voies métaboliques du cuivre. Elles suggèrent que le cisplatine et le cuivre s'interfèrent mutuellement lors de leur transport au travers de la membrane cellulaire (Ohashi et al., 2003). En fait, le mécanisme cellulaire d'entrée et de sortie du cisplatine (2) ne se fait pas seulement par diffusion passive, mais aussi par une importation active dans la cellule du cisplatine (2) par le CTR1 et par l'exportation active de la cellule par le ATP7B (Wang and Lippard, 2005).

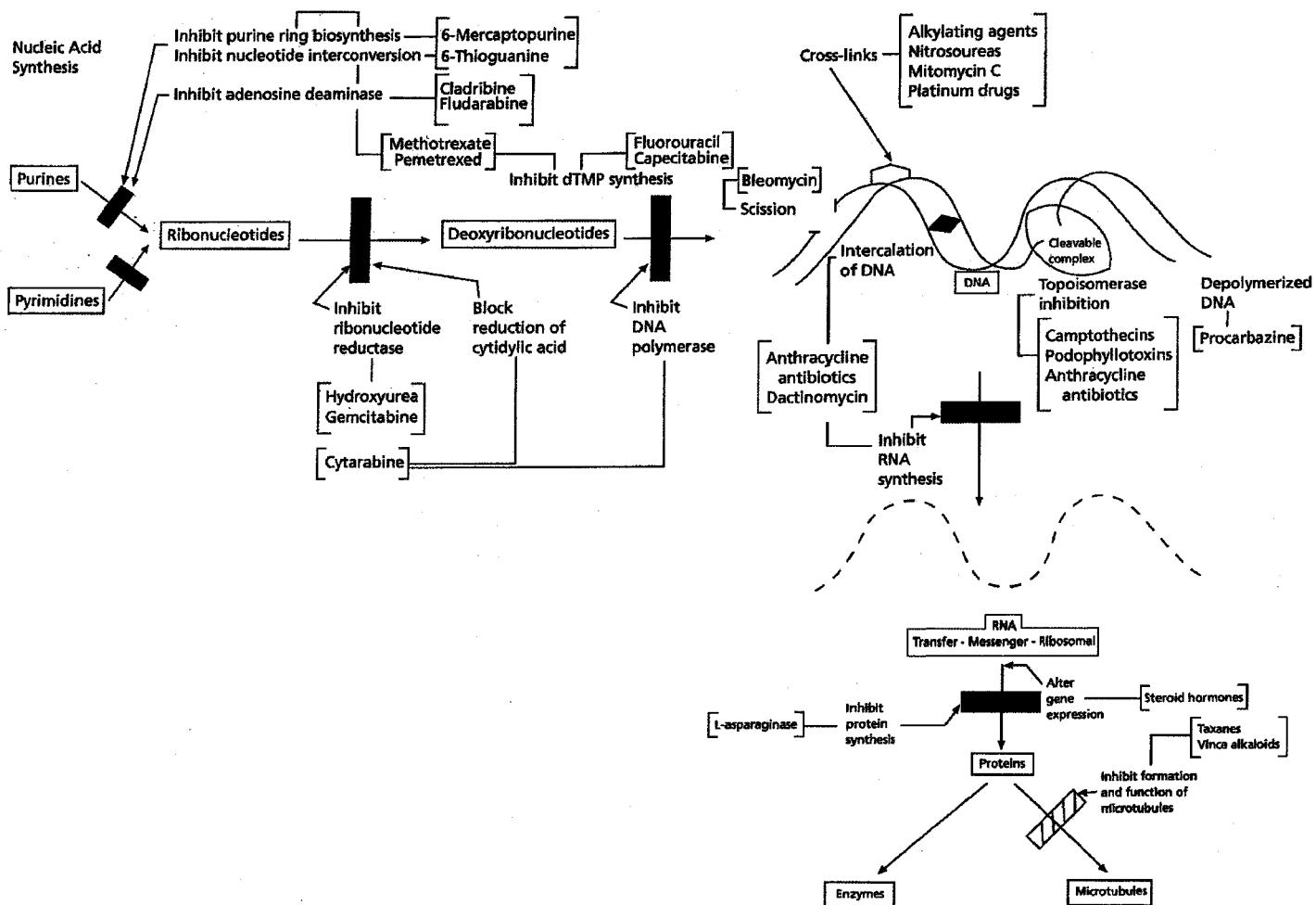


FIGURE 1.9 : Diagramme décrivant les différents mécanismes d'action utilisés par les agents chimiothérapeutiques (Yarbro, 2005, page 321). Le cisplatin agit en se fixant à l'ADN en créant des adductions tout comme les autres agents à base de platine et les agents alkylants. Les taxanes (Taxol) inhibent la formation et la fonction des microtubules. Les anthracycline (doxorubicine) inhibent la synthèse d'ARN et peut aussi inhiber la topoisomérase.

La concentration physiologique extracellulaire des ions chlorure est de 100 mM, ce qui maintient le cisplatine après son injection dans le sang dans un état neutre jusqu'à son entrée dans la cellule (Jamieson and Lippard, 1999). Dès son entrée dans la cellule, la concentration intracellulaire en ions chlorure étant plus faible (de 4 à 20 mM), l'hydrolyse du cisplatine (2) est facilitée, ce qui permet au cisplatine (2) d'agir sur ses cibles (Jamieson and Lippard, 1999, Wang and Lippard, 2005, Kartalou and Essigmann, 2001). Le phénomène d'hydrolyse du cisplatine (2) se traduit par le remplacement des atomes de chlore de la molécule de cisplatine (2) par des molécules d'eau (Kartalou and Essigmann, 2001). La molécule de cisplatine (2) chargée positivement par les molécules d'eau peut réagir avec des sites nucléophiles de macromolécules intracellulaires (Kartalou and Essigmann, 2001). Il est généralement admis que la cible de choix du cisplatine (2) est l'ADN, mais il est évident que les autres cibles cellulaires du cisplatine (2) jouent un rôle important dans son mécanisme à induire l'apoptose. Le cisplatine (2) peut interagir avec plusieurs éléments de la cellule tels l'ARN, certaines protéines, l'ADN mitochondrial et génomique, des phospholipides de la membrane, et des microfilaments du cytosquelette (Wang and Lippard, 2005, Jamieson and Lippard, 1999).

Les interactions du cisplatine (2) avec les phospholipides et les phosphoséries de la membrane perturbent le cytosquelette et affectent la polymérisation de l'actine (Speelmans et al., 1996, Speelmans et al., 1997, Kopf-Maier and Muhlhausen, 1992). De plus, le cisplatine (2) peut interagir avec des biomolécules comme la méthionine et la glutathione avant d'agir sur l'ADN (Reedijk, 1999). Le cisplatine chargé positivement par son hydrolysation peut réagir avec les bases purines de l'ADN comme la guanine en formant des adductions de l'ADN. Des liens covalents sont formés entre l'atome de platine du cisplatine (2) et l'atome d'azote en position 7 des guanines de l'ADN (Wang and Lippard, 2005). Les adductions ainsi formées sont en majorité intra-brins entre deux bases guanines proches. De plus, des adductions inter-brins entre deux bases guanines sont possibles (Wang and Lippard, 2005, Jamieson and Lippard, 1999, Kartalou and Essigmann, 2001). Il a été prouvé que la formation de ces adductions diminue la stabilité

de la double hélice d'ADN (Jamieson and Lippard, 1999). Par ailleurs, les adductions provoquées par le cisplatine (2) sur l'ADN déforment la structure en double hélice de l'ADN. Les déformations induites par le cisplatine (2) suggèrent une interférence avec le fonctionnement normal de l'ADN. Une perturbation de la réplication et de la transcription de l'ADN, deux processus essentiels à la division cellulaire, serait cytotoxique (Jamieson and Lippard, 1999). Il a été montré que le cisplatine (2) inhibait la réplication de l'ADN (Johnson et al., 1978). Une autre étude a quant à elle montré que le cisplatine (2) inhibait la transcription de l'ADN (Sorenson and Eastman, 1988). Ainsi, les effets cytotoxiques du cisplatine seraient majoritairement attribuables à la perturbation de la réplication et la transcription de l'ADN causée par les déformations (adductions) de l'ADN induites par les interactions du cisplatine (2) avec l'ADN (Jamieson and Lippard, 1999). Il a été montré que le cisplatine induisait l'apoptose par la libération du cytochrome c, la fragmentation du noyau cellulaire et la fragmentation de l'ADN nucléaire dans les cellules du cancer du sein (Blanc et al., 2000).

1.4.2 Problèmes reliés aux agents chimiothérapeutiques d'aujourd'hui

Deux grands problèmes sont reliés à l'utilisation d'agents cytotoxiques en chimiothérapie. Premièrement, les agents cytotoxiques sont peu sélectifs. En d'autres mots, les actions des agents chimiothérapeutiques ne ciblent pas seulement les cellules cancéreuses, car les mécanismes qu'ils utilisent pour induire l'apoptose sont aussi présents dans les cellules saines. En effet, les cellules touchées par les agents chimiothérapeutiques sont les cellules qui se divisent rapidement puisque les agents cytotoxiques sont intimement liés au cycle de division cellulaire (Yarbro, 2005). Bien que les cellules cancéreuses appartiennent à cette catégorie, d'autres cellules de l'organisme en font aussi partie, telles les cellules de la muqueuse gastro-intestinale et de la moelle osseuse (Yarbro, 2005). Ainsi, les effets des agents chimiothérapeutiques sur les cellules saines de l'organisme causent des effets secondaires et limitent leur utilisation clinique. Par exemple, la toxicité sur le rein et la neurotoxicité du cisplatine

(2) limitent son utilisation clinique comme drogue chimiothérapeutique (Gagnon et al., 2004b).

Le second problème relié à l'utilisation d'agents cytotoxiques en chimiothérapie est la récurrence des cancers attribuable à la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. Trois mécanismes ont été identifiés lors du développement de la résistance cellulaire commun au cisplatine (2). Tout d'abord, la cellule peut contrer l'effet du cisplatine (2) en augmentant l'efficacité de son système de réparation de l'ADN. Elle peut aussi augmenter son système de détoxication via des molécules thiolées telles la glutathione (GSH) et la métallothionéine (MT) ou encore diminuer l'assimilation de la drogue (Gagnon et al., 2004b, Jamieson and Lippard, 1999). Finalement, il a été montré que la protéine kinase Akt est impliquée dans la résistance au cisplatine (2) dans les cellules du cancer de l'utérus (Gagnon et al., 2004a). Malgré les progrès énormes réalisés concernant le traitement et la détection de ces maladies mortelles, la résistance aux thérapies hormonales et à la chimiothérapie demeure l'obstacle principal à l'éradication de ces maladies.

1.4.3 Stratégies pour contrecarrer la chimiorésistance

Plusieurs stratégies ont été développées pour contrer les problèmes de résistance et d'effets secondaires mentionnés précédemment. Le but de ces stratégies est d'augmenter la sélectivité des agents cytotoxiques. La première stratégie est le ciblage passif, qui est basé sur l'hyperperméabilité des tumeurs face aux macromolécules causée par une irrigation vasculaire déficiente combinée à un drainage lymphatique inefficace. Différents liposomes de cisplatine (2) ont été préparés et testés. Le Lipoplatin a par exemple montré durant la phase I d'étude clinique une augmentation de deux à cinquante fois la concentration du liposome à la platine proche de la tumeur (van Zutphen and Reedijk, 2005, Boulikas, 2004). Un autre liposome, le SPI-77, a montré une

réduction de l'excrétion du cisplatine (2) dans l'urine qui correspond à une augmentation de cinq fois la tolérance au cisplatine (2) (van Zutphen and Reedijk, 2005, Devarajan et al., 2004).

La seconde stratégie visant l'augmentation de la sélectivité des agents cytotoxiques est l'activation enzymatique de prodrogues par des enzymes reliés aux tumeurs. Ainsi, la prodrogue est activée au niveau de la tumeur et permet à l'agent cytotoxique d'agir localement sur les cellules cancéreuses. Un conjugué β -glucuronyl-platinum peut par exemple être activé par la β -glucuronidase. Un composé à base de platine est libéré après l'action de la β -glucuronidase sur le conjugué β -glucuronyl-platinum. Il a été montré que l'enzyme β -glucuronidase est libérée en grande concentration dans l'environnement local des tumeurs nécrosées (Bosslet et al., 1998, Tromp et al., 2004, van Zutphen and Reedijk, 2005). L'activation enzymatique de la prodrogue peut même tenir compte des différences enzymatiques entre les cellules saines et les cellules cancéreuses. La stéréo-sélectivité entre les cellules saines et cancéreuses pour l'hydrolyse de lien ester est un exemple de différence enzymatique. Il a été montré que les cellules cancéreuses pouvaient hydrolyser le lien ester reliant le cisplatine (2) à une chaîne hydrophobe, avec une différence d'activité entre les énantiomères -(R) et -(S) (van Zutphen and Reedijk, 2005, Kageyama et al., 1998).

La troisième stratégie pour l'augmentation de la sélectivité des agents cytotoxiques est le ciblage de l'ADN par des molécules qui optimisent l'interaction entre le cisplatine (2) et l'ADN. Cette stratégie mène à une réduction des effets secondaires et contourne la résistance développée par une augmentation de la concentration des GSH. Ces nouvelles molécules sont composées d'un ligand à l'ADN tels des oligonucléotides, des intercalants et des molécules liant les sillons majeurs ou mineurs de l'ADN lié à un complexe de platine (van Zutphen and Reedijk, 2005).

Une autre stratégie utilisée est le ciblage de récepteurs. Cette stratégie est basée sur le fait que certains récepteurs sont associés à la division et à la croissance cellulaire. Ces récepteurs sont souvent surexprimés dans les cellules cancéreuses (van Zutphen and Reedijk, 2005). Plusieurs molécules ont été fabriquées à partir du ligand naturel du récepteur, ce qui confère aux molécules une spécificité propre au récepteur. Il est par contre important que la combinaison des deux parties de la molécule n'interfère pas avec l'affinité du ligand pour le récepteur et ne réduise pas la toxicité de l'agent cytotoxique lié.

Des molécules ciblant différents récepteurs ont été synthétisées (van Zutphen and Reedijk, 2005). Par exemple, les trois familles de molécules synthétisées par notre laboratoire vont dans le sens de cette stratégie et ciblent le RE α . Elles ont été synthétisées à partir de l'œstradiol (Descôteaux et al., 2003) et font l'objet de cette étude. Les informations relatives aux molécules et à leur synthèse, aux travaux déjà réalisés et au but de cette étude sont discutées plus en détail respectivement aux sections 1.7, 1.7.1 et 1.8. De plus, plusieurs autres laboratoires ont synthétisé des composés pour lier le RE α . Ces composés ont été synthétisés à partir de composés de platine liés à des molécules polyaromatiques (van Zutphen and Reedijk, 2005, Otto et al., 1991, Gust et al., 1995, Berube et al., 1997). D'autres composés ont été synthétisés avec des dérivés de l'œstradiol (van Zutphen and Reedijk, 2005, Cassino et al., 2004, Brunner and Sperl, 1993). Malgré leur faible affinité pour le RE, il a été montré que ces molécules pouvaient être internalisées dans la cellule (van Zutphen and Reedijk, 2005).

D'autres récepteurs ciblés dans le déploiement de nouveaux agents chimiothérapeutiques visant stratégiquement un récepteur associé à la division et la croissance cellulaire ont été synthétisés. Par exemple, le récepteur à l'acide folique est généralement surexprimé par les cellules humaines cancéreuses. Plusieurs agents toxiques, tels le cisplatine (2) et le taxol (Leamon and Reddy, 2004), ont été conjugués avec l'acide folique. Il a été montré que ces conjugués entraient dans les cellules, mais

aucun de ces deux conjugués n'a montré une activité cytotoxique appréciable (Leamon and Reddy, 2004). D'autres molécules ont été synthétisées pour cibler un autre récepteur : le récepteur à la protéine oncofoetale. Entre autres, la α -fetoprotéine a été conjuguée avec le cisplatine (2). Il a été montré que le conjugué était significativement plus毒ique que le cisplatine (2). La spécificité de ces conjugués face aux cellules cancéreuses a également été montrée (Severin et al., 1995).

1.5 L'apoptose et ses acteurs

L'apoptose fut décrite pour la première fois en 1972 par Kerr. L'apoptose va de pair avec la mitose pour contrôler le nombre de cellules d'un organisme (Thompson, 1995). Il s'agit d'un processus génétiquement contrôlé essentiel au développement cellulaire et à l'homéostasie cellulaire (Jacobson et al., 1997, Thompson, 1995). Ainsi, toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant la mort cellulaire programmée, tel un suicide cellulaire (Kerr et al., 1972). L'apoptose est caractérisée par plusieurs indices morphologiques et des modifications biochimiques comme la fragmentation de l'ADN, la condensation de la chromatine, le rétrécissement cellulaire et le bourgeonnement de la membrane plasmique (Wyllie et al., 1980). L'apoptose est une suppression organisée des processus biologiques et biochimiques menant à la destruction des organelles et des macrostructures cellulaires pour faciliter l'élimination de la cellule. Les déchets ainsi créés sont phagocytés par les cellules environnantes et des macrophages, ce qui empêche d'induire une réaction inflammatoire (Jacobson et al., 1997).

L'apoptose est à l'opposé de la prolifération cellulaire. Le cancer est envisagé dans le monde scientifique comme une physiopathologie cellulaire découlant d'une défaillance dans le processus de l'apoptose conduisant à une prolifération cellulaire (Okada and Mak, 2004). L'induction de l'apoptose est la stratégie employée par

plusieurs agents chimiothérapeutiques (voir figure 1.9) (Yarbro, 2005, Evan and Littlewood, 1998, Okada and Mak, 2004). Une carence en facteur de croissance, en oxygène, en nutriment, une réponse immunitaire, une activation de certains récepteurs membranaires tels que Fas et « tumor necrosis factor » (TNF) par leurs ligands respectifs, des dommages à l'ADN causés par un agent toxique ou une radiation ionisante et une activation d'un oncogène sont des signaux qui peuvent entraîner l'apoptose (Okada and Mak, 2004). La réponse cellulaire engendrée est effectuée par un groupe de protéases à cystéine appelées caspases («cysteinyl aspartate-specific proteases») (voir section 1.5.1).

1.5.1 L'activation et la cascade des caspases

Les caspases sont des protéases synthétisées en proenzymes inactives. L'activation des caspases est initiée par une scission au niveau des résidus aspartates (Asp) internes de la proenzyme et l'activation est irréversible (Yin and Dong, 2003, Nicholson, 1999). Les caspases sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité et d'une petite sous-unité (Yin and Dong, 2003, Nicholson, 1999). Le clivage de ces trois domaines et l'assemblage de la grande sous-unité avec la petite sous-unité rendent l'enzyme active (Yin and Dong, 2003, Nicholson, 1999). Les caspases peuvent activer d'autres caspases ou cibler des protéines intracellulaires. Lorsqu'une caspase interagit avec une cible, elle peut causer une perte de fonction à la protéine cible ou lui donner une nouvelle fonction (Nicholson, 1999).

Jusqu'à présent, onze caspases ont été identifiées chez l'homme (Yin and Dong, 2003). Les caspases sont divisées en trois groupes, soit les caspases inflammatoires, les caspases initiatrices et les caspases effectrices. Les caspases inflammatoires (1, 4, 5 et 12) jouent un rôle dans la maturation des cytokines et dans la réponse immunitaire (Eckhart et al., 2005, Chowdhury et al. 2008). Les caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9

et -10) activent la cascade des caspases durant l'apoptose en activant les caspases effectrices. Les caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) sont responsables de la destruction de la cellule, elles vont cliver des protéines clés essentielles à l'homéostasie de la cellule et à l'intégrité de l'ADN comme la polyadénosine diphospho-ribose polymérase (PARP) ou la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) (Nicholson, 1999).

Trois grandes voies ont été montrées pour l'activation des caspases. Ces trois voies convergent à certains endroits (Yin and Dong, 2003). L'activation de la cascade des caspases peut être engagée en réponse à un signal de mort cellulaire venant de l'extérieur comme l'activation des récepteurs Fas et TNF (Stennicke and Salvesen, 1998, Yin and Dong, 2003). L'activation peut aussi être amorcée par la sérine protéase granzyme B qui est produite et sécrétée par les lymphocytes cytotoxiques T (CTL) et les cellules «natural killer» (NK) (Yin and Dong, 2003). Finalement, l'activation peut être amorcée par la mitochondrie (Yin and Dong, 2003). Plusieurs stress cellulaires tels des dommages à l'ADN et un choc oxydatif ou thermique peuvent induire une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale ou activer les caspases en induisant un autoclavage (Yin and Dong, 2003).

Prenons par exemple la voie mitochondriale pour expliquer l'activation de la cascade des caspases. En réponse à différents stimuli apoptotiques, le cytochrome c est libéré de la mitochondrie, se lie à l'APAF-1 et ensuite à la pro-caspase-9 et l'active pour former l'apoptosome. (Nunez et al., 1998, Li et al., 1997). La caspase-9 activée agit à plusieurs endroits dans la cellule et participe à l'initiation de la cascade des caspases dans la cellule. Cet apoptosome peut cliver et donc activer les procaspases 3 et 6, qui sont des caspases effectrices (Li et al., 1997). La caspase-6 clivée peut cliver la lamine A (Grossmann et al., 1998, Slee et al., 2001), qui participe à l'architecture de la cellule. La caspase-3 clivée peut agir à plusieurs endroits. Elle peut cliver la procaspase-9, ce qui à pour effet d'amplifier le signal d'apoptose. La caspase-3 active peut cliver PARP

(Grossmann et al., 1998, Slee et al., 2001) et activer la procaspase-7 en la clivant. La caspase-7 activée peut cliver PARP (voir figure 1.10 à la page 47) (Slee et al., 2001).

1.5.2 L'implication de PARP dans l'apoptose

La protéine PARP non clivée est un acteur important dans le système de réparation de l'ADN. PARP interagit préférentiellement avec des brins d'ADN simple. Durant l'apoptose, la fragmentation de l'ADN produit surtout des brins d'ADN simple. Ainsi, PARP non clivé intervient contre le processus d'apoptose. L'inactivation de PARP par le clivage de la caspase-3 et de la caspase-7 crée un double effet. Premièrement, le clivage de PARP a pour effet de détruire l'élément de surveillance génomique (Grossmann et al., 1998) afin d'éviter que l'ADN soit réparé durant la dégradation de la chromatine (Oliver et al., 1998). Deuxièmement, l'accessibilité à la chromatine est facilitée pour les endonucléases (Oliver et al., 1998). De plus, PARP clivé est considéré comme un indicateur de l'apoptose (Oliver et al., 1998).

1.6 La contrepartie de l'apoptose : les « sentiers de survie cellulaire »

Au niveau moléculaire, le contrôle de l'activation de la cascade des caspases est un élément central dans plusieurs processus cellulaires tels l'apoptose, la prolifération et la différenciation cellulaire (Yin and Dong, 2003). Ainsi, plusieurs mécanismes nommés « sentier de survie cellulaire » sont en place pour contrôler l'apoptose et la contrer (Yin and Dong, 2003). Ces mécanismes cellulaires vont soit promouvoir la prolifération comme c'est le cas de la voie PI3K/Akt, des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur, soit inhiber l'apoptose comme les inhibiteurs de caspases (IAPs). Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur sont impliqués dans d'importants processus cellulaires comme la modulation de la transcription et la régulation du cycle cellulaire.

Dans une cellule normale, les oncogènes induisent l'avancée dans le cycle cellulaire et les gènes suppresseurs de tumeur codent des régulateurs positifs de l'apoptose (Griffiths et al., 2001). Ainsi, un changement dans le code génétique dans ces éléments amène pour l'oncogène une augmentation d'activité et pour les gènes suppresseurs de tumeur une inactivation (Griffiths et al., 2001). Dans les deux cas, une augmentation de la prolifération cellulaire échappant aux mécanismes de régulation intracellulaires est obtenue comme résultat.

1.6.1 La voie de signalisation PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est une voie de signalisation de survie cellulaire. Elle peut être activée par une variété de stimuli intracellulaires ou extracellulaires (Okada and Mak, 2004). Par exemple, tel que décrit dans la section 1.1.4.1, le GPR30 peut activer la voie PI3K/Akt pour induire la prolifération cellulaire. De plus, la voie PI3K/Akt est sujette à une régulation. Effectivement, l'oncoprotéine Ras régule positivement cette voie et le suppresseur de tumeur PTEN la régule négativement (Okada and Mak, 2004). Une fois la protéine PI3K activée, elle catalyse la production de phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP_3). Le PIP_3 va faciliter la phosphorylation de la protéine kinase Akt (Cantley, 2002).

La protéine kinase Akt ou protéine kinase B (PKB) est l'une des cibles de PI3K. La phosphorylation de Akt augmente son activité catalytique (Cantley, 2002). Ainsi, Akt activée va interagir à plusieurs endroits dans la signalisation apoptotique (figure 1.10 à la page 47) (Okada and Mak, 2004). Akt va phosphoryler la protéine Bad, ce qui permet à la protéine 14-3-3 de recruter Bad, et empêche cette dernière de joindre Bcl-XL pour qu'ils forment des pores dans la membrane de la mitochondrie et libèrent le cytochrome c (Cantley, 2002, Vivanco and Sawyers, 2002). De plus, Akt peut phosphoryler la procaspase-9, ce qui empêche celle-ci de participer à la formation de l'apoptosome et

ainsi l'inactive (Cardone et al., 1998). La protéine Akt peut interagir avec la protéine I_KB-Kinase (IKK) pour l'activer. IKK activée va dégrader l'inhibiteur de NF-κB (I_KB); le facteur de transcription du « nuclear factor-kappa B » (NF-κB) pourra activer ses gènes cibles (voir la figure 1.10 à la page 47) (Vivanco and Sawyers, 2002, Lamkanfi et al., 2006).

La protéine NF-κB est un hétérodimère de deux sous-unités (p50 et p65) reconnue pour activer plusieurs gènes (Orian et al., 1995). C'est un facteur de transcription jouant un rôle important dans l'inflammation, l'immunité, la prolifération cellulaire et l'apoptose (Viatour et al., 2005). Les gènes induits par NF-κB pour promouvoir la survie cellulaire ne sont pas tous identifiés. Il a cependant été montré que NF-κB contrôle la transcription de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) (Wu, 2005, Schmedtje et al., 1997). Les cyclo-oxygénases 1 et 2 (COX-1 et COX-2) sont des enzymes de 72 kDa qui interviennent dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine. La surexpression de COX-2, et par le fait même la sur synthèse de prostaglandine E2 (PGE2), inhibe l'apoptose et induit la prolifération cellulaire (figure 1.10 à la page 47) (Tsujii and Dubois, 1995, DuBois et al., 1996, Schmedtje et al., 1997). D'autres études ont montré que NF-κB joue un rôle dans la régulation de l'expression des inhibiteurs d'apoptose (IAPs) tels que c-IAP1 et c-IAP-2 (Chu et al., 1997, LaCasse et al., 1998).

1.6.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose.

Les protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) ont comme fonction intrinsèque de réguler la cascade des caspases. La famille des IAPs inclut c-IAP1, c-IAP2 et l'IAP lié au chromosome X (XIAP) (Yin and Dong, 2003). Le gène des IAPs a été identifié pour la première fois dans un baculovirus, puisqu'il protégeait les cellules infectées de ce virus de la mort cellulaire (Crook et al., 1993, Yang and Li, 2000). Les six IAPs qui ont

été identifiées chez l'homme sont : NAIP, c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP Survivin et « BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme » (BRUCE) (Deveraux and Reed, 1999). Toutes ces protéines ont montré des propriétés anti-apoptotiques dans différents systèmes (Harlin et al., 2001).

Généralement, la structure des IAPs est composée d'un à trois domaines nommés « Baculovirus Inhibitor Repeat » (BIR) qui inhibent directement les caspases (Yang and Li, 2000). Plusieurs IAPs possèdent un domaine en doigt de zinc dans l'extrémité carboxylée de la protéine, ce domaine étant défini par sept cystéines et une histidine qui peuvent être coordonnées avec un atome de zinc, nommée RING pour « really Interesting New Gene » (Yang and Li, 2000, LaCasse et al., 1998). Le domaine RING dispose d'une activité E3 ubiquitine ligase qui induit le transfert d'ubiquitine activée sur un résidu de lysine de la protéine cible préalablement reconnue. Une chaîne de polyubiquitine est formée par l'ajout subséquent d'ubiquitine activée sur les résidus de lysine du conjugué ubiquitine-protéines cibles précédentes. Le protéasome reconnaît et dégrade les protéines qui sont modifiées par l'ajout d'une chaîne polyubiquitine. Ainsi, le protéasome dégrade les protéines cibles des IAPs polyubiquitinées par le domaine RING que possèdent les IAPs (Yang and Li, 2000, Hershko and Ciechanover, 1998). Une étude a montré que les protéines c-IAP1, c-IAP2 et XIAP pouvaient catalyser leur propre ubiquitination (Yang and Li, 2000, Yang et al., 2000). Les inhibiteurs de caspases c-IAP1 et c-IAP2 possèdent chacun un domaine de recrutement des caspases (CARD) situé entre le domaine BIR et le domaine RING. Il a été montré que XIAP était constitué de trois domaines BIR et d'un domaine RING (Deveraux and Reed, 1999). Il a été aussi montré que c-IAP1, c-IAP2 et XIAP inhibent directement les deux types de caspases, soit les initiatrices (caspases-9) et les effectrices (caspases-3-6-7) (Deveraux and Reed, 1999). Plus précisément, c-IAP1, c-IAP2 et XIAP inhibent spécifiquement la caspase-3 activée et la caspase-7 activée (Yin and Dong, 2003, Yang and Li, 2000, Deveraux and Reed, 1999). Les inhibiteurs de caspases XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 peuvent aussi inhiber la caspase-9 activée et lier la procaspase-9 pour prévenir son activation par une stimulation proapoptotique (Yang and Li, 2000, Deveraux and Reed, 1999). En

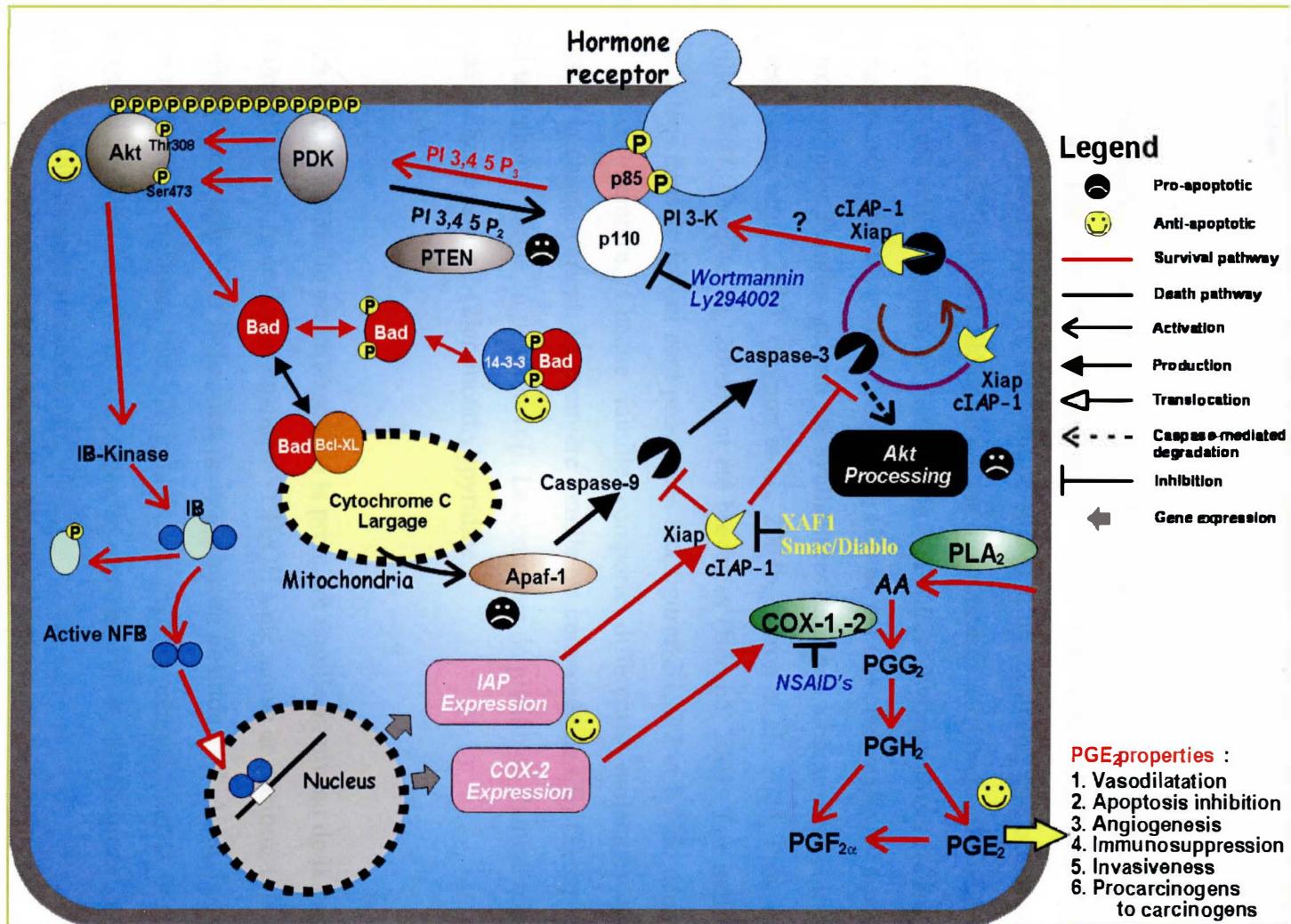
contrepartie, l'activité anti-apoptotique de XIAP est réduite par d'autres protéines telles « XIAP-associated factor 1 » (XAF1) (Liston et al., 2001) et la protéine mitochondriale nommée Smac/DIABLO (Nicholson, 2001, Shibata et al., 2007). Le mode d'action de Smac/DIABLO est une compétition de liaison pour le site de XIAP qui sert à l'inhibition de la caspase-9 activée (Nicholson, 2001).

D'autres études ont montré que les IAPs pouvaient inhiber l'apoptose par des mécanismes parallèles qui ne nécessitent aucune interaction avec les caspases (Deveraux and Reed, 1999, Yang and Li, 2000, LaCasse et al., 1998). En fait, la suppression de l'apoptose par les IAP peut aussi passer par la modulation de différentes voies de signalisations telles la voie de NF-κB (Hofer-Warbinek et al., 2000, Levkau et al., 2001), la voie de c-Jun-N-terminal kinase (JNK)(Sanna et al., 2002, Sanna et al., 1998) et la voie PI3K/Akt (Asselin et al., 2001). Il a en effet été montré que XIAP peut former un complexe avec le « transforming growth factor-beta-activated kinase 1 » (TAK1) et son cofacteur « TAK1-binding protein 1 » (TAB1) qui mène à l'activation de JNK. La kinase JNK activée va initier la phosphorylation de MAPK (« mitogen-activating protein kinase ») qui, par une cascade successive de phosphorylation, va conduire à l'activation de NF-κB (Schimmer et al., 2006, Sanna et al., 1998, Sanna et al., 2002). L'inhibiteur de caspases XIAP active également NF-κB par une translocation de NF-κB dans le noyau (Hofer-Warbinek et al., 2000) et par la promotion de la dégradation de la protéine IκB (inhibiteur de NF-κB) via la stimulation de IKK (Schimmer et al., 2006, Levkau et al., 2001). La dégradation de IκB par XIAP amplifie la portée de XIAP par un effet de boucle d'amplification puisque NF-κB induit la transcription de XIAP (LaCasse et al., 1998). De plus, il a été montré que l'activation de NF-κB et de JNK par XIAP nécessite l'activité E3 ubiquitine ligase du domaine RING et que cette activation peut être dissociée du pouvoir d'inhibition des caspases de XIAP (Schimmer et al., 2006, Lewis et al., 2004).

La modulation de la voie PI3K/Akt par XIAP a été associée par une étude à la chimiorésistance des cellules ovariennes cancéreuses (Asselin et al., 2001). Cette même étude a montré que le cisplatine diminuait l'abondance de la protéine XIAP, induisait le clivage de la protéine Akt et induisait l'apoptose chez des cellules ovariennes cancéreuses sensibles à la chimiothérapie (Asselin et al., 2001). De plus, il a été montré que la surexpression de XIAP empêche l'apoptose induite par le cisplatine et induit une augmentation de la forme active de la protéine Akt (P-Akt). La résistance induite par XIAP face au cisplatine est donc attribuée en partie à une augmentation de l'activité de la voie PI3K/Akt. Le mécanisme moléculaire par lequel XIAP module la voie de survie cellulaire PI3K/Akt reste par contre à déterminer (Asselin et al., 2001).

Les études sur les IAPs montrent plusieurs évidences que cette famille de protéines joue un rôle dans l'oncogenèse. L'implication des IAPs dans le cancer est attribuable aux deux points suivants: l'expression dans les cellules cancéreuses de l'IAP nommé Survivin qui, normalement, n'est pas exprimé dans les cellules des tissus différenciés (LaCasse et al., 1998), les effets anti-apoptotiques des IAPs via le facteur de transcription NF-κB (LaCasse et al., 1998) et l'inhibition des caspases par les IAPs (Deveraux and Reed, 1999).

FIGURE 1.10 : Schéma représentant les différents acteurs de l'apoptose et des sentiers de la survie cellulaire. Image produite par Dr. Éric Asselin. Les flèches rouges représentent les sentiers de survie cellulaire dont les principaux acteurs sont Akt, P-Akt, Bad et les IAPs. Les flèches noires représentent les voies de l'apoptose dont les protéines clefs sont les caspases -3 et -9, le complexe Apaf-1.



1.7 Présentation des molécules

Des nouveaux complexes de platine(II) liés à des E₂ (1) par une chaîne alkyle en position 16 α et 16 β ont été développés et testés. Ces molécules nouvellement synthétisées s'inscrivent dans une stratégie de ciblage d'un récepteur, en l'occurrence le RE α , pour augmenter la sélectivité du cisplatine. Pour assurer une bonne affinité entre le récepteur et la molécule hybride, un dérivé de la 2-(2'-aminéthyl)pyridine a été combiné avec un noyau stéroïdien naturel (l'œstradiol E₂ (1)) lié par une chaîne alkyle en position 16. Les trois grandes familles qui ont été synthétisées dans nos laboratoires (voir figure 1.11) (Descôteaux et al., 2003, Gagnon et al., 2004b, Perron et al., 2005, Provencher-Mandeville, 2007, Descôteaux, 2006) ont été brevetées (Bérubé, 2003). Les molécules hybrides testées dans ce travail sont présentées aux figures 2.1, 2.2 et 2.3 du deuxième chapitre de ce mémoire. Chaque famille comporte différentes molécules où les longueurs de la chaîne varient. La première famille est composée de l'E₂ (1) sur lequel on a fixé une chaîne alkyle en position 16 β . Le complexe de platine où l'amine retrouvé au bout de la chaîne est un 2-(2'aminéthyl)pyridine.

La deuxième famille est différente de la première famille au niveau de la position où la chaîne alkyle est fixée. Un groupement -CH₂OH a été ajouté en position 16 β sur le noyau stéroïde pour empêcher la fixation de la chaîne en position 16 β . Ainsi, la chaîne alkyle se retrouve en position 16 α . Ce groupement hydroxyméthyle rend la molécule plus polaire et stabilise la position 16. Ainsi, le changement de stéréochimie entre la position 16 α et 16 β ne peut plus avoir lieu.

La troisième famille est similaire à la deuxième famille, c'est-à-dire qu'elle possède aussi un groupement -CH₂OH en position 16 β . Par contre, une chaîne de type polyéthylène glycol a été ajoutée, ce qui introduit dans la chaîne alkyle reliant l'E₂ (1) au complexe de platine des atomes d'oxygène. La chaîne de type polyéthylène glycol a

comme avantage d'empêcher une variation dans la polarité malgré son allongement, contrairement à la chaîne alkyle qui rend la molécule plus hydrophobe avec l'augmentation de sa longueur (Provencher-Mandeville, 2007).

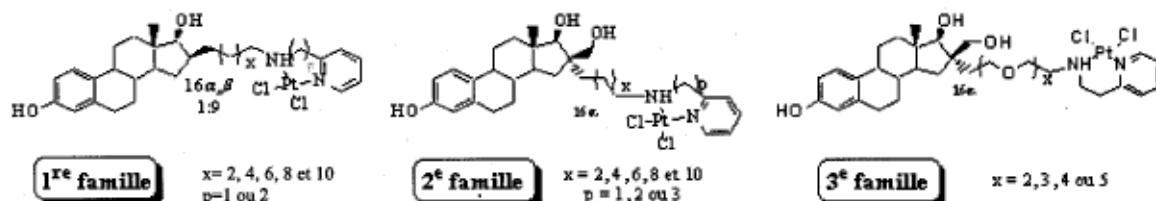


FIGURE 1.11 : Représentation schématique des structures générales des trois familles de molécules développées. Les trois familles sont composées d'un noyau d'œstradiol et d'un complexe de platine dérivé reliés par une chaîne alkyle dont la longueur varie ($x = 2, 4, 6, 8$ et 10). Pour la première famille, la chaîne alkyle se lie en position 16β sur le noyau d'œstradiol. Pour la deuxième et la troisième famille, les chaînes alkyles se lient en position 16α sur le noyau d'œstradiol.

1.7.1 Travaux antérieurs

Trois articles publiés étaient l'avancement de nos recherches pour ce projet. Le premier article publié en 2003 relate la synthèse de nouvelles familles de complexes $E_2\text{-Pt(II)}$ (voir figure 1.11). Cet article présente l'inhibition de prolifération *in vitro* sur des cellules cancéreuses du sein dépendantes et indépendantes de l' E_2 (1) traitées avec des molécules des deux premières familles. Ces études ont montré par essai de prolifération que certaines conformations des hybrides $E_2\text{-Pt(II)}$ n'ont aucun effet comparé à la cisplatin (2) et que d'autres sont beaucoup plus toxiques, jusqu'à quatre fois plus. Aucune sélectivité n'a cependant été montrée pour la deuxième famille (Descôteaux et al., 2003).

Le deuxième article publié en 2004 expose des essais de prolifération sur des lignées cancéreuses des ovaires et de l'utérus dépendantes et indépendantes de l'estrogène *in vitro* traitées avec des molécules membres de la deuxième famille (figure 1.11). Suite aux expérimentations deux membres de la famille ont montré une toxicité jusqu'à sept fois plus élevée que la cisplatine. De plus, des molécules ont montré une cytotoxicité sur une lignée résistante au cisplatine (2) (A2780cp). Dans cet article, il a été montré que les molécules les plus toxiques montraient une affinité pour le RE α . Cette affinité serait due à la conformation de la molécule qui permet un lien hydrogène en plus avec le récepteur, ce qui a été confirmé par des études de modélisation moléculaire présentées dans ce même article (Gagnon et al., 2004b).

Le troisième article expose la synthèse de la première famille d'hybrides E₂-Pt(II) (figure 1.11). Dans cette étude, il a été montré que les hybrides E₂-Pt(II) avaient une inhibition de prolifération contre deux lignées cellulaires cancéreuses du sein, qu'ils avaient une affinité pour le RE α . De plus, les molécules ont été testées sur des lignées cancéreuses où l'œstradiol est inactif, tels que cancer de la peau (B16-F10) et de l'intestin (HT-29). Il a été montré une toxicité des hybrides E₂-Pt(II) plus forte que le cisplatine (2) (Perron et al., 2005).

1.8 Buts du projet de maîtrise.

Pour la première famille, seules deux molécules hybrides se sont démarquées (Gagnon et al., 2004b). Ces deux hybrides ont montré une bonne affinité au RE α et une inhibition de prolifération de lignée cancéreuse de l'utérus et de l'ovaire (Gagnon et al., 2004b). Par contre, l'affinité des hybrides E₂-Pt(II) de la première famille avec le RE β n'a pas été évaluée. La longueur de chaîne des hybrides E₂-Pt(II) ayant des effets cytotoxiques maximum n'a pas non plus été identifiée. Le mode d'action de ces molécules, c'est-à-dire l'identification des voies de l'apoptose induites par ces

molécules, n'a pas été mis en évidence. Ni la mort cellulaire par apoptose, ni l'activation du RE α n'ont été montrées. Finalement, le potentiel chimiothérapeutique n'a pas été déterminé. Le présent projet d'étude a été fait *in vitro* en comparant des cellules cancéreuses du sein RE α + et RE α - et *in vivo* sur deux modèles animaux complémentaires.

L'objectif général de ce projet consiste à un dépistage du ou des meilleurs hybrides des trois familles d'hybrides E₂-Pt(II) comme agents chimiothérapeutiques spécifique. Plus précisément, les objectifs de ce projet de maîtrise sont :

- 1) Évaluer l'affinité des hybrides E₂-Pt(II) de la première famille avec le RE α et le RE β .
- 2) Montrer que les hybrides E₂-Pt(II) de la première famille ayant une grande affinité avec les récepteurs à l'estrogène ont aussi une cytotoxicité plus élevée que le cisplatine (2).
- 3) Montrer que les hybrides E₂-Pt(II) de la troisième famille induisent une inhibition de la prolifération cellulaire.
- 4) Comprendre le mode d'action des hybrides E₂-Pt(II) les plus actifs de la première et de la deuxième famille en identifiant les cascades des caspases induites *in vitro* et montrer que l'apoptose est induite par ces hybrides.
- 5) Montrer l'activation du RE α par un des hybrides E₂-Pt(II).
- 6) Observer les hybrides E₂-Pt(II) les plus toxiques *in vitro* dans un organisme vivant (mode d'action, effets secondaires, interaction avec le système immunitaire) et montrer qu'ils peuvent atteindre la tumeur pour la faire régresser. En d'autres mots, évaluer le potentiel chimiothérapeutique *in vivo* pour valoriser le transfert du ou des composés d'un milieu *in vitro* à un milieu *in vivo*.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires humaines de cancer du sein (MDA-MB-468 (RE α), MDA-MB-231 (RE α) et MCF-7 (RE α)) proviennent de l'organisme « American Type Culture Collection » (ATCC, Manassa, VA, USA). Les cellules ont été maintenues en culture dans des boîtes de culture de 75 cm² à une température de 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Les lignées MDA-MB-468, MDA-MB-231 et MCF-7 ont été maintenues dans le milieu RPMI 1640 (HyQ® RPMI1640 medium 1x, Hyclone, Logan, UT, USA) additionné respectivement de 10 %, 5 % et 5 % de « Bovin Growth Serum »(BGS, Hyclone, UT, USA), aussi additionné de gentamicine (gentamicine sulfat salt, Sigma, St-Louis, MO USA) à une concentration de 50 µg/ml. Les cellules ont été maintenues en culture par des passages cellulaires qui ont été faits par trypsinisation (0,25 % trypsin, 0,03 % EDTA, TrypLE™ Express, Gibco, Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ont, Ca) lorsque la confluence recherchée était atteinte.

2.2 Présentation des structures des composés anticancéreux testés

Les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille qui ont été testées présentaient différentes longueurs de chaîne. Elles sont présentées à la figure 2.2 où les différentes valeurs de « n » représentent les différentes longueurs de chaîne. On observe sur cette figure la molécule **4a** dont n=4 et qui comprend une chaîne avec 6 carbones, la molécule **4b** dont n=6 et qui comprend une chaîne avec 8 carbones, la molécule **4c** dont

$n=9$ et qui comprend une chaîne avec 11 carbones ainsi que la molécule **4d** dont $n=12$ et qui comprend une chaîne avec 14 carbones. Les molécules hybrides $E_2\text{-Pt(II)}$ de la première famille ont été synthétisées selon le mémoire de Caroline Descôteaux (Descôteaux, 2006).

Les molécules hybrides $E_2\text{-Pt(II)}$ de la troisième famille qui ont été testées présentaient différentes longueurs de chaîne. Elles sont présentées à la figure 2.3 où les différentes valeurs de « n » représentent les différentes longueurs de chaîne. On observe sur cette figure la molécule **5a** dont $n=1$ et qui comprend une chaîne avec 5 atomes, la molécule **5b** dont $n=2$ et qui comprend une chaîne avec 8 atomes, la molécule **5c** dont $n=3$ et qui comprend une chaîne avec 11 atomes, la molécule **5d** dont $n=4$ et qui comprend une chaîne avec 14 atomes ainsi que la molécule **5e** dont $n=5$ et qui comprend une chaîne avec 17 atomes. Les molécules hybrides $E_2\text{-Pt(II)}$ de la troisième famille ont été synthétisées selon le mémoire de Josée Mandville-Provencher (Provencher-Mandeville, 2007).

Les molécules d'intérêt ont été comparées à plusieurs égards avec des molécules de référence telles l' E_2 (**1**), le cisplatine (**2**) et un hybride $E_2\text{-Pt(II)}$ de la deuxième famille (**3**) dont $n=8$ comprenant une chaîne à 10 carbones. Cet hybride a montré des effets d'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses concluants lors de travaux antérieurs. L'hybride $E_2\text{-Pt(II)}$ de la deuxième famille de référence a été synthétisé selon l'article suivant : Descôteaux C., Provencher-Mandeville J., Mathieu I., Perron V., Mandal S.K., Asselin E., Bérubé G., Synthesis of 17-Estradiol Platinum(II) Complexes: Biological Evaluation on Breast Cancer Cell Lines, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13 (2003) 3927–3931 et le cisplatine provenait de Sigma (St-Louis, MO USA), l' E_2 (**1**) provenait de Sigma (St-Louis, MO USA). Les structures de l' E_2 (**1**), du cisplatine (**2**) ont été présentées respectivement aux figures 1.1 et 1.8. La structure de l'hybride $E_2\text{-Pt(II)}$ (**3**) de la deuxième famille est présentée à la figure 2.1.

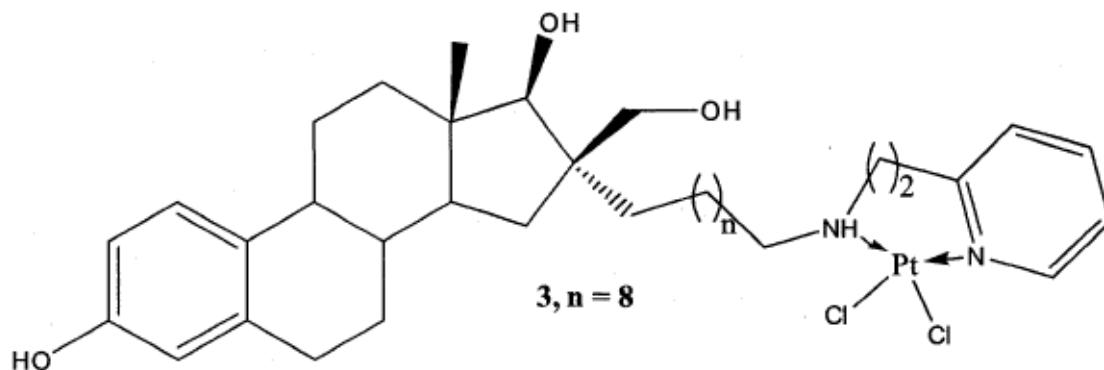


FIGURE 2.1: Structure de la molécule l'hybride E₂-Pt(II) de la deuxième famille (3) servant de molécule de référence. Cet hybride (3) dont n = 8 comprend une chaîne alkyle à 10 carbones reliant le noyau d'œstrogène au dérivé du cisplatine.

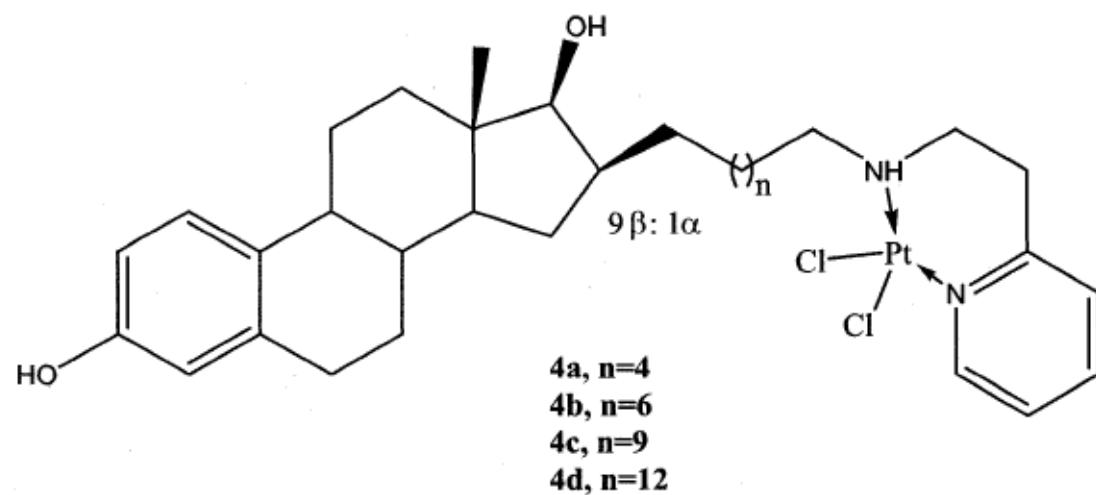


FIGURE 2.2: Molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (4a-d) testées dans le cadre de ce projet de maîtrise. Les hybrides 4a(n=4), 4b(n=6), 4c(n=9) et 4d(n=12) sont composés respectivement d'une chaîne alkyle à 6, 8, 11 et 14 carbones reliant le noyau d'œstrogène au dérivé du cisplatine.

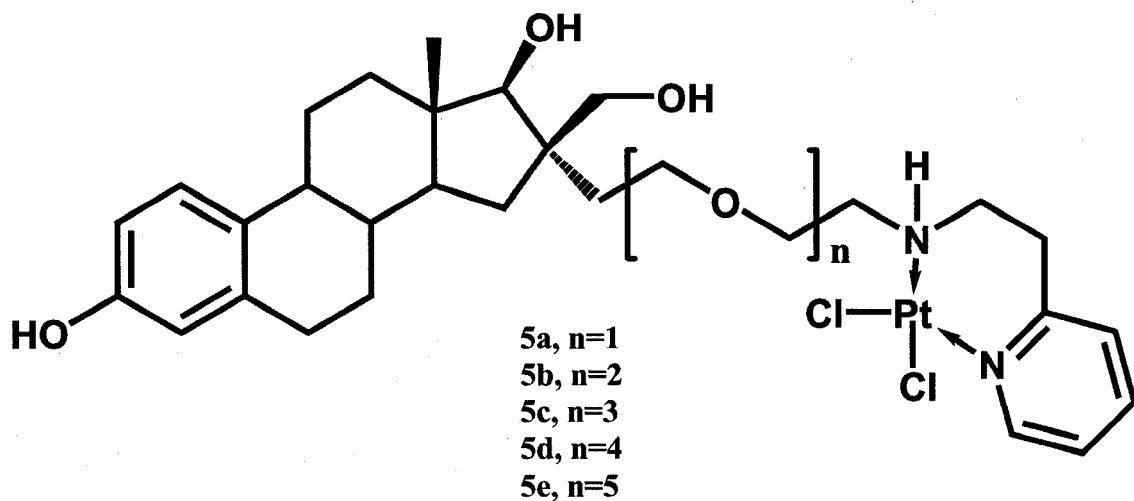


FIGURE 2.3: Molécules hybrides $E_2\text{-Pt(II)}$ de la troisième famille (5a-e) testées dans le cadre de ce projet de maîtrise. Les hybrides 5a($n=1$), 5b($n=2$), 5c($n=3$), 5d($n=4$) et 5e($n=5$) sont composés respectivement d'une chaîne alkyle à 5, 8, 11, 14 et 17 carbones reliant le noyau d'œstrogène au dérivé du cisplatine.

2.3 Test d'affinité du RE α et du RE β

Les tests d'affinité au RE α et au RE β ont été exécutés à l'aide du HitHunterTM EFC Estrogen Fluorescence Assay KitTM (Discoverx, Fremont, CA, USA) selon les instructions du manufacturier. La fluorescence a été lue avec le FLUOstar OPTIMA (BMGLabTechnologies GmgH, Durham, NC, USA) à une longueur d'onde d'excitation de 544 nm et à une longueur d'onde d'émission de 612 nm. Ce test mesure la compétition entre l'œstradiol et ses analogues lors de la fixation sur l'RE.

Le test est composé d'une enzyme séparée en deux parties, l'enzyme donneur (ED) et l'enzyme accepteur (EA). L'ED est conjugué au ligand du récepteur (œstradiol-ED) et l'EA est libre. L'émission d'un signal se fait seulement si l'enzyme est

reconstituée (liaison de l'œstradiol-ED avec EA). De plus, le RE est présent sous forme de protéine recombinante. Donc, lorsque la partie œstradiol du conjugué à l'enzyme (œstradiol-ED) se fixe au récepteur, il n'y a pas de signal émis puisque cette liaison ne permet pas à l'enzyme d'être reconstituée. Par contre, si la partie œstradiol du conjugué à l'enzyme (œstradiol-ED) ne peut pas se fixer au récepteur, l'enzyme peut être reconstituée, ce qui permet l'émission d'un signal. Ainsi, lorsqu'on ajoute des molécules qui ont une affinité pour le récepteur, on observe une compétition pour lier le récepteur. Plus les molécules d'intérêt ont une affinité pour le récepteur, moins le ligand peut se fixer sur le récepteur, plus il y a un signal d'émis par la reconstitution de l'enzyme et inversement si la molécule d'intérêt a peu d'affinité pour le récepteur. Le principe schématisé du test de l'affinité est présenté à la figure 2.4 de ce travail. Le test d'affinité aux RE α et RE β a été exécuté avec les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (figure 2.2) (**4a** (6 carbones), **4b** (8 carbones), **4c** (11 carbones)) en comparaison avec le β -œstradiol (**1**) et le cisplatine (**2**). Les résultats ont été exprimés selon un pourcentage des puits contrôles dans les graphiques de la figure 3.1 A et 3.1 B. Les concentrations des complexes hybrides requises pour obtenir une réponse de 50 % de la réponse maximum (EC₅₀) tirée de la figure 3.1 A et 3.1 B, et ce, pour les REs α et β sont présentées dans le tableau 3.1.

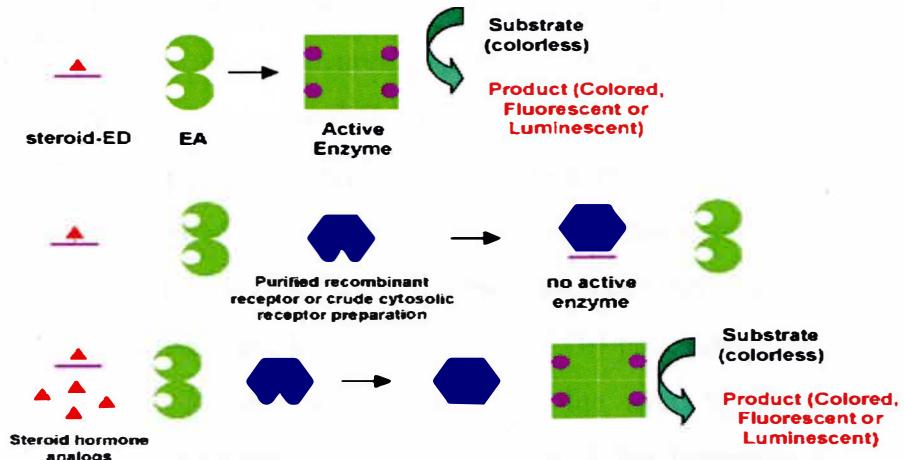


FIGURE 2.4: Principe schématisé du test de l'affinité adapté selon le protocole de HitHunter™ EFC Estrogen Fluorescence (Discoverx, Fremont, CA). Ce test mesure la compétition entre l'œstradiol-ED et ses analogues lors de la fixation sur l'RE recombinant. L'émission du signal se fait seulement si l'enzyme est reconstituée (liaison de l'œstradiol-ED avec EA).

2.4 Évaluation de l'effet des composés hybrides sur la prolifération des cellules de carcinome mammaire par essais de prolifération (MTT)

Les lignées MDA-MB-468, MDA-MB-231 et MCF-7 ont été ensemencées à une densité respectivement de $11,11 \times 10^4$ cellules/puits, $13,88 \times 10^4$ cellules/puits et $10,00 \times 10^4$ cellules/puits dans des plaques de 96 puits 24 heures avant le début du test dans un milieu avec sérum et gentamicine (tel que décrit dans la section culture cellulaire). Les cellules ont été mises en contact avec les molécules hybrides E₂-Pt(II) pour des périodes de 24, 48 et 72 heures. Les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (figure 2.2) (**4a** (6 carbones), **4b** (8 carbones), **4c** (11 carbones), **4d** (14 carbones)) en comparaison avec le cisplatine (**2**) et les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la troisième famille (figure 2.3) (**5a** (5 atomes), **5b** (8 atomes), **5c** (11 atomes), **5d** (14 atomes), **5e** (17 atomes)) ont été testées selon une courbe dose réponse. Des puits n'ont pas été traités pour chacune des molécules testées; seul le diluant (0.1 % Cremophore EL:éthanol (EtOH) (1:1) (Sigma Chemical Co., Missisauga, Ontario)) était présent. Ces puits non traités correspondent aux puits contrôles. 10 µl d'une solution à 5 mg/ml de 3-(4,5-diméthyle tyazol-2-yl)-2,5 diphényltetrazolium bromide (Formazan, Sigma, St-Louis, MO USA) a été ajouté 3 heures 30 minutes avant la fin du temps prévu à chacun des puits. Les cellules qui ont proliféré ont transformé ce composé jaune en précipité mauve. À la fin de l'essai, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 100µl de la solution de solubilisation (10 % dodécyl sulfate de sodium (SDS) (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Qc, Ca) dans 0.01 M HCl (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA) à chacun des puits. Les plaques ont été incubées toute la nuit (37°C, 5 % CO₂) pour permettre la solubilisation du précipité mauve. La densité optique a été lue avec le FLUOstar OPTIMA (BMGLabTechnologies GmgH, Durham, NC, USA) à des longueurs d'onde de 550 à 600 nm. Les résultats ont été exprimés selon un pourcentage de la prolifération cellulaire des puits contrôles. Ce test a été exécuté en duplicita de trois à six reprises indépendantes.

2.5 Évaluation des voies de signalisation cellulaire activées par les molécules testées

Les lignées MDA-MB-468 et MCF-7 ont été ensemencées à une densité de 3×10^6 cellules/pétri dans des pétris de 100 mm dans un milieu avec sérum et gentamicine (tel que décrit dans la section culture cellulaire). Le traitement a été fait 24 heures après l'ensemencement avec une confluence de 50 % pour chaque pétri. Les cellules ont été exposées de façon continue à l'hybride E₂-Pt(II) (**4c** (11 carbones)) et aux molécules de référence (**2** et **3**) pour une durée de 24 heures à différentes concentrations (0 μ M, 1 μ M et 10 μ M) avec le diluant à 0.1 % Cremophore EL:éthanol (EtOH) (1:1) (Sigma Chemical Co., Missisauga, Ontario). À la fin du temps d'incubation, les cellules ont été récoltées avec la trypsine (0,25 % trypsin, 0,03 % EDTA, TrypLE™ Express, Gibco, Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ont, Ca). Après deux lavages au tampon phosphate salin (PBS) stérile, 10 μ l ont été déposées dans des tubes contenant du Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co., Missisauga, Ontario) dilués à 1/1000 dans la formaline 10 % (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA). L'extraction des protéines et à l'analyse par immunobuvardage ont été exécutés avec le volume restant. Ce test a été exécuté de trois à quatre reprises indépendantes.

2.6 Extraction des protéines et analyse par Western Blot

Le volume restant des cellules trypsiniées ont été lysées avec du tampon de lyse RIPA (pH 7,4 , 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium désoxycholate, 1 % NP-40 dans du PBS) complété d'inhibiteurs de protéases (Complet mini, Roche Diagnostic Canada, Laval, Canada). Elles ont été gelées et dégelées trois fois. Elles ont été centrifugées (13 000 X G, 20 min à 4°C) et le surnageant a été transféré et gardé à -20°C en attendant l'analyse.

Par la suite, la concentration en protéines a été déterminée avec le Bio-Rad DC Protein Assay (BioRad, Mississauga Ont., Ca). Les protéines extraites (50 µg) ont été chauffées (95°C, 3 minutes) et séparées par un gel d'électrophorèse (PAGE) 10 % SDS-polyacrylamide (Laboratoire MAT Inc., Beauport, Qc, Ca). Elles ont ensuite été électro-transférées (15 V, 30 minutes) sur une membrane de nitrocellulose (BioRad, Mississauga Ont., Ca) à l'aide du «Trans-blot semi-dry Electrophoretic transfer cell» (BioRad, Mississauga Ont., Ca). Les membranes ont par la suite été bloquées (2 heures, température pièce) avec du PBS contenant 5 % de lait écrémé en poudre et 0,05 % de Tween 20 (EMDTM Omny Pure, Darmstadt, Allemagne) et ont subseqüemment été incubées avec les anticorps anti- caspase-9 clivée (1/1000), caspase-7 clivée (1/1000), caspase-3 clivée (1/1500), PARP clivée (1/1500), XIAP (1/2000), Akt (1/2000) et P-Akt (1/1000) (Cells Signaling Technology Inc., Boston, MA, USA) toute la nuit à 4°C avec une faible agitation. Elles ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires anti-lapin « horse radish peroxidase » (HRP)-conjugués (1/4000) (Bio-Rad, Mississauga, Ont, Ca) ou anti-souris « horse radish peroxidase » (HRP)-conjugués (1/3000) (Bio-Rad, Mississauga, Ont, Ca). Un anticorps conjugué à la peroxydase dirigé contre la β-actine (1/40 000) (Monoclonal Anti-β-actine conjugué à la peroxydase, Clone AC-15, Sigma, St-Louis, MO USA)) a été utilisé comme contrôle de chargement des puits des gels. L'activité de la peroxydase a été visualisée avec l'addition du Super Signal[®] West Femto maximum sensitivity substratTM (Pierce, Arlington Heights, IL, USA) en suivant le protocole de ce manufacturier.

2.7 Évaluation de l'activation du récepteur alpha

L'activation du RE α par les molécules à l'étude a été évaluée grâce à la transfection transitoire d'un gène rapporteur. Le gène rapporteur contenu dans le plasmide transfété codait pour la luciférase. Ce plasmide possédait des éléments du « estrogen response element » (ERE) dans son promoteur (figure 2.5). Plus précisément, la séquence consensus du ERE a été ajoutée entre les deux sites où les enzymes de

restriction *NheI*(22) et *BglII*(28) sont actives. La séquence détaillée du plasmide est présentée à l'annexe E de ce travail. Le ERE est spécifiquement activé par les RE α activés. L'expression du gène codant pour la protéine de la luciférase était tributaire de l'activation du ERE par le RE α activé. La luciférase est une enzyme naturellement exprimée par des espèces de la famille des Lampyridés (lucioles) (*Lampyridae*). L'oxydation de la luciférine par la luciférase produit une lumière. Plus la luciférase pouvait convertir son substrat en signal luminescent, plus le ERE était activé par le RE α activé. La présence de luciférase était détectée par lecture de la luminescence.

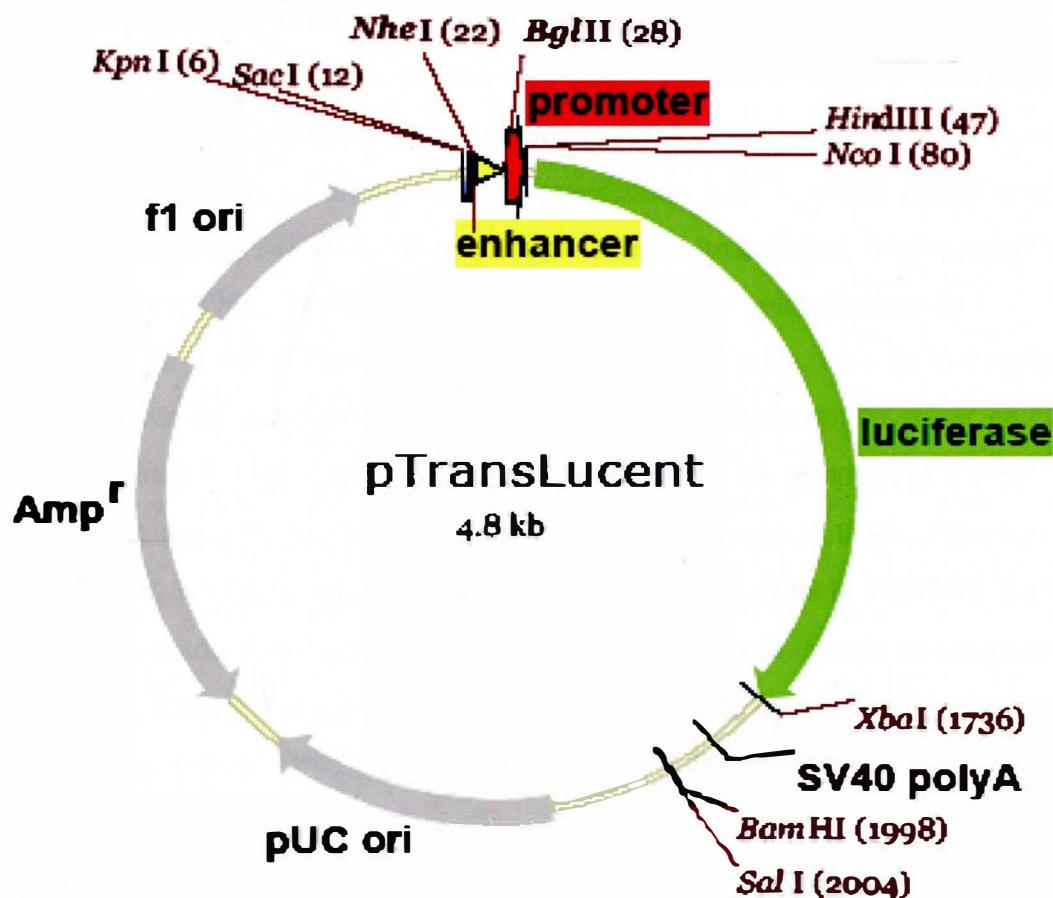


FIGURE 2.5: Carte schématisée du plasmide Translucent ERE Reporter Vector, 4.8 Kb, Panomics Inc., Fremont, CA, USA. Les éléments du ERE sont insérés dans le promoteur du plasmide entre les sites de restriction *NheI* et *BglII*. L'activation du promoteur entraîne l'expression de la luciférase.

Les hormones stéroïdiennes font partie des éléments nutritionnels et hormonaux présents dans le sérum (Barnes et Sato, 1980). Le rouge de phénol contenu dans le milieu de culture comme indicateur de pH possède un effet œstrogénique (Berthois et al., 1986). Pour ne pas interférer dans l'activation du ERE par les ERs activés, ces sources d'activation des ERs ont été éliminées du milieu de culture des cellules pour l'exécution de cette technique. Le milieu utilisé ne contenait pas de rouge de phénol, donc pas d'indicateur de pH et le sérum ajouté avait été préalablement traité au charbon-dextran (D.C.). Le traitement du sérum au D.C. permet d'éliminer les hormones stéroïdiennes (Darbre et al., 1983). Les micropores du charbon activé emprisonnent les petites molécules tels les stéroïdes libres contenus dans le sérum alors que le dextran, un polymère de sucre, empêche les grosses molécules du sérum de pénétrer dans le charbon activé en l'entourant (Boxen et Tevaarwerk, 1982). Les cellules (MCF-7 (RE α)) ont donc été ensemencées 24 heures avant la transfection dans le milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol (RPMI 1640 +L-glutamine –Phenol Red, Gibco, Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ont., Ca) additionné de 10 % BGS traité préalablement au D.C., à une densité de $15,5 \times 10^4$ cellules/ml dans des plaques de 24 trous. Lors de la transfection, les cellules avaient une confluence de 50 à 70 %. Les cellules ont été mises en contact pendant 16 heures avec le plasmide rapporteur d'activité du récepteur α à l'œstrogène (0,9 μ g/trou) (Translucent ERE Reporter Vector, 4.8 Kb, Panomics Inc., Fremont, CA, USA) en utilisant comme agent de transfection le FuGENE 6 (Roche Diagnostic Canada, Laval, Canada) (1,8 μ l/trou) selon le protocole de ce manufacturier. Un plasmide vide activé constitutivement a été transfecté dans des trous témoins. Les trous qui n'ont pas été transfectés ont servi de contrôle de lecture de la luminescence.

Suite à la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS. Deux doses réponses ont été effectuées et ont été ajoutées aux trous transfectés. L'E₂ (1) (Sigma Chemical Co., Missisauga, Ontario) a été ajouté à des doses variant de 1 nM à 1000 nM avec un facteur de dix entre chaque dose. L'hybride E₂-Pt(II) 4c a été ajouté à des doses de 0,001 nM à 100 nM avec un facteur de dix entre chaque dose. Les trous transfectés qui n'ont reçu aucune des doses des deux stimulants ont servi de trous contrôles et correspondent à

la dose 0 nM. La récolte a été faite après 24 heures d'incubation. Les cellules ont été lysées avec le Cell Culture Lysis Reagent du Luciferase Assay SystemTM (Promega, Madison, WI, USA). Ces lysats ont été centrifugés 2 min à 12 000 G à 4 °C. Le surnageant recueilli est transféré dans un autre tube. Pour procéder à la lecture de la luminescence, les surnageants ont été dilués à raison de 20 µl de surnageant pour 100 µl de substrat de la luciférase (Luciferase Assay SubstrateTM, Promega, Madison, WI, USA) selon le protocole de ce manufacturier. La luminescence a été lue avec le FLUOstar OPTIMA (BMGLabTechnologies GmgH, Durham, NC, USA). L'intensité du signal lumineux est proportionnelle à la quantité de RE α activés dans les cellules par les molécules du traitement. Ce test a été exécuté en duplicita.

2.8 Effets des molécules d'intérêt sur des tumeurs *in vivo*

Deux modèles animaux complémentaires ont été utilisés afin de montrer les effets cytotoxiques des molécules *in vivo*. D'une part, les souris Nu/Nu athymiques (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada) xénogreffées permettent de tester *in vivo* certaines molécules hybrides E₂-Pt(II) sur des cellules humaines. Ce modèle possède par contre un système immunitaire diminué et les cellules cancéreuses ne font pas partie intégrante du système physiologique de l'animal. D'autre part, les rates Sprague-Dawley (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada) traitées avec du N-nitrosométhylurée (NMU) permettent de tester les molécules hybrides E2-Pt(II) *in vivo* dans un système physiologique complet. Les animaux ont été aléatoirement assignés en groupes de quatre par cage dans une pièce dont la température était maintenue à 20 °C et à 55 % d'humidité relative. Les animaux ont également été soumis à des cycles diurne: nocturne 12:12 et avaient libre accès à de l'eau et de la nourriture. La nourriture utilisée pour les souris est la nourriture irradiée picolab #5066 (C.R. Rodent 18% Vac-Pac) (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Canada). La nourriture utilisée pour les rates est la moulée RAT CHOW #5012 (Agribands Purina, Bécancour, Canada). Toutes les procédures concernant les animaux respectaient les normes du Conseil canadien de

protection des animaux et ont été approuvées par le Comité de bons soins aux animaux de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

2.8.1 Les souris

Les souris de race « nude », Nu/Nu athymiques (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada), âgées de six à huit semaines ont été xénogreffées sous-cutanées avec les lignées du cancer du sein (MCF-7(RE+) et MDA-MB-468 (RE-)). La croissance des tumeurs et le poids des souris ont été mesurés deux fois par semaine durant toute l'expérimentation. Un groupe de quatre souris a été injecté intrapéritonéale (i.p.) à 5 mg/kg/semaine avec du cisplatine (2) et un autre groupe de quatre souris a été injecté avec l'hybride E₂-Pt(II) 4c pour une durée de trois semaines. Le volume des tumeurs a été calculé en pourcentage du volume de la tumeur avant le début du traitement (jour 0), et le poids des souris a été calculé en pourcentage du poids initial du traitement (jour 0). La peau qui garde le pli imprimé par pincement et sa desquamation servaient d'indice de déshydratation des souris. À chaque manipulation des souris, la vigilance à l'apparition de ces symptômes de déshydratation et de perte de poids était de mise.

2.8.2 Les rates

Les rates de race Sprague-Dawley (Charles River, St-Hyacinthe, Qc, Canada), âgées de trois semaines, ont été injectées i.p. avec du NMU à 5 mg/Kg pour induire un carcinome mammaire. Un groupe de quatre rates ont été injectées intraveineux (i.v.) avec du cisplatine (2) et un autre groupe de quatre rates ont été injectées avec l'hybride E₂-Pt(II) 4b cinq semaines après l'induction au NMU pour une période de 25 jours (5 mg/kg). La croissance des tumeurs et le poids des rates ont été mesurés deux fois par

semaine durant toute l'expérimentation. Le volume des tumeurs a été calculé en pourcentage du volume de la tumeur avant le début du traitement (jour 0), et le poids des rates a été calculé en pourcentage du poids initial du traitement (jour 0). La peau qui garde le pli imprimé par pincement et une perte de couleur servaient d'indice de déshydratation des rates. À chaque manipulation des rates la vigilance à l'apparition de ces symptômes de déshydratation et de perte de poids était de mise.

2.9 Analyse statistique

Toutes les expériences sont répétées au minimum trois fois. Les données sont soumises à un test « one-way » ANOVA ou un test de Student. Les différences entre les groupes expérimentaux sont déterminées par le test de Turkey.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Affinité des molécules testées pour les récepteurs à l'œstrogène

L'affinité des complexes hybrides E_2 -Pt(II) avec les REs est nécessaire à la compréhension et la démonstration du mode d'action des molécules. La structure d'un ligand est un facteur important dans sa liaison à son récepteur attitré. La longueur de la chaîne alkyle, sa composition et la partie toxique des molécules sont des facteurs pouvant influencer la liaison au $RE\alpha$ et au $RE\beta$. À la suite des tests d'affinité dont les résultats sont présentés sur les figures 3.1 A et 3.1 B, il peut être observé que les courbes d'affinité des composés hybrides E_2 -Pt(II) **4a-c** se superposent à celle du 17 β -œstradiol (E_2 (**1**)) pour les deux isoformes des REs. Le cisplatine (**2**) n'a montré aucune affinité pour les REs α et β .

Il est possible d'illustrer les résultats des tests d'affinité sous forme de concentration effective à 50 % (EC_{50}). La valeur de l' EC_{50} correspond à la concentration de la molécule compétitive pour briser les liaisons ED-estrogène-récepteur à 50 % de la valeur contrôle. Les EC_{50} sont présentés au tableau 3.1. Ce tableau montre que les complexes hybrides E_2 -Pt(II) **4a-c** ont une affinité comparable à l'affinité du 17 β -œstradiol (**1**) pour les deux isoformes des REs. Les hybrides E_2 -Pt(II) **4a** et **4c**, qui ont respectivement une chaîne de six et de onze carbones, ont moins d'affinité avec le $RE\alpha$ qu'avec le $RE\beta$. L'hybride E_2 -Pt(II) **4b**, qui a une chaîne de huit carbones, a moins d'affinité avec le $RE\beta$ qu'avec le $RE\alpha$. Ces résultats montrent que les molécules hybrides E_2 -Pt(II) **4a-c** ont une affinité importante pour les $RE\alpha$ et $RE\beta$. La molécule hybride ayant la plus grande affinité avec le $RE\alpha$ est l'hybride E_2 -Pt(II) **4b**, et l'hybride ayant la plus grande affinité avec le $RE\beta$ est l'hybride E_2 -Pt(II) **4c**.

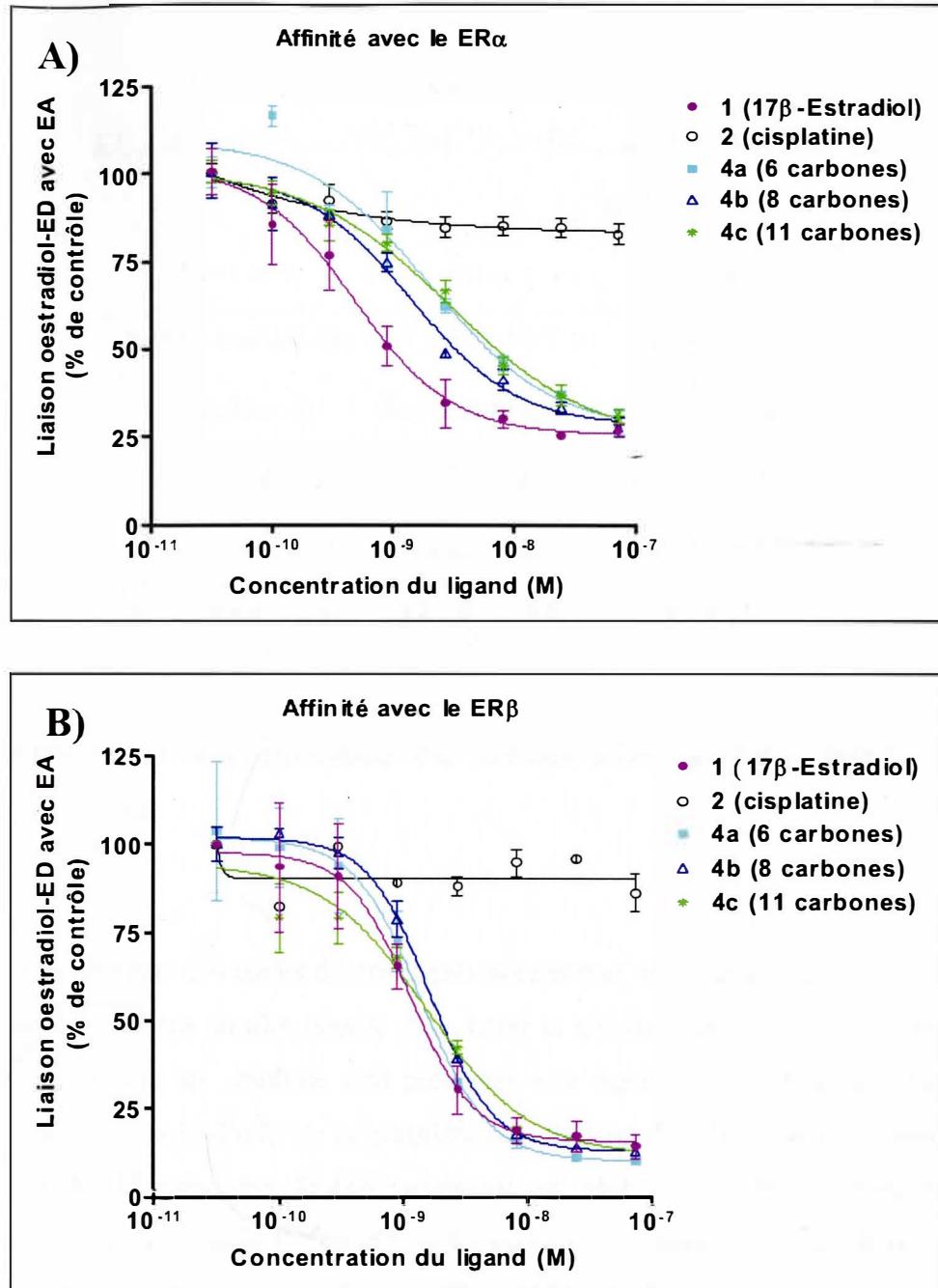


FIGURE 3.1 : A) Affinité de liaison au RE α du 17 β -œstradiol (1), des molécules hybrides E₂-Pt(II) 4a-c et du cisplatine (2). B) Affinité de liaison au RE β avec les mêmes molécules qu'en A. En A) et en B). Le 17 β -œstradiol (1) est représenté par un cercle plein rose, le 4a par un carré plein bleu pâle, le 4b par un triangle vide bleu, le 4c par un astérisque et le cisplatine (2) par un cercle vide noir. Les données représentent la moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

TABLEAU 3.1
EC₅₀ des molécules hybrides E₂-Pt(II) pour les RE α et RE β

Molécules	EC50 (M)	
	ER α	ER β
1 (17 β -estradiol)	$4,029 \times 10^{10}$	$9,306 \times 10^{10}$
2 (cisplatine)	Aucune affinité	Aucune affinité
4a (6 carbones)	$23,2 \times 10^{10}$	$18,25 \times 10^{10}$
4b (8 carbones)	$15,2 \times 10^{10}$	$16,51 \times 10^{10}$
4c (11 carbones)	$27,52 \times 10^{10}$	$14,89 \times 10^{10}$

3.2 Inhibition de la prolifération des cellules RE α + et RE α - induite par les molécules testées

Les résultats des essais de prolifération effectués avec les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (figure 2.2) selon la méthode décrite à la section 2.4 du chapitre 2, et dont les résultats sont présentés à la figure 3.2 montrent que toutes les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (figure 2.2) (**4a** (6 carbones), **4b** (8 carbones), **4c** (11 carbones), **4d** (14 carbones)) ont inhibé la prolifération cellulaire plus fortement que le cisplatine (2) pour tous les temps d'incubation. Ces résultats montrent aussi que la prolifération de la lignée MDA-MB-468 (RE α -) est plus inhibée que la prolifération de la lignée MCF-7 (RE α +). De plus, l'inhibition de 50 % par rapport au contrôle de la prolifération cellulaire des cellules MDA-MB-468 est atteinte avec une concentration moindre pour la plupart des molécules hybrides testées (figure 3.2). Les molécules hybrides E₂-Pt(II) **4c** et **4d**, soit les molécules présentant les plus longues chaînes des molécules testées de cette famille, sont les hybrides qui se démarquent pour l'inhibition de la prolifération cellulaire.

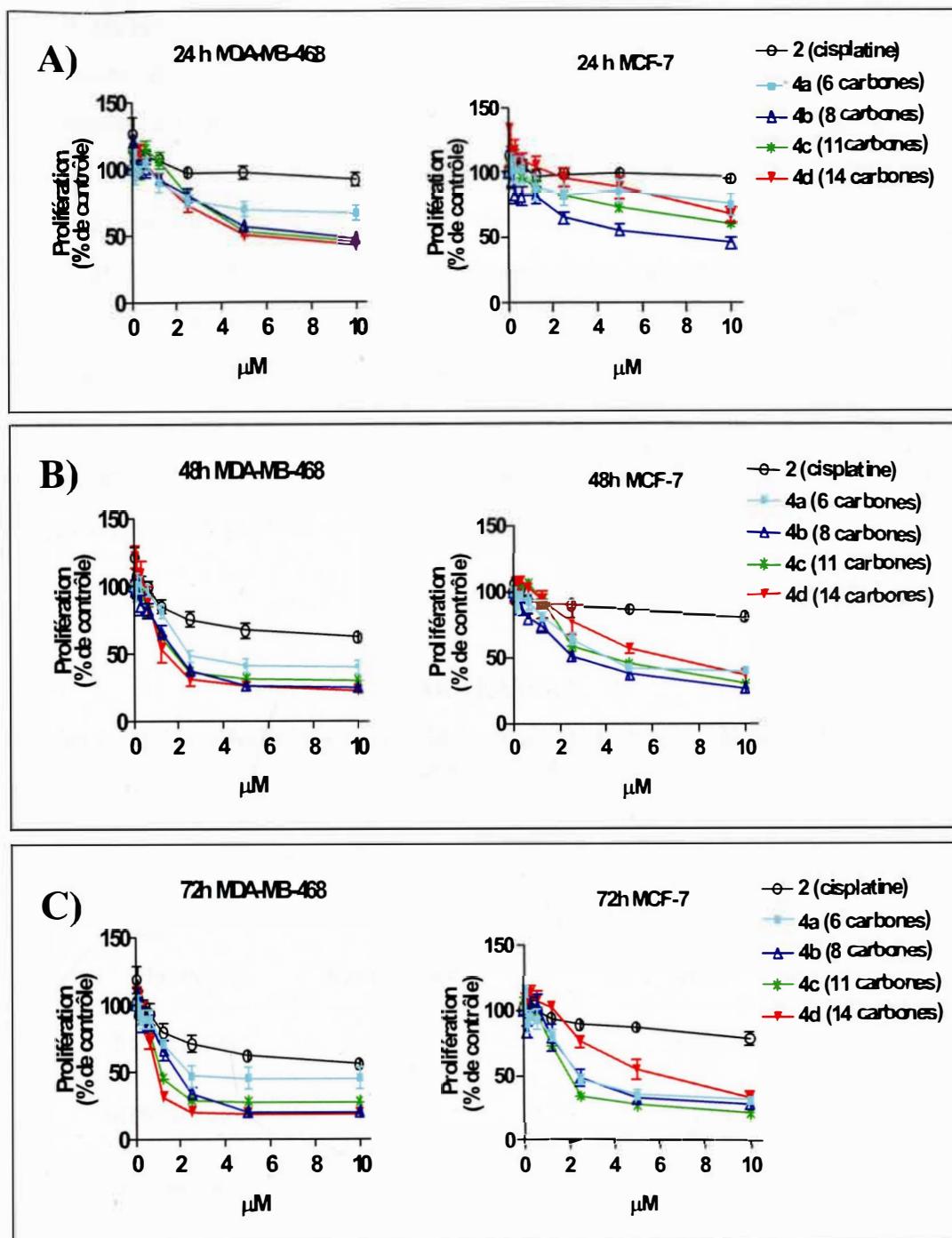


FIGURE 3.2 : Effet des complexes hybrides E_2 -Pt(II) 4a-d et du cisplatin (2) sur la prolifération cellulaire des lignées MDA-MB-468 et MCF-7 pour 24 heures en A), 48 heures en B) et 72 heures en C) déterminé par la conversion du MTT en thiazolyl bleu MTT-formazan. Les traitements sont exécutés comme décrit dans la section matériaux et méthodes section 2.4. Les données sont présentées comme la moyenne des pourcentages de contrôle \pm SEM de 3 à 6 expériences indépendantes

Il est possible d'illustrer les résultats de prolifération cellulaire sous forme de concentration d'inhibition à 50 % (IC₅₀). La valeur de l'IC₅₀ correspond à la concentration de la molécule testée qui inhibe 50 % de la prolifération par rapport aux puits contrôles contenant des cellules non traitées. Les IC₅₀ sont présentés dans le tableau 3.2. Les résultats présentés dans ce tableau montrent que les complexes hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (**4a-d**) ont besoin d'une concentration de cinq à dix fois moindre que le cisplatine (**2**) pour inhiber la prolifération de la lignée MDA-MB-468 (RE α -) de 50 % par rapport aux puits contrôles. De plus, les complexes hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (**4a-d**) ont besoin d'une concentration de trois à dix fois moindre que le cisplatine (**2**) pour inhiber la prolifération de la lignée MCF-7 (RE α +) de 50 % par rapport aux puits contrôles.

TABLEAU 3.2
IC₅₀ des complexes hybrides E₂-Pt(II) 4a-d et du cisplatine (2) pour 72 heures tirés de la figure 3.2 C.

Molécules	IC 50 (μM)			
	MDA-MB-468	+/-	MCF-7	+/-
2 (cisplatine)	10,133	5,837	21,300	5,257
4a (6 carbones)	1,925	0,375	3,084	1,328
4b (8 carbones)	1,810	0,704	2,654	1,726
4c (11 carbones)	1,282	0,225	1,969	0,370
4d (14 carbones)	0,941	0,186	6,316	3,167

Les résultats des essais de prolifération effectués avec les molécules hybrides E₂-Pt(II) de la première famille (voir figure 2.3) selon la méthode décrite à la section 2.4 du chapitre 2 sont présentés à la figure 3.3. Cette figure montre que tous les hybrides E₂-Pt(II) de la troisième famille (voir figure 2.3) (**5a** (5 atomes), **5b** (8 atomes), **5c** (11 atomes), **5d** (14 atomes), **5e** (17 atomes)) ont inhibé la prolifération cellulaire des lignées MDA-MB-231 (RE α -) et MCF-7 (RE α +) (figure 3.3) pour les temps d'incubation de 24, 48 et 72 heures. Cependant, contrairement aux complexes de la première famille, aucun des hybrides de la troisième famille n'a réussi à inhiber la prolifération à 50 % par rapport aux puits contrôles.

À nouveau, il est possible d'illustrer ces résultats de prolifération cellulaire sous forme d'IC₅₀. Les IC₅₀ sont présentés dans le tableau 3.3 montrent que les complexes hybrides E₂-Pt(II) de la troisième famille (**5a-e**) ont présenté une concentration de 1 à 1,5 fois supérieure à la concentration du cisplatine (**2**) (tableau 3.2) pour inhiber la prolifération de la lignée MCF-7 (RE α +) de 50 % par rapport aux puits contrôles.

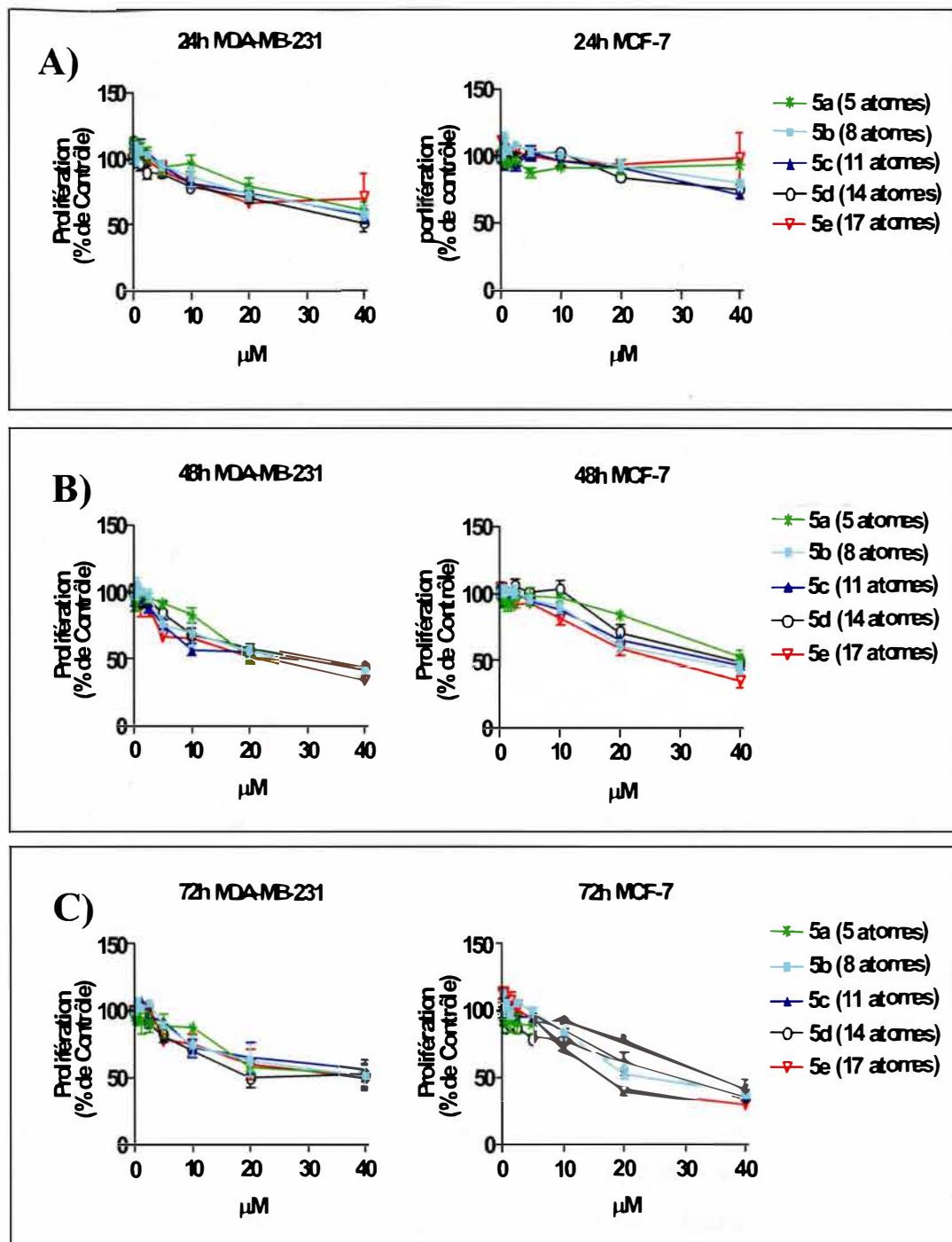


FIGURE 3.3 : Effet des complexes hybrides E₂-Pt(II) 5a-e sur la prolifération cellulaire des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 pour 24 heures en A), 48 heures en B) et 72 heures en C) déterminé par la conversion du MTT en thiazolyl bleu MTT-formazan. Les traitements sont exécutés comme décrit dans la partie matériels et méthodes section 2.4. Les données sont présentées comme la moyenne des pourcentages de contrôle \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

TABLEAU 3.3
IC₅₀ des complexes hybrides E₂-Pt(II) 5a-e pour 72 heures tirés de la figure 3.3 C.

Molécules	IC 50 (μM)			
	MCF-7	+/-	MDA-MB-231	+/-
5a (5 atomes)	32,48	2,4	46,99	13,6
5b (8 atomes)	23,44	4,0	43,19	16,0
5c (11 atomes)	29,34	1,5	52,87	19,6
5d (14 atomes)	28,07	6,8	19,91	4,3
5e (17 atomes)	16,63	2,9	52,32	17,2

3.3 Évaluation des voies de signalisation cellulaire activées par les molécules testées

Afin d'évaluer l'activation des voies de signalisation cellulaire, l'abondance de certaines protéines appartenant à des voies de signalisation impliquées dans le processus de survie cellulaire et dans le processus de l'apoptose ont été comparées. L'expression des protéines ciblées a été révélée par immunobuvardage. L'expression des protéines faisait suite à un contact de 24 heures des cellules avec les molécules suivantes; une molécule hybride E₂-Pt(II) de la première famille (3) (voir figure 2.1), une autre de la deuxième famille (4c) (voir figure 2.2) et le cisplatine (2) (voir figure 2.1). Les deux lignées cellulaires mises en contact avec ces molécules étaient la lignée MDA-MB-468 (RE α -) et la lignée MCF-7 (RE α +). En résumé, l'abondance de chacune des protéines ciblées qu'induisaient les trois molécules testées dans ces deux lignées cellulaires ont été comparées.

Les effets d'un traitement des molécules hybrides E₂-Pt(II) sur les facteurs de survie cellulaire seront premièrement abordés. La protéine Akt, une protéine cytosolique inactive, est activée par phosphorylation et doit être recrutée à la membrane. Une fois la protéine Akt activée (P-Akt), cette dernière fournit un signal de survie cellulaire qui protège les cellules contre l'apoptose induite par différents stress (Cantley, 2002, Okada and Mak, 2004). Les protéines Akt et P-Akt vont de paire et sont un point stratégique pour évaluer les mécanismes de survie cellulaire mis en branle par les cellules cancéreuses traitées avec les molécules d'intérêt, puisque ces protéines participent à une importante voie de signalisation de survie cellulaire PI3K/Akt. Cette voie de signalisation cellulaire peut contrer l'apoptose à plusieurs endroits dans les cellules (Cantley, 2002, Vivanco and Sawyers, 2002). La figure 3.4 A montre une diminution non significative de l'abondance d'Akt en présence de toutes les molécules (**3**, **4c** et le cisplatine (**2**)) à forte dose (10 µM) pour la lignée cellulaire MDA-MB-468 (RE α -). Cette même figure montre que l'abondance de la protéine Akt a été légèrement augmentée (non significative) par rapport au contrôle pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -) en présence des hybrides E2-Pt(II) **3** et **4c** à une concentration de 1 µM. Il est également observable que l'abondance de la protéine Akt dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -) a été diminuée de façon significative ($P < 0.05$) par rapport au contrôle en présence de l'hybride **4c** (10 µM). Les résultats présentés à la figure 3.4 C montrent qu'aucune variation significative dans l'abondance d'Akt dans la ligné MCF-7 (RE α +) n'a été observée en présence de cisplatine (**2**). L'abondance de la protéine Akt dans la lignée MCF-7 (RE α +) a été diminuée proportionnellement à la concentration après un contact avec les molécules hybrides (**3** et **4c**). Seul l'hybride **3** (10 µM) a induit une diminution significative ($P < 0.05$) de l'abondance de la protéine Akt dans la lignée MCF-7 (RE α +) par rapport au contrôle.

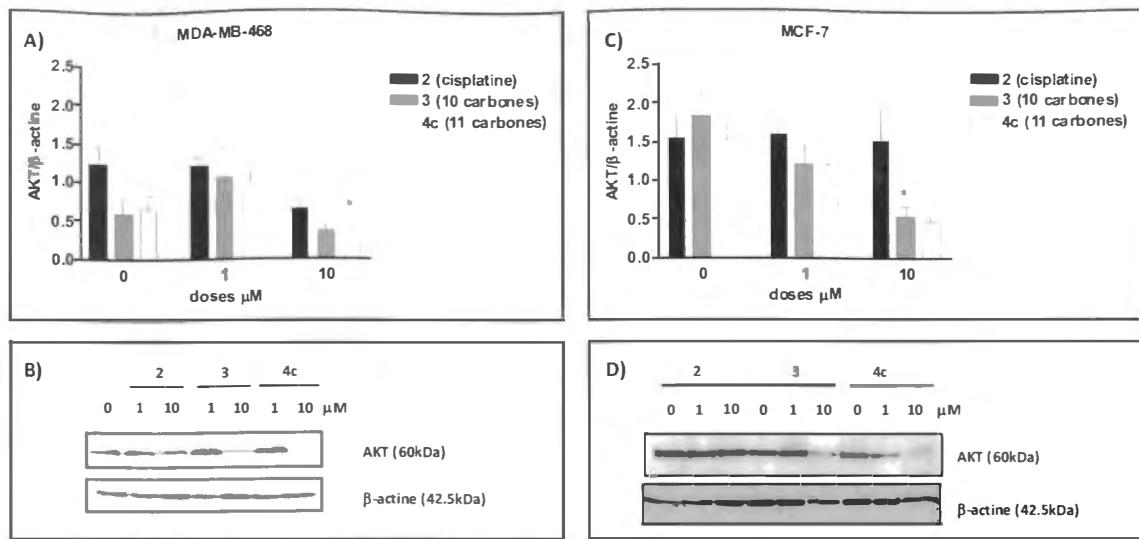


FIGURE 3.4 : Abondance déterminée par immunobuvardage de la protéine Akt des lignées MDA-MB-468 (A) et MCF-7 (C) qui ont été traitées aux doses de 0, de 1 et de 10 μM pour 24 h avec les hybrides E2-Pt(II) 3, 4c et le cisplatine (2). L'analyse des données fut exécutée à l'aide du programme « Quantity One » et est présentée sous forme de ratio (valeur/ β -actine). Les résultats représentent la moyenne du ratio \pm SEM de 4 expériences indépendantes (en A * $P < 0.05$ vs contrôle pour 4c, en C * $P < 0.05$ vs contrôle pour 3). Résultat le plus représentatif des 4 expériences d'expression des protéines Akt et β -actine après traitement des lignées MDA-MB-468 (B) et MCF-7 (D). La β -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation du chargement des puits.

La protéine P-Akt est la portion active de la protéine Akt, mais l'anticorps utilisé pour reconnaître la protéine Akt ne discriminait pas les isoformes d'Akt ainsi que leur phosphorylation. Il est donc évident qu'une diminution de l'abondance d'Akt ne peut être accompagnée d'une augmentation de l'abondance de P-Akt. Les résultats présentés à la figure 3.5 montrent que l'abondance de P-Akt a été diminuée par rapport au contrôle pour les deux lignées cellulaires, et ce, pour toutes les molécules (3, 4c et le cisplatine (2)) à forte dose (10 μM). La figure 3.5 A montre que, l'abondance de P-Akt dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -) a été légèrement augmentée, quoique de façon non significative, par rapport au contrôle en présence des hybrides 3, 4c et du cisplatine (2) à 1 μM . Cette même figure montre une diminution significative ($P < 0.05$) de l'abondance

de P-Akt dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -) induit par la présence des hybride **3** et **4c** concentrés tous deux à forte dose (10 μ M). Ces diminutions observées sont significatives par rapport à la dose de 1 μ M pour l'hybride **3** et par rapport au contrôle et la dose de 1 μ M pour l'hybride **4c**. La figure 3.5 C ne montre aucune variation significative dans l'abondance de P-Akt de la lignée MCF-7 (RE α +) traitées avec le cisplatine (**2**) et les molécules d'intérêts (**3** et **4c**). Une légère diminution non significative de l'abondance de P-Akt dans la lignée MCF-7 (RE α +) en présence des hybrides **3** et **4c** concentrés à 10 μ M par rapport au contrôle peut par contre être observée.

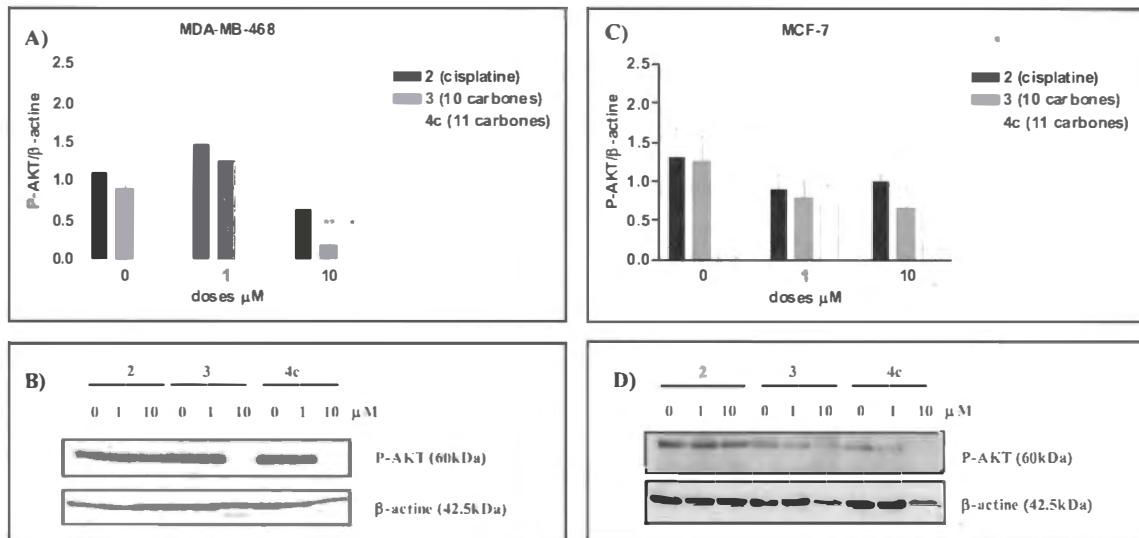


FIGURE 3.5 : Abondance déterminée par immunobuvardage de la protéine P-Akt des lignées MDA-MB-468 (A) et MCF-7 (C) qui ont été traitées aux doses de 0, de 1 et de 10 μ M pour 24 h avec les hybrides E₂-Pt(II) **3**, **4c** et le cisplatine (**2**). L'analyse des données fut exécutée à l'aide du programme « Quantity One » et est présentée sous forme de ratio (valeur/ β -actine). Les résultats représentent la moyenne du ratio \pm SEM de 4 expériences indépendantes (en A * $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μ M pour **4c**, ** $P < 0.05$ vs 1 μ M pour **3**). Résultat le plus représentatif des 4 expériences d'expression des protéines P-Akt et β -actine après traitement des lignées MDA-MB-468 (B) et MCF-7 (D). La β -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation du chargement des puits.

La protéine XIAP est un facteur de survie cellulaire qui fait partie de la famille des IAPs. Le groupe des protéines IAPs est reconnu comme le seul groupe de protéines endogènes qui régulent tant l'activité des caspases initiatrices que l'activité des caspases effectrices (Yin and Dong, 2003, Deveraux and Reed, 1999). Ainsi, l'abondance de XIAP constitue un autre point stratégique pour comprendre les mécanismes cellulaires induits par un traitement avec les molécules d'intérêts. Les résultats présentés à la figure 3.6 A montrent que l'abondance de XIAP dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -) a été légèrement augmentée, bien que de manière non significative, par rapport au contrôle en présence de toutes les molécules du traitement (**3**, **4c** et le cisplatine (**2**)) à 1 μ M. Cette figure montre aussi que l'abondance de XIAP dans la lignée cellulaire MDA-MB-468 (RE α -) a été diminuée significativement ($P < 0.05$) par rapport à la dose de 1 μ M en présence de toutes les molécules du traitement (**3**, **4c** et le cisplatine (**2**)) à 10 μ M. Cette diminution observée est aussi significative par rapport au contrôle pour l'hybride **4c**. La figure 3.6 C montre que l'abondance de XIAP dans la lignée MCF-7 (RE α +) a été diminuée significativement ($P < 0.05$) par rapport au contrôle en présence de l'hybride **4c** et du cisplatine (**2**) à 10 μ M.

En résumé, une diminution de l'abondance des facteurs de survie cellulaire ciblés (Akt, P-Akt et XIAP) suite au traitement des lignées cellulaires (MDA-MB-468 (RE α -) et MCF-7 (RE α +) avec molécules hybrides E2-Pt(II) (**3** et **4c**) et le cisplatine (**2**) est observable. Aucune différence majeure d'abondance des facteurs de survie cellulaire n'a cependant été observée, que ce soit sur la lignée cellulaire RE α + ou la lignée RE α -.

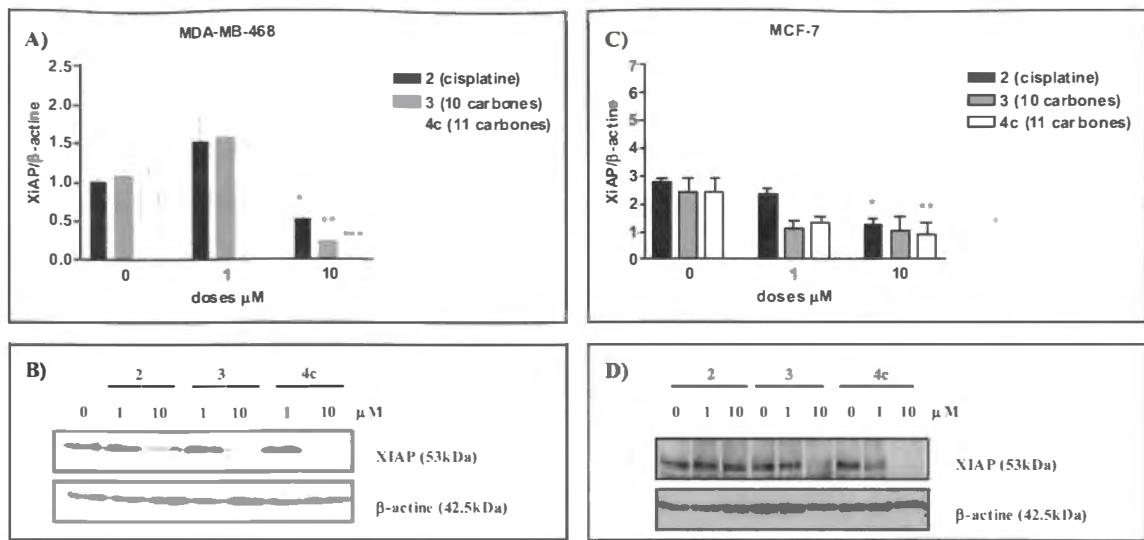


FIGURE 3.6 : Abondance déterminée par immunobuvardage de la protéine XIAP des lignées MDA-MB-468 (A) et MCF-7 (C) qui ont été traitées aux doses de 0, de 1 et de 10 μM pour 24 h avec les hybrides E₂-Pt(II) 3, 4c et le cisplatine (2). L’analyse des données fut exécutée à l’aide du programme « Quantity One » et est présentée sous forme de ratio (valeur/β-actine). Les résultats représentent la moyenne du ratio ± SEM de 3 expériences indépendantes (en A * P < 0.05 vs 1 μM pour 2, ** P < 0.05 vs 1 μM pour 3, * P < 0.05 vs contrôle et 1 μM pour 4c; en C * P < 0.05 vs contrôle pour 2, ** P < 0.05 vs contrôle pour 4c). Résultat le plus représentatif des 3 expériences d’expression des protéines XIAP et β-actine après traitement des lignées MDA-MB-468 (B) et MCF-7 (D). La β-actine a été utilisée comme contrôle de normalisation du chargement des puits.**

Les résultats suivants montrent les effets d'un traitement des molécules hybrides E2-Pt(II) sur les facteurs d'apoptose qui ont été ciblés. Le clivage de PARP étant un point irréversible dans le processus de l'apoptose (Oliver et al., 1998), il va de soi que l'abondance de cette protéine constitue un point stratégique relatif au développement de l'apoptose. La protéine PARP non clivée est essentielle dans la réparation de l'ADN (Oliver et al., 1998, Grossmann et al., 1998, Slee et al., 2001). Lorsque la protéine PARP est clivée via des caspases actives, elle ne peut plus remplir sa fonction de réparateur d'ADN et une amplification des voies de signalisation de mort cellulaire s'ensuit. La figure 3.7 montre que l'abondance de PARP clivée dans les deux lignées cellulaires

testées a été augmentée significativement ($P < 0.05$) par rapport au contrôle et par rapport à la dose 1 μM en présence de l'hybride **4c** à forte dose (10 μM). L'abondance de PARP clivée a été augmentée significativement ($P < 0.05$) après un contact avec le cisplatine (**2**) à forte dose (10 μM) seulement dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -).

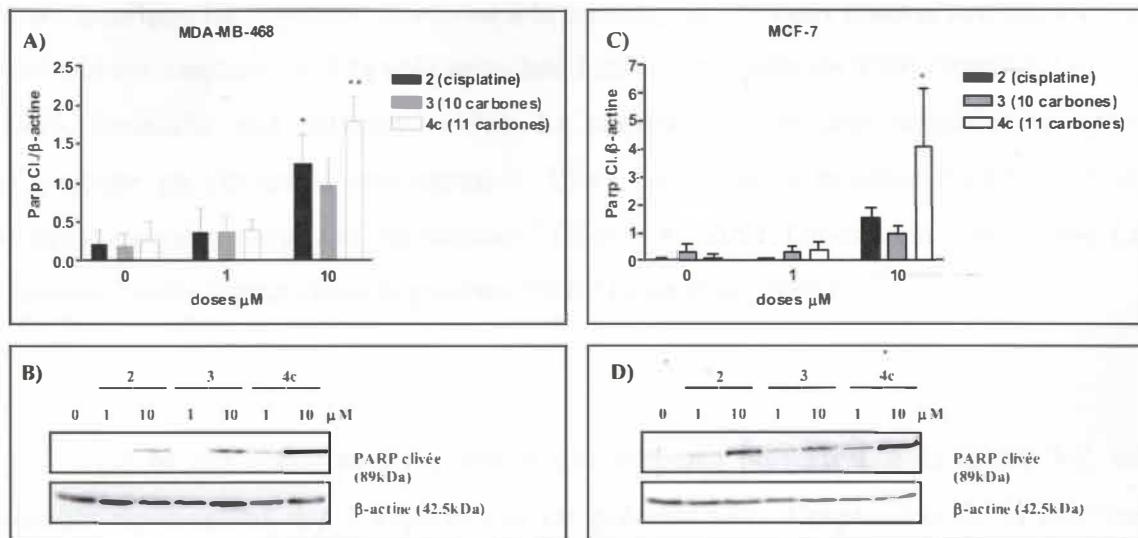


FIGURE 3.7 : Abondance de la protéine PARP clivée des lignées MDA-MB-468 (A) et MCF-7 (C) qui ont été traitées aux doses de 0, de 1 et de 10 μM pour 24 h avec les hybrides E₂-Pt(II) 3, 4c et le cisplatine (2) a été déterminée par immunobuvardage. L'analyse des données fut exécutée à l'aide du programme « Quantity One ». Les résultats sont présentés sous forme de ratio (valeur/ β -actine). Ils représentent la moyenne du ratio \pm SEM de 3 expériences indépendantes (en A * $P < 0.05$ vs contrôle pour 2, ** $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour 4c; en C * $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour 4c). Résultat le plus représentatif des 3 expériences d'expression des protéines PARP Clivée et β -actine après traitement des lignées MDA-MB-468 (B) et MCF-7 (D). La β -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation du chargement des puits.

Les caspases sont des protéases à cystéine contribuant à la destruction de la cellule, il était approprié de les cibler comme facteur d'apoptose. Les caspases sont divisées en trois groupes : les caspases inflammatoires, les caspases initiatrices et les caspases effectrices (Yin and Dong, 2003). Des caspases ont été ciblées dans les groupes

des caspases initiatrices et des caspases effectrices. La caspase-9 clivée est une caspase initiatrice activée. Elle agit dans la cellule à plusieurs endroits et initie la cascade des caspases dans la cellule, en plus d'être en lien direct avec la voie mitochondriale d'activation des caspases (Nunez et al., 1998, Li et al., 1997). La caspase-3 et la caspase-7 sont des caspases effectrices. Elles agissent de différentes façons à plusieurs endroits dans la cellule. La caspase-3 clivée est à la convergence de deux voies d'activation de la cascade des caspases, soit la voie mitochondriale et soit celle du TNF (Stennicke et al., 1998, Stennicke and Salvesen, 1998). La caspase-3 clivée peut amplifier le signal d'apoptose en clivant la pro-caspase-9. Elle peut cliver la protéine PARP et cliver d'autres caspases comme la pro-caspase-7 (Slee et al., 2001, Grossmann et al., 1998). La caspase-7 activée peut cliver la protéine PARP (Slee et al., 2001).

En ce qui concerne l'expression des caspases présentées à la figure 3.8, un résultat représentatif des 3 expériences est présenté avec l'expression de la β -actine correspondante. La densitométrie n'est pas présentée puisque le point irréversible du processus de l'apoptose est déjà présenté plus haut (voir figure 3.7). Qualitativement, les immunobuvardages présentés à la figure 3.8 montrent que la caspase-3 dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -) a été clivée après un contact avec toutes les molécules (**3**, **4c** et le cisplatine (**2**)) à 10 μ M. D'autre part, aucun clivage de la caspase-3 dans la lignée MCF-7 (RE α +) pour toutes les molécules à toutes les concentrations n'est observé, ce qui est appuyé par la littérature (Blanc et al., 2000). De plus, les résultats présentés à la figure 3.8 montrent que, dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -), la caspase-7 a été clivée après un contact avec l'hybride **4c** à 10 μ M et en présence du cisplatine (**2**) à 10 μ M. Dans cette même figure, il est aussi observable que, dans la lignée MCF-7 (RE α +), la caspase-7 a été clivée en présence des hybrides **3** et **4c** à 10 μ M. De plus, la caspase-7 a été faiblement clivée dans la lignée MCF-7 (RE α +) en présence de cisplatine (**2**) à 10 μ M. Toujours de manière qualitative, la figure 3.8 montre que, dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -), la caspase-9 a été clivée en présence de l'hybride **4c** à 10 μ M contrairement à l'hybride **3** et le cisplatine (**2**) concentrés à 10 μ M qui ont induit un faible clivage de la

caspase-9. De plus, la lignée MCF-7 (RE α +) montre une présence de la caspase-9 clivée suite au traitement avec toutes les molécules toutes à 10 μ M. Il est également observable que la caspase-9 est fortement clivée dans la lignée MCF-7 (RE α +) en présence de la molécule hybride 4c (voir figure 3.8). Il faut mentionner que seules les conditions où le clivage des caspases était perceptible sur la figure 3.8 ont été décrites ci-haut.

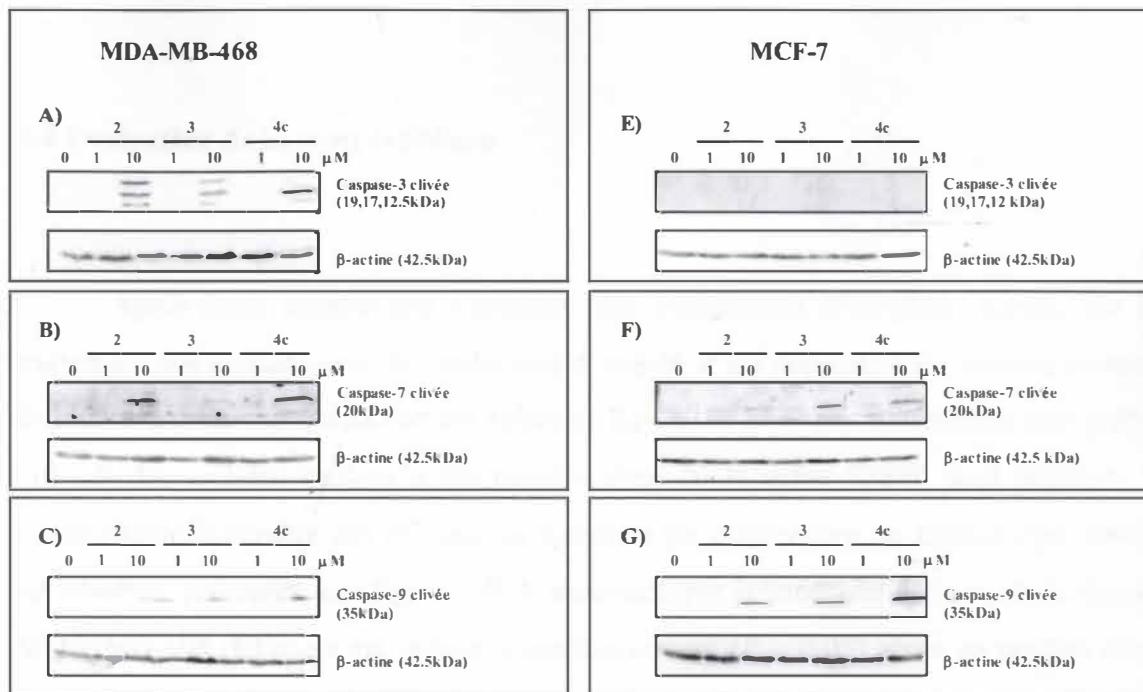


FIGURE 3.8 : Expression des protéines caspase-3 clivée, caspase-7 clivée et caspase-9 clivée déterminées par immunobuvardage sur les lignées MDA-MB-468 (respectivement A, B et C) et MCF-7 (respectivement E, F et G) suite au traitement de 24 h avec les molécules hybrides E₂-Pt(II) 3, 4c et le cisplatin (2) aux doses de 0, de 1 et de 10 μ M. Résultat le plus représentatif des 3 expériences d'expression des protéines caspase 3 clivée, caspase 7 clivée et caspase 9 clivée et de leur β -actine correspondante, et ce pour les deux lignées. La β -actine a été utilisée comme contrôle de normalisation du chargement des puits.

En résumé, les effets d'un traitement des molécules hybrides E₂-Pt(II) sur les facteurs d'apoptose ciblés montrent une augmentation de leur présence et de leur abondance. L'hybride 4c se démarque des deux autres molécules testées (3 et le

cisplatine (2)) à plusieurs égards. Les résultats présentés ont montré que seule la molécule hybride **4c** à 10 µM a induit une augmentation significative ($P < 0,05$) de l’abondance de PARP clivée dans les deux lignées cellulaires testées, a induit une diminution significative ($P < 0,05$) de l’abondance de XIAP dans les deux lignées cellulaires testées et a induit le clivage de toutes les caspases dans les deux lignées cellulaires mise à part la caspase-3 dans la lignée MCF-7 (RE α +).

3.4 Évaluation de la mort cellulaire

Après avoir montré une activation des mécanismes d’apoptose induits par le traitement des cellules avec les molécules d’intérêt, il est nécessaire de montrer la mort cellulaire induite par les molécules hybrides E2-Pt(II). Lors des traitements, une partie (10 µl) des cellules traitées a été colorée avec du Hoechst 33258 pour procéder à l’évaluation du nombre des cellules en apoptose par observation au microscope. Ainsi, les résultats présentés à la figure 3.9 A montrent que la mort des cellules de la lignée MDA-MB-468 (RE α -) a été induite significativement ($P < 0,05$) après un contact avec toutes les molécules (**3**, **4c** et le cisplatine (2)) à 10 µM. La molécule hybride **4c** se démarque des autres molécules puisque 80 % des cellules totales (MDA-MB-468 (RE α)) ont été tuées par cet hybride (**4c**), contre 37 % pour l’hybride **3** et 50 % pour le cisplatine (2). La figure 3.9 B montre que la mort des cellules de la lignée MCF-7 (RE α +) a été induite significativement ($P < 0,05$) en présence de l’hybride **4c** à 10 µM. Ainsi, 34 % des cellules (MCF-7 (RE α +) totales ont été tuées suite à un contact avec l’hybride **4c** à 10 µM. Une plus grande valeur apoptotique pour les deux lignées cellulaires testées a donc été illustrée par la molécule hybride E₂-Pt(II) **4c**. Par contre, les résultats montrent aussi que la molécule **4c** agit sans distinction de l’isoforme α du RE puisque la mort cellulaire a été plus importante dans la lignée MDA-MB-468 (RE α -). Il est également observable que la lignée MCF-7 (RE α +) a été la lignée cellulaire la moins sensible aux agents chimiothérapeutiques testés.

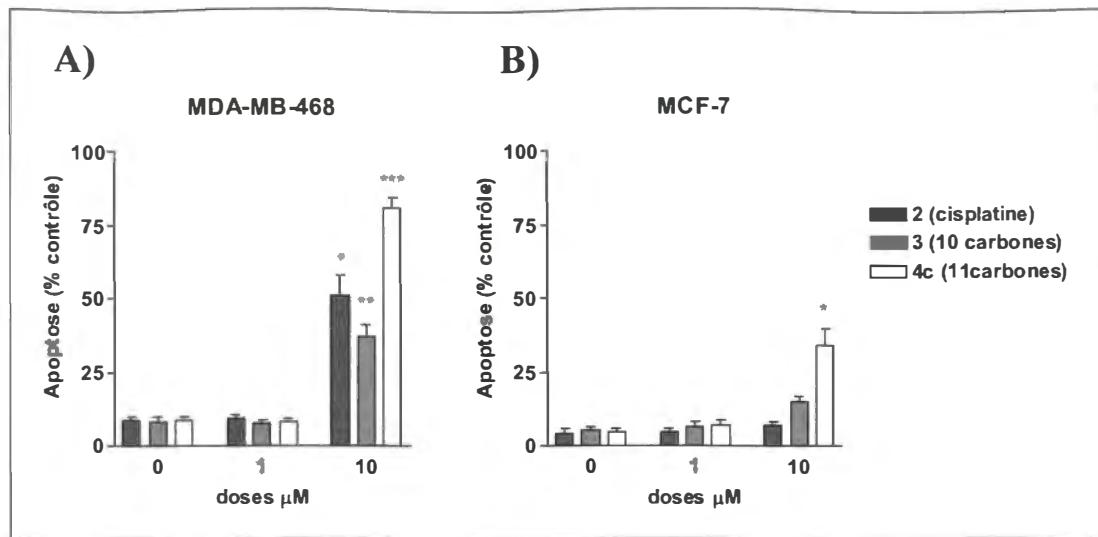


FIGURE 3.9 : Effet apoptotique sur la lignée MDA-MB-468 (A) et MCF-7 (B) traitée aux doses de 0, de 1 et de 10 μM pour 24 h avec les molécules hybrides $\text{E}_2\text{-Pt(II)}$ 3, 4c et le cisplatin (2). L'apoptose est déterminée par visualisation de la morphologie au microscope à l'aide d'une coloration du noyau avec le Hoechst 33258. Les résultats sont présentés en pourcentage de cellules mortes par rapport au nombre de cellules totales pour un total de six expériences (en A * $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour le cisplatin (2), ** $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour 3, *** $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour 4c et en B * $P < 0.05$ vs contrôle et 1 μM pour 4c).

3.5 Évaluation de l'activation du récepteur alpha

L'activation du RE α par les molécules hybrides à l'étude a été évaluée à l'aide d'une transfection transitoire d'un gène rapporteur (voir section 2.7.1). Le gène rapporteur contenu dans le plasmide transfected codait pour la luciférase. Ce plasmide possède des éléments du ERE dans son promoteur (figure 2.5). Le ERE est spécifiquement activé par les RE α activés. L'expression du gène codant pour la luciférase est donc lié à l'activation du ERE par un RE α , qui est activé par les molécules hybrides. Les cellules MCF-7 ont été transfectées transitoirement avec le plasmide (Translucent ERE Reporter Vector, 4.8 Kb) et traitées avec l' E_2 (1) dans le but de valider la technique. Les résultats présentés aux figures 3.10 A et B sont des résultats

préliminaires. La luminescence observée à la figure 3.10 A valide la technique puisqu'il a été montré que l'E₂ (**1**) active le ERE par le biais du RE α . À la figure 3.10 B, une luminescence a été observée lorsque les cellules MCF-7 transfectées transitoirement étaient stimulées avec l'hybride **4c**. Cette luminescence confirme que la molécule hybride E₂-Pt(II) **4c** fixe le récepteur et permet son activation. La partie E₂ (**1**) des complexes peut donc fixer et activer le RE α sans que la partie dérivée du cisplatine (**2**) des hybrides n'interfère. De plus, l'activation du RE par la molécule hybride E₂-Pt(II) **4c** montre que la fixation de l'hybride sur le RE permet l'expression de protéines et, par le fait même, la transduction de signal dans la cellule. Les résultats présentés à la figure 3.10 montrent également que la luminescence ne suit pas la dose de la stimulation. Cela signifie que la luminescence observée après un contact des cellules transitoirement transfectées avec l'E₂ (**1**) ou avec notre molécule hybride **4c** à faible dose (1 nM pour l'E₂(**1**) et 0,001 nM pour l'hybride **4c**) est du même ordre que la luminescence observé à forte dose (1000 nM pour l'E₂(**1**) et 100 nM pour l'hybride **4c**). Aucune dose ne se démarque significativement des autres doses, et ce, autant pour l'E₂ que pour notre molécule hybride **4c**. Les luminescences observées à toutes les doses sont cependant significatives par rapport aux puits contrôles (non stimulés).

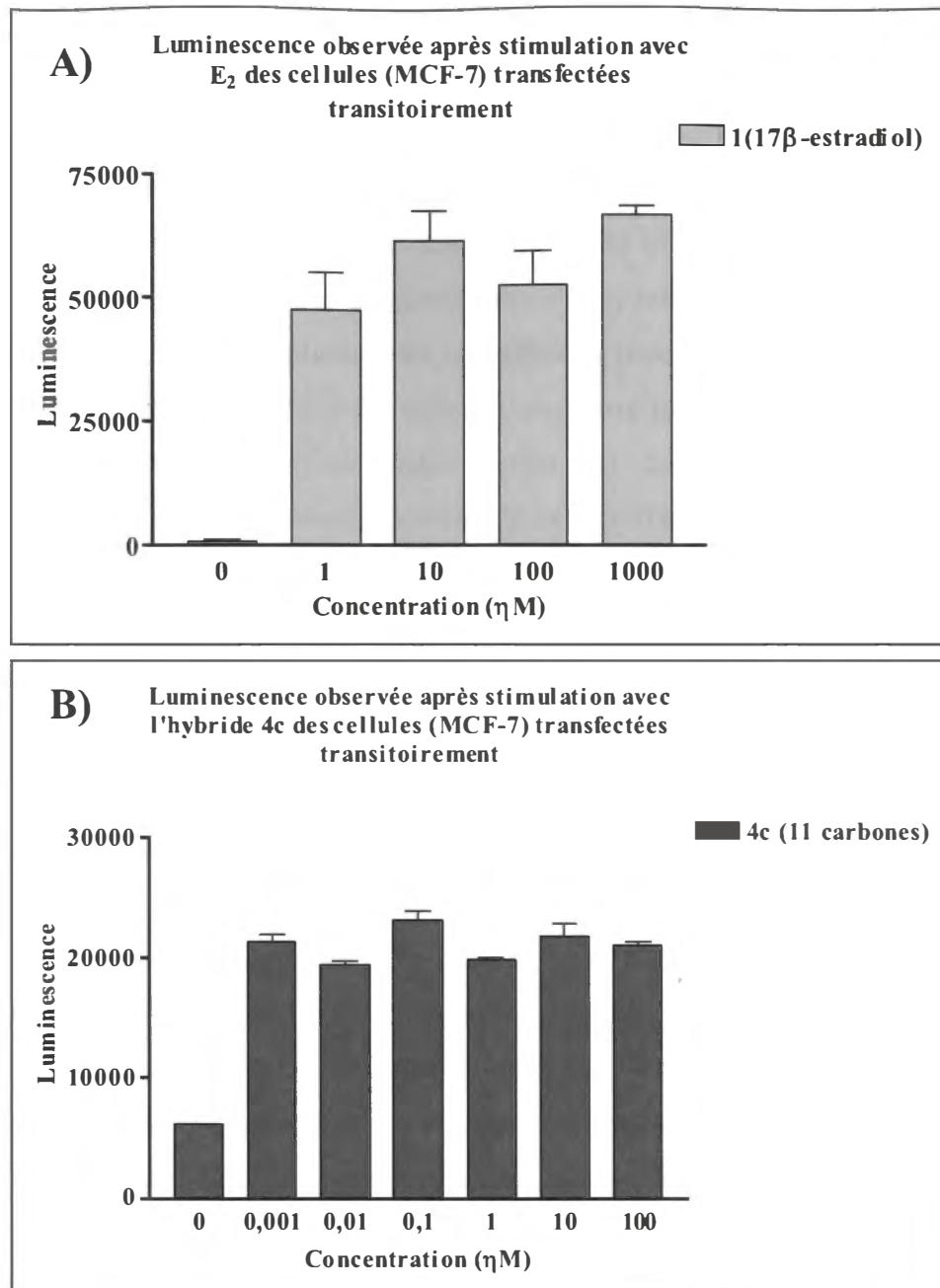


FIGURE 3.10 : Luminescence observée avec l'ajout du substrat après une stimulation de 24 h avec différentes doses d'œstrogène (1) (A) et de l'hybride E₂-Pt(II) 4c (B) sur des cellules de la lignée MCF-7 ayant subi au préalable une transfection transitoire du plasmide Translucent ERE Reporter Vector, 4.8 Kb, (Panomics Inc., Fremont, CA, USA). Résultats d'une expérience en duplicita.

3.6 Effets des molécules d'intérêt sur des tumeurs *in vivo*

Le présent projet d'étude ne serait pas complet sans l'observation des effets dans un modèle d'organisme vivant des molécules E₂-Pt(II) synthétisées par notre laboratoire. Cette section du projet a pour but d'évaluer le potentiel chimiothérapeutique *in vivo* des molécules E₂-Pt(II) développées par notre laboratoire, tout en déterminant la présence d'effets secondaires, d'interactions avec le système immunitaire et le mode d'action des complexes. L'expérimentation a été exécutée sur deux modèles animaux. Le premier modèle animal est une souris athymique Nu/Nu dont des cellules du cancer du sein (MCF-7 (RE+) et MDA-MB-468(RE-)) ont été xénogreffées sous la peau. Le deuxième modèle est une rate Sprague-Dawley injectée i.p. à l'âge de trois semaines avec du NMU, un carcinogène, afin d'induire un carcinome mammaire. Les résultats de ces expérimentations sont présentés aux figures 3.11 pour les souris et 3.12 pour les rates.

Suite à l'expérimentation *in vivo* sur les souris, les résultats présentés à la figure 3.11 A montrent une diminution du volume des tumeurs des souris traitées avec l'hybride **4c** et avec le cisplatine (**2**) par rapport aux volumes des tumeurs des souris témoins. Après 27 jours de traitement, une diminution de 55 % du volume des tumeurs constituées des cellules MDA-MB-468 xénogreffées sur les souris traitées avec le cisplatine (**2**) a été constatée. Une durée de traitement identique a permis de constater une diminution de 51 % du volume des tumeurs constituées des cellules MDA-MB-468 xénogreffées sur les souris traitées avec l'hybride **4c**. De plus, les tumeurs constituées des cellules MCF-7 xénogreffées ont montré après 27 jours une diminution moyenne de 76 % de leur volume initial sur les souris traitées avec le cisplatine (**2**) et une diminution de 62 % du volume initial sur les souris traitées avec l'hybride **4c**.

La figure 3.11 B présente le poids des souris traitées. Ces résultats montrent une diminution du poids des souris traitées avec le cisplatine (**2**) d'environ 5 % par rapport

au poids initial pour les souris xénogreffées avec la lignée MDA-MB-468 et de plus de 10 % pour celles xénogreffées avec la lignée MCF-7. Parallèlement, les résultats des souris traitées avec la molécule **4c** montrent un poids comparable aux souris contrôles, et ce pour les deux types de lignées cellulaires xénogreffées.

La figure 3.12 A présente le volume des tumeurs des rates traitées avec l'hybride **4b** et le cisplatine (**2**). Après 33 jours de traitement des rates avec l'hybride **4b** une réduction du volume des tumeurs de 50 % du volume initial est observée. Le volume des tumeurs contrôles a été augmenté jusqu'à 900 % du volume initial. La figure 3.12 B montre que le poids des rates traitées avec l'hybride **4b** a été comparable au poids des rates témoins pour toute la durée du traitement. Parallèlement, le volume des tumeurs sur les rates traitées avec le cisplatine (**2**) a été réduit par rapport au volume initial des tumeurs. Le poids des rates traitées avec le cisplatine (**2**) a cependant été diminué. Il faut mentionner que le traitement avec le cisplatine (**2**) a été arrêté à 25 jours puisque toutes les rates sont mortes en raison de la toxicité du cisplatine (**2**).

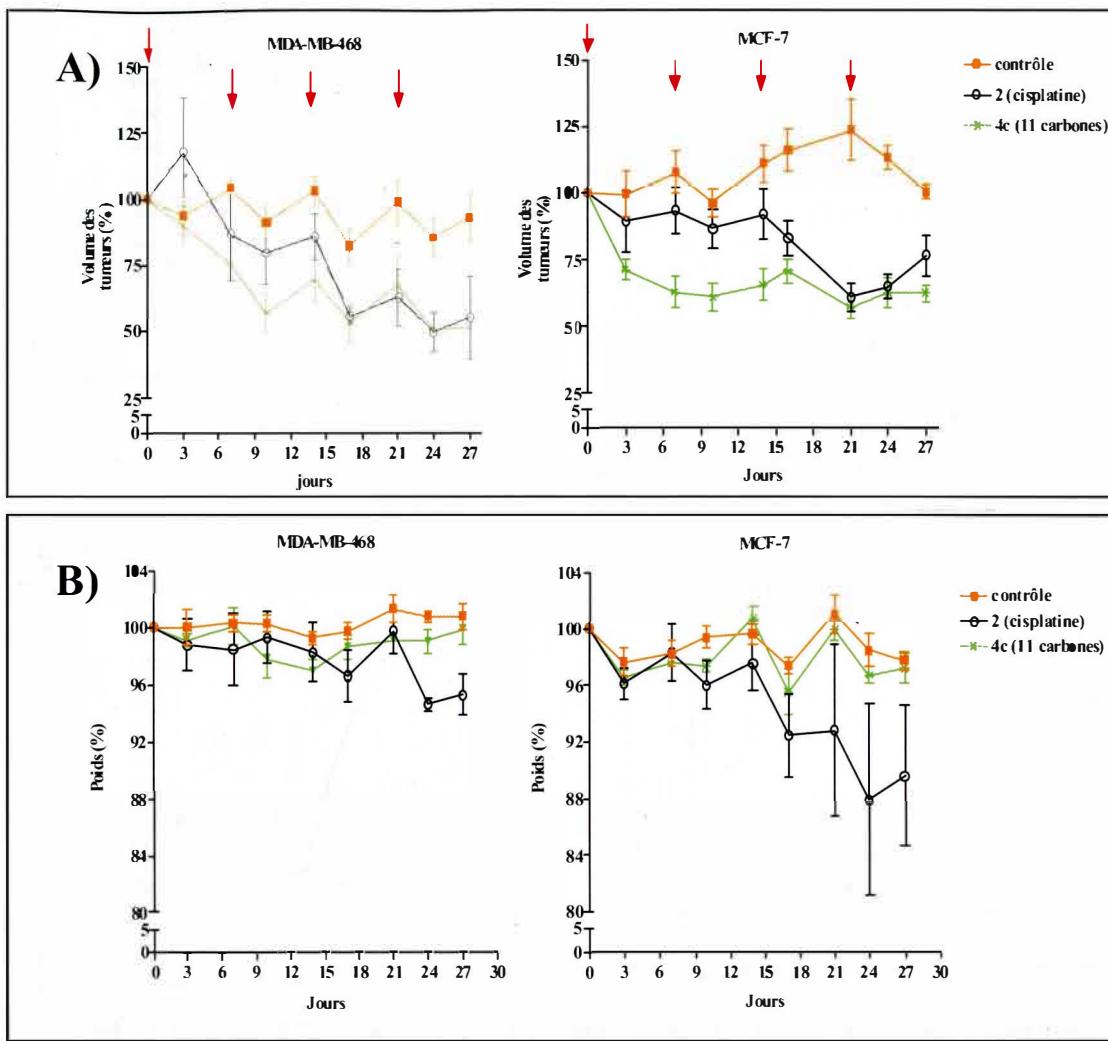


FIGURE 3.11 : A) Effet antitumoral de l'hybride E₂-Pt(II) 4c et du cisplatine (2) sur les lignées MDA-MB-468 et MCF-7 xénogreffées sur les souris athymiques. Les souris sont injectées i.p. à 5 mg/kg/semaine avec l'hybride E₂-Pt(II) 4c et le cisplatine (2) pour une durée de 21 jours. La croissance des tumeurs est mesurée deux fois par semaine. Le volume des tumeurs est calculé en pourcentage du volume de la tumeur avant le début du traitement (jour 0). **B)** Effet du traitement sur le poids des souris. Le poids des souris est calculé en pourcentage du poids initial du traitement (jour 0). Les flèches rouges indiquent les jours de traitement.

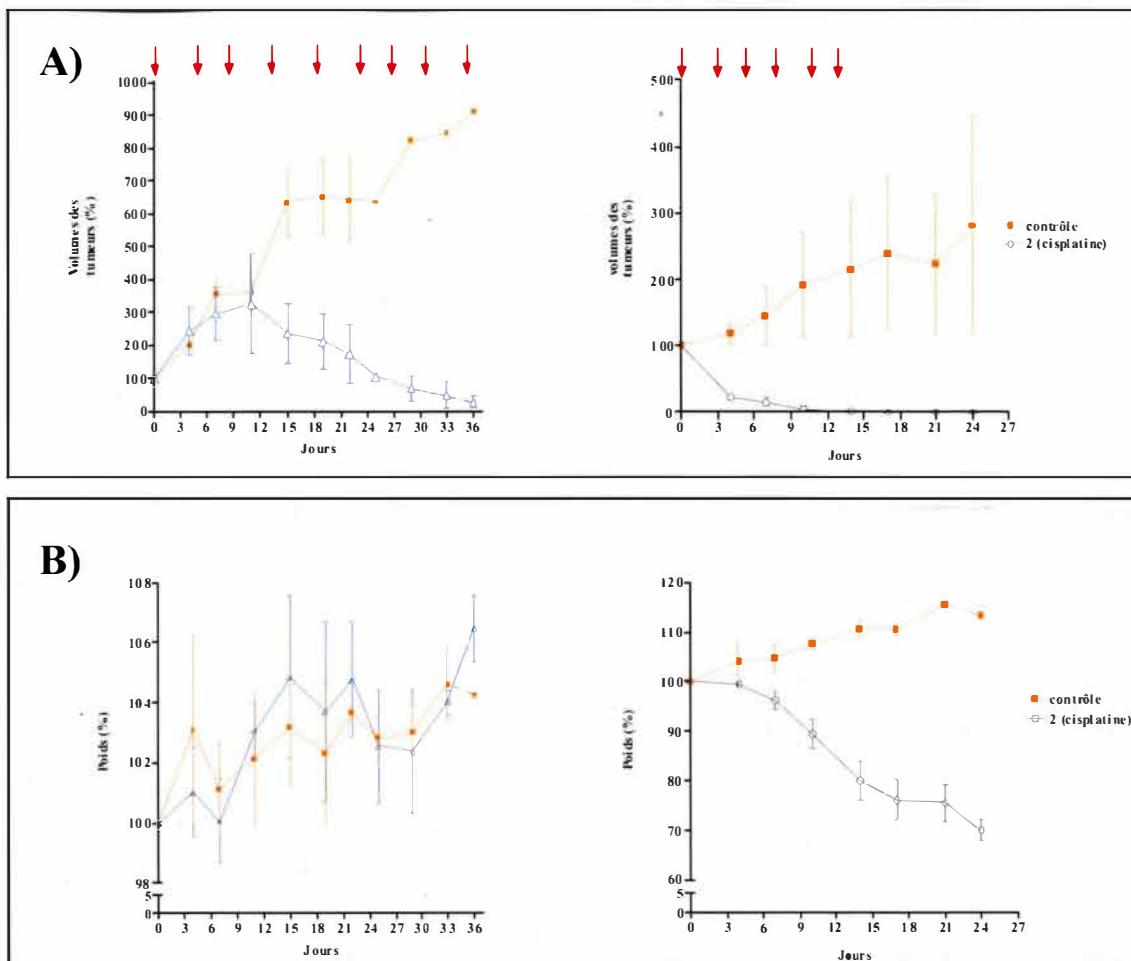


FIGURE 3.12 : A) Effet antitumoral de l'hybride E₂-Pt(II) 4b et du cisplatine (2) sur des carcinomes mammaires induits avec le NMU. Les rates sont injectées i.v. à 5 mg/kg/semaine avec l'hybride E₂-Pt(II) 4b et le cisplatine (2) pour une durée de 25 jours. La croissance des tumeurs est mesurée deux fois par semaine. Le volume des tumeurs est calculé en pourcentage du volume de la tumeur avant le début du traitement (jour 0). **B)** Effet du traitement sur le poids des rates. Le poids des rates est calculé en pourcentage du poids initial du traitement (jour 0). Les flèches rouges indiquent les jours de traitement.

CHAPITRE 4

DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le traitement des cancers s'exerce sur plusieurs fronts. La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie biologique et la chimiothérapie sont les techniques utilisées pour traiter les différents cancers. La combinaison de ces traitements augmente les chances de survie, d'où la nécessité des plans de traitement (Yarbro, 2005). Plusieurs lacunes sont cependant observées avec les agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie. La résistance développée par les cellules cancéreuses et la toxicité des agents cytotoxiques causant des effets secondaires demeurent des obstacles majeurs rencontrés en chimiothérapie qui diminuent les chances de survie (voir section 1.4.2) (Yarbro, 2005, Gagnon et al., 2004b). Notre laboratoire propose de nouvelles molécules qui s'inscrivent dans une stratégie de ciblage d'un récepteur, en l'occurrence le RE α , pour augmenter la sélectivité du cisplatine (2).

Les nouveaux agents cytotoxiques testés sont une combinaison du ligand naturel du RE et d'un complexe de platine dérivé du cisplatine (2). Le cisplatine (2) est un agent couramment utilisé en chimiothérapie pour traiter les cancers. Différentes longueurs de chaîne alkyle liant le noyau d'E₂ (1) au dérivé de cisplatine (2) ont été utilisées. Le mode d'action théorique des molécules hybrides se base sur l'activation du RE α induite par les molécules hybrides. L'activation du RE α initie une transcription de l'ADN et sa réplication à la suite d'étapes successives menant à la prolifération cellulaire. La prolifération sera bloquée par la partie cytotoxique des molécules hybrides, cette dernière induisant la déformation de l'ADN et causant ainsi l'inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN précédemment initiées, menant à l'apoptose. Les molécules hybrides sont composées de deux parties : une fixant le récepteur et l'autre étant cytotoxique. Pour montrer que les molécules étaient actives, il était primordial de montrer l'absence d'interférence entre les deux parties composant des molécules

hybrides. Il était aussi nécessaire de montrer que les molécules induisaient d'une part l'apoptose et d'autre part l'activation du RE α menant à la transcription de l'ADN. Afin d'évaluer leur potentiel chimiothérapeutique, les effets des molécules hybrides sur des tumeurs composées de cellules cancéreuses d'origine humaine dans un contexte *in vivo* devaient aussi être montrés. Les impacts des molécules sur les systèmes immunitaire et physiologique devaient également être montrés.

L'activation du RE α mène à la prolifération cellulaire par une succession d'événements (Pearce and Jordan, 2004, Bjornstrom and Sjoberg, 2005). Afin de montrer que la présence de l'E₂ (**1**) ne fait pas obstacle à la toxicité du complexe dérivé du cisplatine présent dans les molécules hybrides E₂-Pt(II), des essais de prolifération pour quatre hybrides E₂-Pt(II) (**4a**, **4b**, **4c** et **4d**) de la première famille, en comparaison avec le cisplatine (**2**), ont été réalisés. Lors de ces essais, les effets des molécules ont été comparés sur deux lignées cellulaires, soit la lignée MCF-7 qui est considérée comme étant RE α +, et la lignée MDA-MB-468, qui est considérée comme étant RE α - . Il a alors été constaté que les molécules hybrides E₂-Pt(II) (**4a**, **4b**, **4c** et **4d**) de la première famille inhibent la prolifération (voir figure 3.2). La concentration des molécules hybrides de la première famille requise pour inhiber la prolifération de 50 % par rapport au contrôle est de cinq à dix fois moins concentrée que celle du cisplatine (**2**) pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -), et de quatre à onze fois moins concentrée que celle du cisplatine (**2**) pour la lignée MCF-7 (RE α +) (voir tableau 3.2).

Les molécules hybrides de la première famille testées inhibent donc la prolifération cellulaire à des concentrations moindres que le cisplatine (**2**), ce qui signifie qu'elles sont plus efficaces que le cisplatine (**2**) pour inhiber la prolifération cellulaire et potentiellement moins toxique. Les résultats obtenus montrent que les différentes longueurs des chaînes alkyles des molécules hybrides influencent peu l'efficacité d'inhibition de prolifération cellulaire. Les molécules hybrides E₂-Pt(II) **4c** et **4d** se démarquent des autres hybrides pour inhiber la prolifération de la lignée MDA-MB-468

(RE α -), tandis que pour inhiber la prolifération de la lignée MCF-7 (RE α +), les molécules hybrides E₂-Pt(II) **4b** et **4c** se sont démarquées des autres hybrides. Les molécules hybrides de la première famille semblent plus toxiques avec la lignée MDA-MB-468 (RE-) qu'avec la lignée MCF-7 (RE α +) (voir tableau 3.2). Aucune sélectivité significative d'inhibition de prolifération pour les cellules RE α + n'est par contre montrée par ces résultats. Il a déjà été montré que les molécules hybrides de la première famille inhibaient plus fortement que le cisplatine (**2**) la prolifération sur des lignées cancéreuses où l'E₂ (**1**) était inactive, tel que cancer de la peau (B16-F10) et de l'intestin (HT-29) (Perron et al., 2005). Une hypothèse avait alors été émise : la chaîne carbonée reliant le noyau d'E₂ (**1**) au complexe toxique dérivé du cisplatine (**2**) des molécules rend l'hybride lipophile, ce qui lui permet de diffuser passivement au travers la membrane plasmique pour inhiber la prolifération cellulaire. Pour rendre les molécules hybrides E₂-Pt(II) plus polaires, des atomes d'oxygène ont été ajoutés dans la chaîne alkyle, d'où la synthèse de la troisième famille.

Des essais de prolifération avec les agents cytotoxiques de la troisième famille (**5a**, **5b**, **5c**, **5d** et **5e**) ont été réalisés. Cinq molécules de cette famille ont été testées avec les mêmes temps de contact que les essais de prolifération des molécules de la première famille. Les essais de prolifération ont été exécutés sur deux lignées différentes, l'une étant RE α +, la lignée MCF-7, et l'autre étant RE α -, la lignée MDA-MB-231. Les résultats obtenus ont montré que la prolifération des deux lignées cellulaires a été faiblement inhibée par les molécules hybrides de la troisième famille (**5a**, **5b**, **5c**, **5d** et **5e**). Ces agents cytotoxiques devaient être généralement plus concentrés que le cisplatine (**2**) pour inhiber la prolifération de 50 % par rapport aux puits contrôles. Il faut noter que les lignées cellulaires comparées étaient différentes pour les essais de prolifération effectués avec le cisplatine (**2**) et pour ceux effectués avec les molécules de la troisième famille. La lignée MCF-7 (RE α +) était par contre commune aux essais de prolifération du cisplatine (**2**) et des molécules (**5a**, **5b**, **5c**, **5d** et **5e**) de la troisième famille, mais aucune molécule de la troisième famille ne s'est démarquée du cisplatine (**2**) pour l'inhibition de cette lignée cellulaire. À nouveau, aucune sélectivité

significative d'inhibition de prolifération pour les cellules RE α + n'a été montrée par ces résultats. Il semble que les molécules de la troisième famille soient trop polaires pour inhiber la prolifération cellulaire plus efficacement que le cisplatine (2). Aucun test d'affinité avec le RE α et le RE β n'a donc été effectué pour les molécules de la troisième famille.

Afin de déterminer si la présence du complexe dérivé du cisplatine (2) et de la chaîne alkyle interférait dans l'affinité de la partie d'E₂ (1) des molécules hybrides E₂-Pt(II) pour le RE α , un test d'affinité a été effectué pour chacun des isoformes des REs. Trois molécules de la première famille (**4a**, **4b** et **4c**) ont été testées en comparaison avec le cisplatine (2) et le ligand naturel au récepteur, le 17 β -œstradiol (1). Pour réaliser le test d'affinité, une trousse misant sur la compétition pour la liaison des REs a été utilisée. Ce test a permis de montrer que les molécules hybrides de la première famille avaient une affinité pour le RE α et le RE β similaire au 17 β -œstradiol (E₂(1)) (voir figure 3.1 et tableau 3.1). Les agents cytotoxiques (**4a**, **4b**, **4c**) ont montré une bonne affinité pour les deux types d'isoformes d'RE contrairement au cisplatine (2) (voir figure 3.1). Les molécules hybrides doivent cependant être de 3,8 à 6,8 fois plus concentrées que l'E₂ (1) pour lier le RE α et de 1,6 à 2,0 fois plus concentré que l'E₂ (1) pour lier le RE β (voir tableau 3.1). La présence d'un complexe toxique et d'une chaîne alkyle interfèrent donc peu dans la liaison de la partie E₂ (1) des hybrides avec le RE α et le RE β . L'affinité pour les deux isoformes d'REs des molécules hybrides E₂-Pt(II) (**4a**, **4b**, **4c**) a donc été montrée, mais aucune affinité sélective de l'une ou l'autre des molécules hybrides pour un des deux isoformes des REs n'a été montrée par ces résultats. De plus, les résultats ont montré que la longueur de la chaîne alkyle influence peu la liaison des molécules aux REs.

À la lumière des résultats des essais de proliférations cellulaires, les molécules hybrides E₂-Pt(II) (**4a**, **4b**, **4c** et **4d**) appartenant à la première famille semblent être les meilleurs candidats pour agir comme agents chimiothérapeutiques, même si aucune

sélectivité significative pour le RE α a été montrée par le test d'affinité au récepteur et lors des essais de prolifération. Le manque de sélectivité des molécules hybrides face au RE α peut être expliqué par l'affinité des molécules hybrides pour le RE β , montrée par le test d'affinité et par la présence de l'isoforme β du RE dans toutes les lignées cellulaires testées. Il a été montré que le RE β peut s'hétérodimériser avec le RE α pour interagir avec l'ADN (Cowley et al., 1997, Mosselman et al., 1996) et que la séquence consensus du ERE peut être liée par les deux isoformes du RE (Gruber et al., 2004, Yi et al., 2002). Il est donc possible que l'effet de sélectivité vis-à-vis le RE α soit masqué par la présence du RE β dans les cellules testées. Bien que l'affinité des molécules hybrides avec le GPR30 n'ait pas été testée, il est aussi possible que les hybrides montrent une affinité de liaison avec le GPR30, puisque le GPR30 lie l'E₂ (1) et que les molécules comportent une partie E₂ (1). Ainsi, l'effet de sélectivité face au RE α recherché peut être également masqué par la présence du GPR30. En conséquence, le modèle cellulaire utilisé pour les essais de prolifération ne semble pas adéquat pour montrer une sélectivité des molécules hybrides à l'égard du RE α . En effet, un modèle cellulaire idéal pour la démonstration d'une sélectivité à l'égard du RE α devrait comporter deux lignées cellulaires se différenciant seulement par la présence ou non du RE α . De plus, le modèle cellulaire utilisé présente une autre faiblesse : il est possible que les effets de molécules testées lors des essais de prolifération cellulaire soient biaisés par l'expression du REA dans l'une ou l'autre des lignées cellulaires. Le REA inhibe la transcription de l'ADN initiée par l'activation des ERs (Delage-Mourroux et al., 2000) et les molécules testées agissent en bloquant la transcription de l'ADN initiée par l'activation des ERs. L'expression du REA dans les cellules testées rendrait donc moins sensibles les cellules à l'action des molécules par l'inhibition de la transcription de l'ADN. Puisque l'expression du REA n'a pas été mise en évidence dans ce travail, l'influence de cette protéine sur les effets des molécules ne peut être montrée par les résultats obtenus. En conséquence, l'influence du REA devrait être montrée par un autre modèle cellulaire composé de deux lignées RE α + se différenciant seulement par l'expression ou non du REA.

La création de ce modèle idéal a été tentée en transfectant de façon permanente le RE α dans la lignée cellulaire MDA-MB-468 (RE α -) qui ne l'exprimait pas naturellement. Suite à cette transfection permanente, la lignée MDA-MB-468 exprimait le RE α et des essais de prolifération ont été exécutés sur ces lignées cellulaires (MDA-MB-468 (RE α -) et MDA-MB-468 (RE α +))(résultats non présentés). Tout comme dans le modèle cellulaire précédent, aucune sélectivité à l'égard du RE α n'a été montrée. Le manque de sélectivité des hybrides face au RE α peut à nouveau être expliqué par la présence du RE β ou du GPR30 dans les lignées cellulaires testées. De plus, il faut mentionner que le RE α nouvellement exprimé n'avait pas le même poids moléculaire que le RE α de type sauvage lors des immunobuvardages (résultats non présentés). Plusieurs explications sont possibles : la première est que, durant le processus de transfection permanente, le cadre de lecture de l'ADN pour traduire le RE α en protéine a été déplacé, introduisant un codon d'arrêt (AUG) avant la fin, ce qui a conduit à l'expression d'un RE α raccourci. En second lieu, l'ADN du RE α n'a peut être pas été transfecté dans son ensemble, ce qui a pu conduire à l'expression d'un RE α tronqué. La lignée transfectée avec le RE α a été testée par une transfection transitoire du plasmide rapporteur de l'activité du RE α . Les résultats de ce test ont montré que le RE α nouvellement exprimé dans la lignée MDA-MB-468 n'était pas fonctionnel (résultat non présentés). La partie manquante du nouveau récepteur RE α transfecté peut expliquer pourquoi il ne fonctionnait pas. En troisième lieu, l'absence de cofacteur tels que le « steroid receptor coactivator » (SRC-1) ou les « ER-associated proteins » 140 et 160 (ERAP140, ERAP160) (Hall and McDonnell, 2005) nécessaire à la transcription initiée par le RE α dans la lignée cellulaire hôte peut expliquer en partie le fait que le RE α transfecté était non fonctionnel.

Une autre avenue pour remédier à l'effet de sélectivité cachée serait d'utiliser un nouveau modèle cellulaire dont les deux isoformes des REs ne sont pas exprimés. L'expression du RE β et du RE α pourrait être empêchée en utilisant la technique « short hairpin RNA » (shRNA) dans une lignée RE α + et RE β +. Le shRNA est une technique

d'interférence de l'acide ribonucléique (ARN). L'interférence d'ARN est un mécanisme rendant des gènes silencieux, mécanisme conservé durant l'évolution et toujours présent dans une variété d'espèces eucaryotes. L'interférence d'ARN utilise un court ARN double brin (dsRNA, pour « double-stranded RNA ») pour solliciter la dégradation ou la répression de traduction de l'ARN de séquence homologue qui est ciblée. Un système de dégradation est déjà présent dans les cellules, qui amène la dégradation des séquences homologues d'ARN appariées. Ce système peut être induit *in vitro* et *in vivo* en introduisant directement un petit ARN d'interférence (siRNAs pour « small interfering RNAs ») ou par l'expression d'un petit ARN en forme d'épingle à cheveux (shRNA) avec un vecteur viral ou non viral pour une expression permanente du shRNA (Ma et al., 2007, Sledz and Williams, 2004).

La technique de l'interférence d'ARN via le shRNA pourrait être effectuée sur un nouveau modèle cellulaire et permettrait de comparer la lignée parentale (sans expression du shRNA) avec cette même lignée dont le shRNA serait exprimé et dirigé contre chacun des ARNs des isoformes des REs de façon concomitante et non concomitante. Les molécules hybrides E₂-Pt(II) pourraient être ainsi testées sur les cinq lignées cellulaires suivantes : la lignée parentale (RE α +, RE β + et GPR30+), la lignée parentale traitée avec des shRNA exprimés et dirigés contre les ARNs du RE α et du GPR30 (RE α -, RE β + et GPR30-), la lignée parentale traitée avec des shRNA exprimés et dirigés contre les ARNs du RE β et du GPR30 (RE α +, RE β - et GPR30-), la lignée parentale traitée avec des shRNA exprimés et dirigés simultanément contre l'ARN du RE α et du RE β (RE α -, RE β - et GPR30+) et la lignée parentale traitée avec des shRNA exprimés et dirigés simultanément contre l'ARN du RE α , du RE β et du GPR30 (RE α -, RE β - et GPR30-). Ce nouveau modèle cellulaire serait essentiel pour l'obtention d'informations sur l'implication des différents types de RE dans le mode d'action des molécules hybrides et pour montrer une sélectivité des molécules hybrides face au RE α .

Pour montrer que les molécules induisent l'apoptose, deux mécanismes devaient être montrés. Il fallait premièrement montrer que les voies de signalisation activées par les molécules tendent vers l'apoptose. Il était ensuite nécessaire de confirmer que les agents cytotoxiques provoquent la mort cellulaire par apoptose. La démonstration de l'activation des voies de signalisation cellulaire par les molécules a été divisée en deux parties. La première partie de cette démonstration consistait à observer l'abondance des protéines induisant la survie cellulaire. La deuxième partie consistait à observer l'abondance des protéines induisant l'apoptose. Pour les deux parties de cette démonstration, une molécule hybride de la première famille (**4c**) a été comparée avec une molécule hybride de la deuxième famille (**3**) et le cisplatine (**2**). L'observation de l'abondance des protéines faisait suite à un traitement de cellules cancéreuses de 24 heures avec ces trois agents cytotoxiques. Deux lignées cellulaires ont été utilisées, soit la lignée MDA-MB-468 (RE α -) et la lignée MCF-7 (RE α +). Puisque la partie toxique des molécules dérive du cisplatine (**2**) et afin de comparer le mode d'action des molécules hybrides (**3** et **4c**) avec celui du cisplatine (**2**), il était capital d'observer des protéines impliquées dans le processus d'apoptose induit par le cisplatine (**2**).

Pour la première partie, l'abondance des protéines Akt, P-Akt et XIAP a été observée. Les protéines Akt et P-Akt ont été ciblées en raison de leur implication dans la voie de survie cellulaire PI3K/Akt et de la localisation de cette voie près de la membrane plasmique. La protéine P-Akt est la forme activée d'Akt. La protéine Akt est phosphorylée par la PI3K aux abords de la membrane plasmique dans le cytoplasme (Cantley, 2002, Okada and Mak, 2004). Les protéines Akt et P-Akt sont impliquées dans une des voies activées par le GPR30 activé. Le GPR30, qui est la forme membranaire du RE, peut stimuler la voie de signalisation PI3K pour induire la prolifération cellulaire (Revankar et al., 2005, Vivacqua et al., 2006, Duan et al., 2002). Les protéines Akt, P-Akt et XIAP ont été observées aussi pour leur implication dans la chimiorésistance à la cisplatine dans les cellules de cancer ovarien (voir section 1.4.2). La protéine XIAP peut participer au processus de chimiorésistance au cisplatine par la modulation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt (Asselin et al., 2001). L'observation de la protéine XIAP a

été choisie pour ses interactions avec les différentes caspases et surtout pour l'inhibition avec la caspase-9.

Un traitement à forte dose avec les molécules hybrides (**3** et **4c**) a entraîné une diminution de l'abondance des protéines Akt et P-Akt plus importante que le traitement avec le cisplatine (**2**) (voir figures 3.4 et 3.5). Les molécules hybrides **4c** et **3** induisent donc une diminution de l'activité de la voie de signalisation cellulaire PI3K/AKT de survie cellulaire. La diminution observée des protéines Akt et P-Akt donne un indice de l'implication du GPR30, puisqu'il a été montré que les protéines Akt et P-Akt participent à une des voies de signalisation cellulaire (PI3K/Akt) induite par l'activation du récepteur GPR30 (Revankar et al., 2005, Vivacqua et al., 2006). Il serait donc judicieux de mener une investigation plus approfondie sur l'interaction des molécules avec le GPR30 et sur l'implication de cette interaction dans les voies de signalisation cellulaire promouvant la survie cellulaire. Aucun test d'affinité des molécules pour le GPR30 n'a été effectué et le modèle cellulaire présent ne permet pas de mener une investigation à ce niveau. Un autre modèle cellulaire utilisant l'interférence d'ARN pour inhiber l'expression du GPR30 et les autres isoformes du RE dans sa conception a été proposé précédemment. Ce nouveau modèle semble plus adéquat pour montrer l'implication des différents types de REs dans le mode d'action des molécules hybrides.

L'abondance de XIAP a été diminuée significativement pour la molécule hybride **4c** et le cisplatine (**2**) dans les deux lignées cellulaires. La molécule hybride **3** a montré, à forte dose, une diminution significative de l'abondance de cette protéine pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -) et une diminution non significative pour la lignée MCF-7 (RE α +) (voir figure 3.6). L'abondance de la protéine inhibitrice des caspases (XIAP) a donc été diminuée avec les trois agents cytotoxiques dans les deux lignées cellulaires. Ainsi, il peut être déduit que les molécules hybrides, en particulier l'hybride **4c**, induisent une réduction de l'expression de la protéine XIAP au même titre que le

cisplatine (2). Une diminution de l'abondance de la protéine XIAP se traduit par une diminution de l'inhibition des caspases, en particulier la caspase-9.

Les résultats indiquent que tous les facteurs de survie ciblés sont diminués après un contact des lignées cellulaires testées avec les molécules hybrides (3 et 4c), au même titre qu'avec le cisplatine (2). Une étude a montré que le cisplatine induisait une diminution des facteurs de survie cellulaire telles les protéines Akt, P-Akt et XIAP (Asselin et al., 2001), ce que soutient aussi les résultats obtenus pour les molécules hybrides et le cisplatine (2). Seule la protéine Akt dans la lignée MCF-7(Re α +) n'a pas été diminuée en abondance après un contact avec le cisplatine (2), puisque cette lignée montre une plus grande résistance aux agents chimiothérapeutiques qui est attribuable à la non-expression de la caspase-3 (Blanc et al., 2000). Le clivage de la protéine Akt est produit via l'action de la caspase-3 (Asselin, 2001). Bien que la lignée MCF-7 n'exprime pas la caspase-3 (Blanc et al., 2000), une diminution de l'abondance de la protéine Akt est observée dans cette lignée cellulaire après un contact avec les molécules hybrides (3 et 4c) à 10 μ M. Cette diminution peut être expliquée par l'action d'une autre caspase activée sur la protéine Akt et par la vitesse plus rapide de toxicité des molécules hybrides.

Les résultats des figures 3.4 et 3.5 montrent une augmentation non significative de l'abondance des protéines Akt et P-Akt dans la lignée MDA-MB-468 (RE-) en présence de toutes les molécules testées à 1 μ M. Cette augmentation peut être attribuable à l'augmentation non significative de la protéine XIAP et à l'absence des caspases ciblées dans cette même lignée à cette dose (voir les figures 3.6 et 3.8). Ces résultats corroborent la modulation de la voie PI3K/Akt par XIAP, cette modulation étant associée à la chimiorésistance des cellules ovariennes cancéreuses (Asselin et al., 2001).

Il peut ainsi être conclu que l'hybride **4c** à 10 μ M est plus efficace pour diminuer les facteurs de survie cellulaire qui ont été ciblés, mais aucune sélectivité n'a été montrée à l'égard du RE α pour l'activation des voies de signalisation de survie cellulaire. Il est toujours possible que l'effet de sélectivité vis-à-vis le RE α soit caché par la présence du RE β et/ou par la présence du GPR30 dans les cellules testées. Le modèle cellulaire qui a été proposé précédemment et qui utilise la technique d'interférence d'ARN serait utile pour montrer la sélectivité face au RE α et pour comprendre l'implication des différents types de RE dans le mode d'action des molécules hybrides.

La deuxième partie de la démonstration de l'activation des voies de signalisation cellulaire par les molécules s'attarde sur l'observation des protéines induisant l'apoptose. C'est dans ce contexte que l'abondance de la protéine PARP clivée a été observée. La protéine PARP non clivée est un réparateur de l'ADN. Le clivage de PARP a un double effet : il permet à la fois de supprimer un élément de surveillance génomique et de rendre plus accessible l'ADN aux endonucléases (Oliver et al., 1998, Grossmann et al., 1998). Le clivage de PARP est une étape irréversible dans le processus de l'apoptose. En conséquence, PARP clivée est considérée comme un marqueur de l'apoptose dans la littérature (Oliver et al., 1998). L'évaluation de l'abondance de la protéine PARP clivée permet l'évaluation de la progression de l'apoptose et de la finalité de la cascade des caspases.

La présence de clivage de la caspase-3, de la caspase-7 et de la caspase-9 a également été observée, puisqu'une caspase clivée est une caspase active. La caspase-3 et la caspase-7 font partie des caspases effectrices, alors que la caspase-9 est une caspase initiatrice (Yin and Dong, 2003). Les caspases activées sont considérées comme les effecteurs de l'apoptose car elles clivent des protéines essentielles à l'homéostasie de la cellule et à l'intégrité de l'ADN (Yin and Dong, 2003, Nicholson, 1999). En choisissant d'observer la présence de clivage sur la caspase-9, c'est l'initiation de la

cascade et l'implication de la mitochondrie dans la cascade par la libération du cytochrome c qui est observée (Blanc et al., 2000). La libération du cytochrome c par la mitochondrie était induite par le cisplatine (2) dans les cellules de cancer du sein (Blanc et al., 2000). La présence de la caspase-3 clivée indique l'amplification du signal proapoptotique véhiculé par les caspases (Blanc et al., 2000). L'observation de la caspase-7 clivée indique que la cascade des caspases est menée à terme. La protéine PARP est une cible reconnue pour les caspase-3 et caspase-7 clivées (Slee et al., 2001).

Les résultats obtenus montrent une plus forte présence de la caspase-9 clivée après un traitement avec l'hybride **4c** à la dose la plus forte (10 μ M). La caspase-9 clivée est présente après un traitement à forte dose (10 μ M) avec l'hybride **3** et le cisplatine (2), mais moins présente qu'avec l'hybride **4c** (figure 3.8). Il y a donc activation de la caspase-9, via la libération du cytochrome c par la mitochondrie et formation de l'apoptosome. Les REs sont présents dans la mitochondrie (Watson et al., 2007, Yager and Chen, 2007) L'interaction des molécules hybrides avec l'ADN mitochondrial pourrait expliquer l'initiation de la cascade des caspases par la voie mitochondriale et le clivage de la caspase-9 observé lors des traitements effectués.

La caspase-7 clivée est fortement présente après un traitement avec le cisplatine (2) et l'hybride **4c** pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -), mais très peu après un traitement avec l'hybride **3**. La caspase-7 clivée est présente après un traitement avec les hybrides **3** et **4c** pour la lignée MCF-7 (RE α +), mais très peu après un traitement avec le cisplatine (2). Les résultats montrent que la molécule hybride **4c** active la cascade des caspases jusqu'à la caspase-7 dans les deux lignées cellulaires (voir figure 3.8).

La caspase-3 clivée est fortement présente lors du traitement avec le cisplatine (2) et la molécule hybride **4c** pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -) et peu présente pour l'hybride **3**. Les molécules hybrides induisent donc une amplification de la cascade des

caspases via l'activation de la caspase-3 de la lignée MDA-MB-468 (RE α -). Le fait que la lignée MCF-7 (RE α +) n'exprime pas de caspase-3 donne à cette lignée une certaine résistance aux agents cytotoxiques tel le cisplatine (2) (Blanc et al., 2000). Il est normal qu'aucune caspase-3 clivée ne soit observée après un traitement avec les agents cytotoxiques (figure 3.8 E). La résistance aux agents chimiothérapeutiques de la lignée MCF-7 (RE α +) attribuable à l'absence de la caspase-3 confirme les résultats obtenus lors des essais de prolifération effectués dans ce projet. Effectivement, les résultats obtenus ont montré qu'une inhibition de la prolifération cellulaire après un contact des molécules hybrides est plus efficace avec la lignée MDA-MB-468 (RE α -) qu'avec la lignée MCF-7 (RE α +) .

L'abondance de la protéine PARP clivée dans les deux lignées cellulaires a été augmentée significativement ($P < 0.05$) après un traitement avec la molécule hybride 4c (voir figure 3.7), ce qui n'est pas le cas des autres agents cytotoxiques testés. Cette augmentation de la protéine PARP clivée confirme les résultats des caspases obtenus puisque la molécule hybride 4c a montré une présence plus élevée de toutes les caspases ciblées pour les deux lignées cellulaires (voir figure 3.8).

À ce stade, il peut être conclu qu'il existe une similarité entre la molécule hybride 4c et le cisplatine (2) dans les mécanismes menant à l'apoptose. La molécule hybride 4c a montré les mêmes résultats que le cisplatine (2), mais de façon amplifiée. Aucune sélectivité n'a par contre été encore montrée à l'égard du RE α . Tout comme lors des essais de prolifération, le modèle cellulaire ne semble pas adéquat pour montrer une sélectivité des molécules hybrides face au RE α . Il est à nouveau possible que l'effet de sélectivité vis-à vis le RE α soit caché par la présence du RE β et/ou par la présence du GPR30 dans les cellules testées. De plus, une des lignées du modèle cellulaire utilisé dans ce travail semble plus résistante aux agents chimiothérapeutiques en raison de l'absence d'expression de la caspase-3. Le modèle cellulaire proposé, dont les différents types de REs sont inhibés par la technique d'interférence d'ARN (shRNA), pourrait

aussi être utilisé pour montrer l'activation des voies de signalisation cellulaire et la sélectivité face au RE α des molécules hybrides.

L'évaluation de la mort cellulaire a été réalisée avec les mêmes lignées cellulaires comparées et les mêmes agents cytotoxiques comparés aux mêmes doses que l'observation des voies de signalisation cellulaire. Les résultats obtenus ont montré la présence de mort cellulaire par apoptose pour toutes les molécules (voir figure 3.9). Tous les agents cytotoxiques (molécules hybrides **3** et **4c** et le cisplatine (**2**)) provoquent la mort cellulaire à forte dose (10 μ M) de façon significative ($P < 0.05$) pour la lignée MDA-MB-468 (RE α -). Par contre, seule la molécule hybride **4c** à forte dose (10 μ M) a été capable de provoquer une mort cellulaire significative pour la lignée MCF-7 (RE α +). La molécule hybride **3** et le cisplatine (**2**) ont pu provoquer à forte dose (10 μ M) la mort cellulaire pour cette lignée, mais pas de façon significative. Ces résultats de mort cellulaire sont en accord avec les résultats d'abondance de la protéine PARP clivée obtenus. Il semble que la lignée MCF-7 (RE α +) soit moins enclue à l'apoptose que la lignée MDA-MB-468 (RE α -), ce qui confirme la résistance de la lignée MCF-7 (RE α +) aux agents cytotoxiques en raison de l'absence de la caspase-3. À nouveau, aucune sélectivité face à l'expression du RE α n'est montrée par ces résultats. Ce manque de sélectivité face au RE α peut encore une fois être attribué au modèle cellulaire inadapté à la démonstration de cette sélectivité des molécules hybrides face au RE α .

Suite aux résultats obtenus lors de l'investigation des voies de signalisation cellulaire, il peut être conclu que la molécule hybride **4c** est plus毒ique que le cisplatine (**2**) puisqu'elle induit plus fortement les mécanismes d'apoptose et inhibe plus fortement les facteurs de survie cellulaire. Les résultats d'évaluation de la mort cellulaire confirment ces observations. Notre modèle cellulaire ne semblait pas adéquat pour montrer la sélectivité des molécules à l'égard du RE α pour deux raisons. En premier lieu, l'une des lignées cellulaires traitées était plus résistante aux agents cytotoxiques par l'absence de la caspase-3 (Blanc et al., 2000). En second lieu, les molécules ont montré

une affinité pour le RE β qui était exprimé dans les deux lignées cellulaires traitées. Le modèle cellulaire dont les différents types du RE sont inhibés par la technique d'interférence d'ARN (shRNA) pourrait montrer la sélectivité face au RE α lors de l'évaluation de la mort cellulaire induite après un contact avec les molécules hybrides. Ce modèle pourrait aussi montrer l'implication des différents types de RE dans l'apoptose induite par les molécules hybrides.

L'évaluation de l'activation du RE α était essentielle à la compréhension du mode d'action des molécules hybrides. Cette évaluation a été réalisée avec la lignée cellulaire MCF-7 (RE α +) transfectée transitoirement avec un plasmide possédant des éléments du ERE dans son promoteur et exprimant la luciférase une fois le promoteur du plasmide activé. Les molécules de traitement étaient l'E₂ (**1**) et la molécule hybride **4c**. Le but de ce test était de montrer que la molécule hybride **4c** activait le RE α , qui à son tour activait l'ERE présent sur une construction plasmidique conçue à cet effet. Le traitement avec l'E₂ (**1**) permettait de valider la technique. Ce test est préliminaire et aucune conclusion ne peut être émise à ce point de l'investigation. Malgré tout, les résultats obtenus donnent espoir car une activation du RE α par la molécule hybride **4c** et par l'E₂ (**1**) a été observée (voir figure 3.10). Les résultats préliminaires laissent supposer que le traitement avec la molécule hybride E₂-Pt(II) **4c** peut activer le RE α et que celui-ci peut agir au niveau du ERE, et ce, bien qu'une optimisation de la méthode soit nécessaire. Plusieurs obstacles devront être franchis pour l'optimisation de cette technique car les résultats n'ont pas été reproduits avec la même intensité de luminescence lors du second essai (résultats non présentés) et que les luminescences observées ne suivent pas la dose de la stimulation. Aucune dose ne se démarque significativement des autres, que ce soit avec l'E₂ ou avec notre molécule hybride **4c**, et ce, même si les luminescences observées à toutes les doses des différentes molécules sont significatives par rapport aux contrôles.

Les résultats préliminaires montrent que l'efficacité d'insertion du plasmide rapporteur d'activité du RE α dans les cellules semble différer entre les réplicats. Une

avenue pour corriger ce problème serait de cotransférer dans tous les réplicats un plasmide activé de manière constitutive codant pour un autre gène rapporteur. Ce nouveau gène rapporteur serait exprimé proportionnellement au nombre de cellules cotransférées et les luminescences observées pourraient être ajustées au nombre de cellules transférées. Plusieurs plasmides codant pour d'autres gènes rapporteurs peuvent être cotransférés avec le plasmide rapporteur d'activité du RE α : un qui exprime la « Green Fluorescent Protein » (GFP), un qui exprime la β -galactosidase et un qui code une luciférase agissant sur un autre substrat que la luciférase exprimée par le plasmide rapportant l'activité du RE α .

La GFP est une protéine naturellement fluorescente exprimée par les méduses *Aequorea Victoria*. La présence de la protéine GFP est détectée par une lecture de la fluorescence émise. Un exemple de carte schématisée d'un plasmide exprimant la GFP (pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO[®]) est présenté à l'annexe F. La β -galactosidase est une enzyme souvent retrouvée dans les entérobactéries et qui hydrolyse les liens β -galactoside présents dans le lactose. L'hydrolyse de ce lien libère du glucose et du galactose. La β -galactosidase est facilement mise en évidence car elle hydrolyse toute molécule analogue au lactose possédant un lien β -galactoside. Des molécules analogues au lactose sont fréquemment utilisées comme substrat. Elles sont constituées du galactose lié à une molécule chromogénique par un lien β -galactoside qui, lorsqu'hydrolysé par la β -galactosidase, produit le galactose et une molécule qui peut être observée par colorimétrie, par absorbance ou par fluorescence selon la molécule chromogénique liée. Il existe une autre luciférase agissant sur un autre substrat. La luciférase normalement exprimée par la pensée de mer (*Renilla reniformis*) agit sur un substrat appelé coelentrazine, alors que la luciférase exprimée par les lucioles agit sur la luciférine. Un schéma présentant les différentes réactions de bioluminescence des luciférases de lucioles et de la pensée de mer sont présentées en annexe G. Quel que soit le plasmide rapporteur contrôlé choisi pour la cotransfection, il importe que le promoteur du plasmide contrôle, que l'expression et que l'activité de la protéine codée par le

plasmide contrôle ne soient pas influencés par la présence et l'activité d'un autre plasmide rapporteur ou par les traitements appliqués.

Les EREs peuvent être liés par les deux isoformes du RE (Yi et al., 2002) et le test d'affinité exécuté dans ce travail a montré que les molécules hybrides avaient une affinité similaire pour les deux isoformes du RE. L'activation du ERE par les molécules hybrides via le RE α devrait être évaluée à l'aide du modèle cellulaire mentionné précédemment. L'inhibition de l'expression des différents types de RE de façon concomitante ou non permettrait alors de séparer et de comprendre les effets des molécules sur les différents types de RE et leurs activations.

L'évaluation du potentiel chimiothérapeutique des agents cytotoxiques dans un organisme vivant a été réalisée avec deux types de modèle animal complémentaires. Chaque modèle comportait des inconvénients que l'autre modèle comblait par ses avantages. Les molécules hybrides **4c** et **4b** ont été utilisées pour les traitements administrés aux animaux en comparaison avec le cisplatine (2). La molécule hybride **4b** fait partie de la première famille de molécules hybrides synthétisées par notre laboratoire (voir figure 2.2). Elle a été utilisée par manque de la molécule hybride **4c** pour faire ce test. Elle a montré une inhibition de prolifération du même ordre que la molécule hybride **4c** lors des essais de prolifération (voir tableau 3.2).

Le premier modèle animal utilisé était celui des souris Nu/Nu athymiques xénogreffées avec des cellules cancéreuses du sein. Les lignées xénogreffées étaient la lignée MDA-MB-468 (RE α -) et la lignée MCF-7 (RE α +). La présence de ces deux lignées permettait de montrer une sélectivité des molécules à l'égard du RE α *in vivo*. L'avantage de ce modèle animal est qu'il permet de tester les molécules *in vivo* sur des tumeurs composées de cellules d'origine humaine. Ce modèle possède un système immunitaire diminué et les cellules cancéreuses ne font pas partie intégrante du système

physiologique de l'animal. La molécule hybride **4c** et le cisplatine (**2**) ont été testés sur ce modèle animal.

Le deuxième modèle animal utilisé était les rates Sprague-Dawley traitées à 21 jours avec du N-nitrosométhylurée pour provoquer le cancer mammaire. L'avantage de ce modèle est qu'il permet de tester les agents chimiothérapeutiques *in vivo* avec un système physiologique complet et un système immunitaire normal. Son principal inconvénient est qu'il ne permet pas de tester les agents chimiothérapeutiques sur des cellules d'origine humaine. La molécule hybride **4b** et le cisplatine (**2**) ont été testées sur ce modèle animal.

Les résultats obtenus pour les deux lignées cellulaires xénogreffées suite aux traitements imposés au modèle des souris montrent une régression du volume tumoral pour les molécules de traitement. Notre molécule hybride **4c** a induit une régression *in vivo* du volume des tumeurs composées de cellules d'origine humaine, ce qui montre que les molécules sont capables d'atteindre une tumeur *in vivo* et de la faire régresser. Ces résultats montrent aussi que les molécules ont une action cytotoxique sur des cellules d'origine humaine *in vivo*. La molécule hybride **4c** ne s'est pas démarquée du cisplatine (**2**) pour la régression du volume tumoral, mais elle était 2,7 fois moins concentrée que le cisplatine lors des traitements. Les souris ont subi une perte de poids significative durant le traitement avec le cisplatine comparativement aux souris témoins et à celles traitées avec la molécule hybride **4c**. La molécule hybride **4c** peut donc faire régresser *in vivo* des tumeurs RE α + et RE α - d'origine humaine au même titre que le cisplatine (**2**), mais en étant 2,7 fois moins concentrée que ce dernier. Elle induit peu d'effets secondaires comme la perte de poids et la déshydratation, contrairement au cisplatine (**2**).

Les résultats obtenus lors des traitements imposés au modèle de rates NMU montrent une régression *in vivo* du volume des tumeurs dans un système physiologique complet et un système immunitaire normal pour les deux molécules de traitement. La régression tumorale induite par la molécule hybride **4b** n'a pas été significative par rapport au cisplatine (2). Les rates traitées avec le cisplatine (2) ont montré une perte de poids significative, ce qui ne fut pas le cas des rates témoins et des rates traitées avec la molécule hybride **4b**. La molécule hybride **4b** était 2,7 fois moins concentrée que le cisplatine (2). Ainsi, la molécule hybride **4b** peut faire régresser *in vivo* des tumeurs au même titre que le cisplatine (2), tout en étant 2,7 fois moins concentrée que ce dernier. Elle induit peu d'effets secondaires comme la perte de poids et la déshydratation, contrairement au cisplatine (2).

Les résultats obtenus grâce aux deux modèles sont concluants : les molécules sont actives *in vivo* et leur efficacité permet de diminuer leur concentration pour traiter des tumeurs *in vivo*, ce qui induit moins d'effets secondaires tels qu'une perte de poids et la déshydratation. Il peut également être conclu que les molécules ont une activité *in vivo* sur les cellules cancéreuses d'origine humaine. Aucune interaction majeure avec le système immunitaire n'a été détectée sur les rates injectées avec le NMU. L'ensemble de ces résultats suggère que les molécules E₂-Pt(II) ont un grand potentiel pour le traitement des cancers du sein. Puisqu'il y a peu d'effets secondaires comme la déshydratation et la perte de poids, il peut aussi être conclu que les molécules hybrides ont une meilleure efficacité et sélectivité que le cisplatine (2). Par contre, pour que les résultats reflètent mieux une population, l'application d'un traitement sur un plus grand nombre d'individus est nécessaire. De plus, un traitement avec une concentration similaire des molécules hybrides et de cisplatine (2), en abaissant la concentration du cisplatine à celle des molécules hybrides, permettra de mettre plus en valeur l'efficacité des molécules et le peu d'effets secondaires qu'elles induisent.

Malgré les résultats positifs, bien des tests restent à faire avant de passer en étude clinique. La démonstration de la sélectivité à l'égard d'un des deux isoformes des REs devrait être réalisée à l'aide d'un nouveau modèle cellulaire où l'interférence d'ARN via shRNA serait utilisée pour empêcher l'expression des différents types de REs. Ce nouveau modèle cellulaire a été décrit précédemment dans ce chapitre. La sélectivité face au RE α des molécules hybrides est à la base de leurs stratégies d'action. Bien qu'une sélectivité des molécules hybrides face au RE α aurait été souhaitable, il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus ont montré une grande efficacité et toxicité des molécules face aux cellules cancéreuses dans un contexte *in vitro* et *in vivo* en présence du RE β . L'affinité des molécules hybrides face au RE β ne fait donc pas obstacle à leur cytotoxicité, mais pourrait être néfaste pour les cellules saines. L'efficacité et la toxicité des molécules permettent une utilisation *in vivo* à moindre concentration, ce qui diminue les effets secondaires pouvant survenir via une toxicité face aux cellules saines.

Bien que la sélectivité des molécules hybrides face au RE α ne soit pas montrée, le transfert des molécules au traitement des cancers de l'endomètre et de l'ovaire peut être possible. Une majorité d'études soutient que l'isoforme α des REs est dominant dans les cancers ovariens en raison de l'avantage de croissance que procure la surexpression du RE α (Pearce and Jordan, 2004, Pujol et al., 1998). Dans le cas du cancer de l'endomètre, les REs sont exprimés dans 70 à 80 % des cancers de l'endomètre. L'expression de PAX2 est augmentée après un traitement avec l'E₂ (1) ou avec le tamoxifène dans les cellules cancéreuses de l'endomètre, mais pas dans les cellules normales. Le RE α est recruté par le promoteur de PAX2 en réponse à un traitement avec l'E₂ (1) ou avec le tamoxifène. Il est à noter que l'expression de PAX2 est accompagnée d'un taux de division cellulaire élevé (Wu et al., 2005, Silberstein et al., 2002, Muratovska et al., 2003). Les molécules hybrides de la première famille E₂-Pt(II) induisent une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses de l'endomètre et de l'ovaire, certains de ces résultats ayant déjà été publiés (Gagnon et al., 2004b). Le RE α procure un avantage de croissance aux cellules cancéreuses de l'ovaire et de

l'endomètre. Le RE β est quant à lui exprimé par les cellules des cancers de l'endomètre, de l'ovaire et du sein. Les résultats présentés dans ce travail, tout comme ceux précédemment publiés, ont montré que l'isoforme β du RE ne faisait pas obstacle à l'inhibition de prolifération des cellules des cancers du sein, de l'ovaire et de l'endomètre induite par les molécules hybrides.

La technique permettant d'évaluer l'activation des REs par les molécules doit également être optimisée et être exécutée sur le modèle cellulaire qui utilise l'interférence d'ARN (shRNA) pour sa conception afin de parfaire la compréhension du mode d'action des molécules hybrides. Cette technique devrait être exécutée avec un plasmide contrôle cotransfектé pour corriger les différences de transfection entre les puits. Les résultats préliminaires obtenus suite à l'exécution de cette technique ne permettent pas de conclure à l'initiation de la transcription de gènes visés par les REs grâce aux molécules hybrides, mais ils donnent espoir car une activation a été montrée. Une telle technique d'interférence d'ARN optimisée permettrait de statuer sur le caractère agoniste ou antagoniste des molécules hybrides. En effet, si les résultats préliminaires sont reproduits et qu'une activation du ERE via les RE α activés par les molécules hybrides est constatée, le statut agoniste des molécules sera confirmé. L'absence d'activation du ERE permettrait de conclure la nature antagoniste des molécules. La nature agoniste ou antagoniste des molécules pourrait aussi être confirmée par l'ajout d'un antagoniste pur de l'oestrogène (E₂ (1)) tels le ICI 182 780 ou le ICI 164 384 avec des doses croissantes des molécules hybrides au moment de la stimulation au cours du test permettant l'évaluation de l'activation des RE α . Il sera nécessaire d'augmenter la dose des molécules hybrides en présence d'un antagoniste pur de l'E₂ (1) pour obtenir la même réponse qu'en son absence, si les molécules hybrides sont des agonistes de l'E₂ (1). L'effet maximal sera obtenu, mais avec une concentration plus élevée des molécules. Si les molécules hybrides sont de nature agoniste, elles se comporteront en présence d'un antagoniste pur de l'E₂ (1) de la même façon que l'E₂ (1) avec un de ses antagonistes purs.

La biodistribution *in vivo* des molécules devrait également être présentée. Un modèle animal transgénique a récemment été développé; il a été utilisé pour montrer la biodistribution de l'œstrogène et pourrait être utilisé pour étudier la biodistribution des molécules hybrides. Le modèle animal proposé est nommé ERIN (pour « ER action indicator »). Le gène rapporteur de la β -galactosidase et un promoteur ERE ont été incorporés dans le génome des souris à l'état de zygote et les souris subissent une ovariectomie avant la puberté. L'activation du RE induit l'expression de l'enzyme β -galactosidase, dont l'activité peut être évaluée par essai enzymatique et peut être localisée histologiquement. Ce modèle peut être utilisé pour définir les tissus cibles et les éléments qui influencent et régulent la spécificité et la sensibilité des tissus ciblés par les molécules hybrides dans un organisme vivant (Nagel et al., 2001).

La distribution des molécules hybrides dans un organisme vivant peut également être exposée par imagerie moléculaire à la suite d'une liaison des molécules hybrides avec un chromophore. L'avantage de cette avenue réside dans l'utilisation des molécules hybrides marquées pour visualiser la distribution des molécules hybrides dans un organisme vivant et au niveau cellulaire en microscopie, ce qui permettrait de mieux comprendre le mode d'action des molécules hybrides. Plusieurs inconvénients sont par contre possibles puisque la nature du chromophore et l'endroit de liaison du chromophore à les molécules hybrides peuvent interférer avec leur comportement biochimique en changeant la polarité des molécules hybrides, en empêchant la liaison des hybrides aux REs ou en changeant l'affinité des molécules pour les REs et par le fait même affecté la liaison des molécules avec les tumeurs.

L'émergence de la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques tel le cisplatine (2) constitue un des problèmes majeurs rencontrés dans le traitement des cancers. Trois mécanismes de la résistance des cellules cancéreuses face au cisplatine (2) ont été identifiés. Une cellule cancéreuse peut contrer l'effet du cisplatine (2) en augmentant l'efficacité de son système de réparation de

l'ADN, en augmentant l'efficacité de son système de détoxification et en diminuant l'assimilation de l'agent chimiothérapeutique (Gagnon et al., 2004b, Jamieson and Lippard, 1999). Des molécules hybrides de la deuxième famille ont montré une inhibition de la prolifération cellulaire sur une lignée cancéreuse du cancer de l'ovaire reconnue pour être résistante au cisplatine (2) (Gagnon et al., 2004b).

La démonstration que les molécules hybrides peuvent contourner les mécanismes de la résistance aux agents chimiothérapeutiques des cellules cancéreuses leur donnerait un avantage supplémentaire et constituerait un sujet d'étude en soi. Les molécules hybrides devraient répondre aux exigences suivantes : leur affinité pour les REs devrait interférer avec l'action des mécanismes d'assimilation et de détoxification des agents chimiothérapeutiques. Cette exigence pourrait être montrée par un test d'affinité mettant en compétition le RE et les protéines responsables de l'assimilation et de la détoxification cellulaire tels les GSH et les MT. La partie cytotoxique dérivée du cisplatine (2) des molécules ne devrait pas être reconnue par les protéines qui sont responsables de la détoxification cellulaire tels les GSH et les MT. Cette exigence pourrait être montrée par des essais de prolifération avec les molécules en comparaison avec le cisplatine (2) sur des cellules surexprimant des GSH et les MT. L'efficacité avec laquelle les molécules hybrides induisent l'apoptose devrait dépasser l'efficacité maximale du système cellulaire de réparation de l'ADN. Cette exigence pourrait elle aussi être montrée par des essais de prolifération avec les molécules en comparaison avec le cisplatine (2) sur des cellules surexprimant les protéines réparatrices de l'ADN tel la protéine PARP.

Les molécules hybrides ne devraient pas être impliquées dans l'homéostasie du cuivre, puisque la partie cytotoxique des molécules est dérivée du cisplatine (2) et que le cisplatine peut interférer dans l'homéostasie du cuivre tout en induisant une résistance au cisplatine. Cette dernière exigence pourrait être montrée de deux façons : par des essais de prolifération avec les molécules en comparaison avec le cisplatine (2) sur des

cellules préalablement traitées avec des anticorps dirigés contre les protéines CTR1 et ATP7B et par des essais de prolifération cellulaire où l'expression de ces protéines aurait été inhibée par l'interférence d'ARN (shRNA). Les protéines CTR1 et ATP7B sont liées à l'homéostasie du cuivre et sont responsables de l'entrée et de la sortie du cuivre dans la cellule. Elles ont été associées à la résistance des cellules face au cisplatine (Wang and Lippard, 2005, Nakayama et al., 2002, Kanzaki et al., 2002).

En conclusion, les molécules hybrides innovatrices constituent une avenue prometteuse dans le traitement des cancers hormonodépendants puisqu'elles ont montré une meilleure efficacité *in vitro* à induire l'apoptose des cellules cancéreuses et une meilleur efficacité *in vivo* à induire une régression tumorale comparativement au cisplatine (2), tout en induisant moins d'effets secondaires. L'éclaircissement du mode d'action des molécules hybrides E₂-Pt(II) pourra également aider à mettre en lumière certains points nébuleux qui résident dans les mécanismes cellulaires induits par l'E₂ (1). Cela permettra une meilleure compréhension de nombreux autres dysfonctionnements de l'organisme dans lesquels l'implication de l'E₂ (1) a été montrée. Ceci rendra possible l'élaboration de traitements pour des dysfonctionnements tels l'ostéoporose, les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires et de nombreux autres types de cancers, dont le cancer colorectal et le cancer de la prostate.

BIBLIOGRAPHIE

- ARONICA, S. M., KRAUS, W. L. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1994) Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8517-21.
- ASSELIN, E., MILLS, G. B. & TSANG, B. K. (2001) XIAP regulates Akt activity and Caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.*, 61, 1862-1868.
- BARNES, D. & SATO, G. (1980) Serum-free cell culture: a unifying approach. *Cell*, 22, 649-55.
- BAST, R. C., KUFE, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R., HOLLAND, J.F., FREI, E. (2000) Endometrial cancer. IN SOCIETY, A. C. (Ed.) *Cancer Medicine*. 5 ieme ed. Hammilton, London, B.C. Decker Inc, pp. 1631-1822.
- BEEKMAN, J. M., ALLAN, G. F., TSAI, S. Y., TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. (1993) Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol*, 7, 1266-74.
- BERTHOIS, Y., KATZENELLENBOGEN, J. A. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 2496-2500.
- BÉRUBÉ, G. (2003) Estrogen-linked platinum (II) complexes as anticancer agents. *Soumis aux États-Unis le 26 mars 2003 (# 10/397,332) et Soumis au Canada le 28 mars 2003 (# 2,423,454).*
- BERUBE, G., HE, Y., GROLEAU, S., SENE, A., THERIEN, M. H. & CARON, M. (1997) The synthesis and characterization of new triphenylethylene platinum (II) complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 262, 139-145.

BJORNSTROM, L. & SJOBERG, M. (2004) Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl.Recept.*, 2, 3.

BJORNSTROM, L. & SJOBERG, M. (2005) Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol.Endocrinol.*, 19, 833-842.

BLANC, C., DEVERAUX, Q. L., KRAJEWSKI, S., JANICKE, R. U., PORTER, A. G., REED, J. C., JAGGI, R. & MARTI, A. (2000) Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.*, 60, 4386-4390.

BLOOMFIELD, M., JARESKO, G., ZAREK, J. & DOZIER, N. (2003) Guidelines for using darbepoetin alfa in patients with chemotherapy-induced anemia. *Pharmacotherapy*, 23, 110S-118S.

BOHR, V. A., PHILLIPS, D. H. & HANAWALT, P. C. (1987) Heterogeneous DNA damage and repair in the mammalian genome. *Cancer Res.*, 47, 6426-36.

BOSLAND, M. C. (2000) The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 39-66.

BOSSLET, K., STRAUB, R., BLUMRICH, M., CZECH, J., GERKEN, M., SPERKER, B., KROEMER, H. K., GESSON, J. P., KOCH, M. & MONNERET, C. (1998) Elucidation of the mechanism enabling tumor selective prodrug monotherapy. *Cancer Res*, 58, 1195-201.

BOULIKAS, T. (2004) Low toxicity and anticancer activity of a novel liposomal cisplatin (Lipoplatin) in mouse xenografts. *Oncol Rep*, 12, 3-12.

BRUNNER, H. & SPERL, G. (1993) Synthese und Antitumoraktivit it von cis-Dichloroplatin(II)-K omplexen mit Ostradiolderivaten. *Mon. Chem.*, 124, 83-102.

BUTT, A. J., MCNEIL, C. M., MUSGROVE, E. A. & SUTHERLAND, R. L. (2005) Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr.Relat Cancer.*, 12 Suppl 1:S47-59., S47-S59.

CANADA (2007) Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer 2007*. Toronto, Canada, 2006.

CANTLEY, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655-7.

CARDONE, M. H., ROY, N., STENNICK, H. R., SALVESEN, G. S., FRANKE, T. F., STANBRIDGE, E., FRISCH, S. & REED, J. C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [see comments]. *Science*, 282, 1318-1321.

CARMECI, C., THOMPSON, D. A., RING, H. Z., FRANCKE, U. & WEIGEL, R. J. (1997) Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*, 45, 607-617.

CARRUBA, G. (2007) Estrogen and prostate cancer: An eclipsed truth in an androgen-dominated scenario. *J Cell Biochem*.

CASSINO, C., GABANO, E., RAVERA, M., CRAVOTTO, G., PALMISANO, G., VESSIERES, A., JAOUEN, G., MUNDWILER, S., ALBERTO, R. & OSELLA, D. (2004) Platinum(II) and technetium(I) complexes anchored to ethynylestradiol: a way to drug targeting and delivery. *Inorganica Chimica Acta* 357, 2157-2166.

CASTORIA, G., MIGLIACCIO, A., BILANCIO, A., DI DOMENICO, M., DE FALCO, A., LOMBARDI, M., FIORENTINO, R., VARRICCHIO, L., BARONE, M. V. & AURICCHIO, F. (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *Embo J*, 20, 6050-9.

CERSOSIMO, R. J. (2003) Monoclonal antibodies in the treatment of cancer, Part 1. *Am J Health Syst Pharm*, 60, 1531-48.

CHAMBRAUD, B., BERRY, M., REDEUILH, G., CHAMBON, P. & BAULIEU, E. E. (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem*, 265, 20686-91.

CHOWDHURY, I., THARAKAN, B. & BHAT, G. K. (2008) Caspases - An update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151, 10-27.

CHU, Z. L., MCKINSEY, T. A., LIU, L., GENTRY, J. J., MALIM, M. H. & BALLARD, D. W. (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10057-62.

COWLEY, S. M., HOARE, S., MOSSELMAN, S. & PARKER, M. G. (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*, 272, 19858-62.

CRAMER, D. W. & WELCH, W. R. (1983) Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 71, 717-21.

CROOK, N. E., CLEM, R. J. & MILLER, L. K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 67, 2168-74.

CULLEN, K. J., YANG, Z., SCHUMAKER, L. & GUO, Z. (2007) Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. *J Bioenerg Biomembr*, 39, 43-50.

CUMMINGS, S. R., ECKERT, S., KRUEGER, K. A., GRADY, D., POWLES, T. J., CAULEY, J. A., NORTON, L., NICKELSEN, T., BJARNASON, N. H., MORROW, M., LIPPMAN, M. E., BLACK, D., GLUSMAN, J. E., COSTA, A. & JORDAN, V. C. (1999) The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. *Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. JAMA*, 281, 2189-2197.

DELAGE-MOURROUX, R., MARTINI, P. G., CHOI, I., KRAICHELY, D. M., HOEKSEMA, J. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (2000) Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem*, 275, 35848-35856.

DELIGDISCH, L. & HOLINKA, C. F. (1987) Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev*, 10, 237-246.

DELMAS, P. D., BJARNASON, N. H., MITLAK, B. H., RAVOUX, A. C., SHAH, A. S., HUSTER, W. J., DRAPER, M. & CHRISTIANSEN, C. (1997) Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med*, 337, 1641-1647.

DEROO, B. J. & KORACH, K. S. (2006) Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 116, 561-70.

DESCÔTEAUX, C. (2006) "Synthèse améliorée de molécules hybrides estradiol-Pt(II) pour la traitement des cancers féminins hormonodépendants. Étude de l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur l'activité biologique", Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

DESCÔTEAUX, C., PROVENCHER-MANDEVILLE, J., MATHIEU, I., PERRON, V., MANDAL, S. K., ASSELIN, E. & BERUBE, G. (2003) Synthesis of 17beta-estradiol platinum(II) complexes: biological evaluation on breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*, 13, 3927-3931.

DEVARAJAN, P., TARABISHI, R., MISHRA, J., MA, Q., KOURVETARIS, A., VOUGIOUKA, M. & BOULIKAS, T. (2004) Low renal toxicity of lipoplatin compared to cisplatin in animals. *Anticancer Res*, 24, 2193-200.

DEVERAUX, Q. L. & REED, J. C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13, 239-52.

DUAN, R., XIE, W., BURGHARDT, R. C. & SAFE, S. (2001) Estrogen receptor-mediated activation of the serum response element in MCF-7 cells through MAPK-dependent phosphorylation of Elk-1. *J Biol Chem*, 276, 11590-8.

DUAN, R., XIE, W., LI, X., MCDOUGAL, A. & SAFE, S. (2002) Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 384-94.

DUBOIS, R. N., SHAO, J., TSUJII, M., SHENG, H. & BEAUCHAMP, R. D. (1996) G1 delay in cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cancer Res*, 56, 733-7.

DUMITRESCU, R. G. & COTARLA, I. (2005) Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, 9, 208-21.

EARLE, A. S. (1965) *SURGERY IN AMERICA: From The Colonial ERA To The Twentieth Century*, Philadelphia, London, W.B. Saunders Compagny.

- ECKHART, L., BALLAUN, C., UTHMAN, A., KITTEL, C., STICHENWIRTH, M., BUCHBERGER, M., FISCHER, H., SIPOS, W. & TSCHACHLER, E. (2005) Identification and characterization of a novel mammalian caspase with proapoptotic activity. *J Biol Chem*, 280, 35077-80.
- ELLISTON, J. F., FAWELL, S. E., KLEIN-HITPASS, L., TSAI, S. Y., TSAI, M. J., PARKER, M. G. & O'MALLEY, B. W. (1990) Mechanism of estrogen receptor-dependent transcription in a cell-free system. *Mol Cell Biol*, 10, 6607-12.
- EVAN, G. & LITTLEWOOD, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, 281, 1317-1322.
- EVANS, R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, 889-895.
- FAIRALL, L., SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L., FINCH, J. T. & RHODES, D. (1993) The crystal structure of a two zinc-finger peptide reveals an extension to the rules for zinc-finger/DNA recognition. *Nature*, 366, 483-7.
- FATHALLA, M. F. (1971) Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, 2, 163.
- FILARDO, E. J. (2002) Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*, 80, 231-238.
- FISHER, B., COSTANTINO, J. P., REDMOND, C. K., FISHER, E. R., WICKERHAM, D. L. & CRONIN, W. M. (1994) Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J.Natl.Cancer Inst.*, 86, 527-537.
- FISHER, B., DIGNAM, J., BRYANT, J., DECILLIS, A., WICKERHAM, D. L., WOLMARK, N., COSTANTINO, J., REDMOND, C., FISHER, E. R., BOWMAN, D. M., DESCHENES, L., DIMITROV, N. V., MARGOLESE, R. G., ROBIDOUX, A., SHIBATA, H., TERZ, J., PATERSON, A. H., FELDMAN, M. I., FARRAR, W., EVANS, J. & LICKLEY, H. L. (1996) Five versus more than five years of tamoxifen therapy for breast cancer patients with negative lymph nodes and estrogen receptor-positive tumors. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1529-42.

- FOLEY, E. F., JAZAERI, A. A., SHUPNIK, M. A., JAZAERI, O. & RICE, L. W. (2000) Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Res*, 60, 245-8.
- FREISS, G., PREBOIS, C. & VIGNON, F. (1993) William L. McGuire Memorial Symposium. Control of breast cancer cell growth by steroids and growth factors: interactions and mechanisms. *Breast Cancer Res Treat*, 27, 57-68.
- GAGNON, V., MATHIEU, I., SEXTON, E., LEBLANC, K. & ASSELIN, E. (2004a) AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol*, 94, 785-795.
- GAGNON, V., ST GERMAIN, M. E., DESCÔTEAUX, C., PROVENCHER-MANDEVILLE, J., PARENT, S., MANDAL, S. K., ASSELIN, E. & BERUBE, G. (2004b) Biological evaluation of novel estrogen-platinum(II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers-molecular modeling studies. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 5919-5924.
- GIGUERE, V., HOLLENBERG, S. M., ROSENFELD, M. G. & EVANS, R. M. (1986) Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, 46, 645-52.
- GODWIN, A. K., TESTA, J. R., HANDEL, L. M., LIU, Z., VANDERVEER, L. A., TRACEY, P. A. & HAMILTON, T. C. (1992) Spontaneous transformation of rat ovarian surface epithelial cells: association with cytogenetic changes and implications of repeated ovulation in the etiology of ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 84, 592-601.
- GRADY, D., GEBRETSADIK, T., KERLIKOWSKE, K., ERNSTER, V. & PETITTI, D. (1995) Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol*, 85, 304-13.
- GREEN, S., WALTER, P., KUMAR, V., KRUST, A., BORNERT, J. M., ARGOS, P. & CHAMBON, P. (1986) Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320, 134-139.
- GREENE, G. L., GILNA, P., WATERFIELD, M., BAKER, A., HORT, Y. & SHINE, J. (1986) Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231, 1150-1154.

GRIFFITHS, A. J. F., GELBART, W. M., MILLER, J. H. & LEWONTIN, R. C. (2001) *Analyse Génétique Moderne*, Paris, pp. 1-676.

GROSSMANN, J., MOHR, S., LAPENTINA, E. G., FIOCCHI, C. & LEVINE, A. D. (1998) Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am.J Physiol*, 274, G1117-G1124.

GRUBER, C. J., GRUBER, D. M., GRUBER, I. M., WIESER, F. & HUBER, J. C. (2004) Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab*, 15, 73-8.

GUST, R., NIEBLER, K. & SCHONENBERGER, H. (1995) Investigation of the configurational and conformational influences on the hormonal activity of 1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl)ethylenediamines and of their platinum(II) complexes. 1. Synthesis, estradiol receptor affinity, and estrogenic activity of diastereomeric [N-alkyl- and N,N'-dialkyl-1,2-bis(2,6-dichloro-4-hydroxyphenyl) ethylenediamine] dichloroplatinum(II) complexes. *J Med Chem*, 38, 2070-9.

GUSTAFSSON, J. A. (1999) Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action. *J.Endocrinol.*, 163, 379-383.

HALL, J. M. & MCDONNELL, D. P. (2005) Coregulators in nuclear estrogen receptor action: from concept to therapeutic targeting. *Mol Interv*, 5, 343-57.

HANSTEIN, B., LIU, H., YANCISIN, M. C. & BROWN, M. (1999) Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol*, 13, 129-37.

HARLIN, H., REFFEY, S. B., DUCKETT, C. S., LINDSTEN, T. & THOMPSON, C. B. (2001) Characterization of XIAP-deficient mice. *Mol.Cell Biol.*, 21, 3604-3608.

HARTLEY, J. A., GIBSON, N. W., KOHN, K. W. & MATTES, W. B. (1986) DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by three antitumor chloroethylating agents. *Cancer Res*, 46, 1943-7.

HEFFNER, L. J. (2003) *Reproduction humaine*, traduction de la 1^{ière} édition anglaise, Édition De Boeck Université, Paris, France, p.p. 1-123

- HENDERSON, B. E. & FEIGELSON, H. S. (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21, 427-33.
- HERSHKO, A. & CIECHANOVER, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.
- HEWITT, S. C., DEROO, B. J. & KORACH, K. S. (2005) Signal transduction. A new mediator for an old hormone? *Science*, 307, 1572-1573.
- HOFER-WARBINEK, R., SCHMID, J. A., STEHLIK, C., BINDER, B. R., LIPP, J. & DE MARTIN, R. (2000) Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *J.Biol.Chem.*, 275, 22064-22068.
- HOLZER, A. K., SAMIMI, G., KATANO, K., NAERDEMANN, W., LIN, X., SAFAEI, R. & HOWELL, S. B. (2004) The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol*, 66, 817-23.
- HYDER, S. M., CHIAPPETTA, C. & STANCEL, G. M. (1999) Interaction of human estrogen receptors alpha and beta with the same naturally occurring estrogen response elements. *Biochem Pharmacol*, 57, 597-601.
- IMPROTA-BREARS, T., WHORTON, A. R., CODAZZI, F., YORK, J. D., MEYER, T. & MCDONNELL, D. P. (1999) Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 4686-91.
- ISHIDA, S., LEE, J., THIELE, D. J. & HERSKOWITZ, I. (2002) Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctrl in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14298-302.
- JACOBSON, M. D., WEIL, M. & RAFF, M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, 88, 347-54.
- JAMIESON, E. R. & LIPPARD, S. J. (1999) Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem.Rev.*, 99, 2467-2498.

JI, T. H., GROSSMANN, M. & JI, I. (1998) G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*, 273, 17299-302.

JOHNSON, N. P., HOESCHELE, J. D., KUEMMERLE, N. B., MASKER, W. E. & RAHN, R. O. (1978) Effects of platinum antitumor agents and pyrimidine dimers on the in vitro replication of T7 DNA. *Chem Biol Interact*, 23, 267-71.

JORDAN, V. C. & MORROW, M. (1994) Should clinicians be concerned about the carcinogenic potential of tamoxifen? *Eur J Cancer*, 30A, 1714-21.

KAGEYAMA, Y., YAMAZAKI, Y. & OKUNO, H. (1998) Novel approaches to prodrugs of anticancer diaminodichloroplatinum(II) complexes activated by stereoselective enzymatic ester hydrolysis. *J Inorg Biochem*, 70, 25-32.

KANZAKI, A., TOI, M., NEAMATI, N., MIYASHITA, H., OUBU, M., NAKAYAMA, K., BANDO, H., OGAWA, K., MUTOH, M., MORI, S., TERADA, K., SUGIYAMA, T., FUKUMOTO, M. & TAKEBAYASHI, Y. (2002) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is expressed in human breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res*, 93, 70-7.

KARTALOU, M. & ESSIGMANN, J. M. (2001) Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res*, 478, 1-21.

KATZENELLENBOGEN, B. S. (1996) Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways. *Biol. Reprod.*, 54, 287-293.

KATZENELLENBOGEN, B. S., CHOI, I., DELAGE-MOURROUX, R., EDIGER, T. R., MARTINI, P. G., MONTANO, M., SUN, J., WEIS, K. & KATZENELLENBOGEN, J. A. (2000) Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 74, 279-285.

KATZENELLENBOGEN, B. S., MONTANO, M. M., EKENA, K., HERMAN, M. E. & MCINERNEY, E. M. (1997) William L. McGuire Memorial Lecture. Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 44, 23-38.

- KATZENELLENBOGEN, J. A., O'MALLEY, B. W. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1996) Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol*, 10, 119-31.
- KERR, J. F., WYLLIE, A. H. & CURRIE, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J.Cancer*, 26, 239-257.
- KLINGE, C. M. (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*, 29, 2905-19.
- KOMPOLITI, K. (2003) Estrogen and Parkinson's disease. *Front Biosci*, 8, s391-400.
- KOPF-MAIER, P. & MUHLHAUSEN, S. K. (1992) Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro. *Chem Biol Interact*, 82, 295-316.
- KOUNELIS, S., KAPRANOS, N., KOURI, E., COPPOLA, D., PAPADAKI, H. & JONES, M. W. (2000) Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol*, 13, 379-88.
- KRAUS, W. L., MCINERNEY, E. M. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1995) Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 12314-8.
- KUIPER, G. G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HAGGBLAD, J., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138, 863-870.
- KUIPER, G. G., ENMARK, E., PELTO-HUIKKO, M., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J. A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 5925-5930.
- KUMAR, V., GREEN, S., STACK, G., BERRY, M., JIN, J. R. & CHAMBON, P. (1987) Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51, 941-951.

LACASSE, E. C., BAIRD, S., KORNELUK, R. G. & MACKENZIE, A. E. (1998) The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, 17, 3247-3259.

LAND, S. R., WICKERHAM, D. L., COSTANTINO, J. P., RITTER, M. W., VOGEL, V. G., LEE, M., PAJON, E. R., WADE, J. L., 3RD, DAKHIL, S., LOCKHART, J. B., JR., WOLMARK, N. & GANZ, P. A. (2006) Patient-reported symptoms and quality of life during treatment with tamoxifen or raloxifene for breast cancer prevention: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama*, 295, 2742-51.

LAMKANFI, M., DECLERCQ, W., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. (2006) Caspases leave the beaten track: caspase-mediated activation of NF-kappaB. *J Cell Biol*, 173, 165-71.

LEAMON, C. P. & REDDY, J. A. (2004) Folate-targeted chemotherapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 56, 1127-41.

LEE, W. L., CHENG, M. H., CHAO, H. T. & WANG, P. H. (2008) The role of selective estrogen receptor modulators on breast cancer: from tamoxifen to raloxifene. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 47, 24-31.

LEVKAU, B., GARTON, K. J., FERRI, N., KLOKE, K., NOFER, J. R., BABA, H. A., RAINES, E. W. & BREITHARDT, G. (2001) XIAP induces cell-cycle arrest and activates nuclear factor-kappaB : new survival pathways disabled by caspase-mediated cleavage during apoptosis of human endothelial cells. *Circ Res*, 88, 282-90.

LEWIS, J., BURSTEIN, E., REFFEY, S. B., BRATTON, S. B., ROBERTS, A. B. & DUCKETT, C. S. (2004) Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 9023-9.

LEYGUE, E., DOTZLAW, H., LU, B., GLOR, C., WATSON, P. H. & MURPHY, L. C. (1998a) Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 3754-5.

LEYGUE, E., DOTZLAW, H., WATSON, P. H. & MURPHY, L. C. (1998b) Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res*, 58, 3197-201.

- LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S. & WANG, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-89.
- LISTON, P., FONG, W. G., KELLY, N. L., TOJI, S., MIYAZAKI, T., CONTE, D., TAMAI, K., CRAIG, C. G., MCBURNEY, M. W. & KORNELUK, R. G. (2001) Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat. Cell Biol.*, 3, 128-133.
- MA, Y., CHAN, C. Y. & HE, M. L. (2007) RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol*, 13, 5169-79.
- MACGREGOR, J. I. & JORDAN, V. C. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev*, 50, 151-96.
- MANAVATHI, B. & KUMAR, R. (2006) Steering estrogen signals from the plasma membrane to the nucleus: two sides of the coin. *J Cell Physiol*, 207, 594-604.
- MARINO, M., ACCONCIA, F., BRESCIANI, F., WEISZ, A. & TRENTALANCE, A. (2002) Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells. *Mol Biol Cell*, 13, 3720-9.
- MAUCHER, A. & VON ANGERER, E. (1993) Antiproliferative activity of casodex (ICI 176.334) in hormone-dependent tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*, 119, 669-74.
- MIGLIACCIO, A., DI DOMENICO, M., CASTORIA, G., DE FALCO, A., BONTEMPO, P., NOLA, E. & AURICCHIO, F. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J*, 15, 1292-300.
- MONTANO, M. M., EKENA, K., DELAGE-MOURROUX, R., CHANG, W., MARTINI, P. & KATZENELLENBOGEN, B. S. (1999) An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 6947-52.

- MORRIS, M., EIFEL, P. J., LU, J., GRIGSBY, P. W., LEVENBACK, C., STEVENS, R. E., ROTMAN, M., GERSHENSON, D. M. & Mutch, D. G. (1999) Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med*, 340, 1137-43.
- MOSSELMAN, S., POLMAN, J. & DIJKEMA, R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, 392, 49-53.
- MURATOVSKA, A., ZHOU, C., HE, S., GOODYER, P. & ECCLES, M. R. (2003) Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*, 22, 7989-97.
- NADAL, A., ROPERO, A. B., FUENTES, E. & SORIA, B. (2001) The plasma membrane estrogen receptor: nuclear or unclear? *Trends Pharmacol. Sci.*, 22, 597-599.
- NAGEL, S. C., HAGELBARGER, J. L. & MCDONNELL, D. P. (2001) Development of an ER action indicator mouse for the study of estrogens, selective ER modulators (SERMs), and Xenobiotics. *Endocrinology*, 142, 4721-4728.
- NAHTA, R. & ESTEVA, F. J. (2003) HER-2-targeted therapy: lessons learned and future directions. *Clin Cancer Res*, 9, 5078-84.
- NAKAYAMA, K., KANZAKI, A., OGAWA, K., MIYAZAKI, K., NEAMATI, N. & TAKEBAYASHI, Y. (2002) Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP. *Int J Cancer*, 101, 488-95.
- NICHOLSON, D. W. (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- NICHOLSON, D. W. (2001) Apoptosis. Baiting death inhibitors. *Nature*, 410, 33-34.

- NILSSON, S., MAKELA, S., TREUTER, E., TUJAGUE, M., THOMSEN, J., ANDERSSON, G., ENMARK, E., PETTERSSON, K., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. (2001) Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.*, 81, 1535-1565.
- NORMAN, A. W., MIZWICKI, M. T. & NORMAN, D. P. (2004) Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 3, 27-41.
- NUNEZ, G., BENEDICT, M. A., HU, Y. & INOHARA, N. (1998) Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17, 3237-3245.
- OGAWA, S., INOUE, S., WATANABE, T., HIROI, H., ORIMO, A., HOSOI, T., OUCHI, Y. & MURAMATSU, M. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 243, 122-6.
- OHASHI, K., KAJIYA, K., INABA, S., HASEGAWA, T., SEKO, Y., FURUCHI, T. & NAGANUMA, A. (2003) Copper(II) protects yeast against the toxicity of cisplatin independently of the induction of metallothionein and the inhibition of platinum uptake. *Biochem Biophys Res Commun*, 310, 148-52.
- OKADA, H. & MAK, T. W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer*, 4, 592-603.
- OLIVER, F. J., DE LA RUBIA, G., ROLLI, V., RUIZ-RUIZ, M. C., DE MURCIA, G. & MURCIA, J. M. (1998) Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem*, 273, 33533-9.
- ORIAN, A., WHITESIDE, S., ISRAEL, A., STANCOVSKI, I., SCHWARTZ, A. L. & CIECHANOVER, A. (1995) Ubiquitin-mediated processing of NF-kappa B transcriptional activator precursor p105. Reconstitution of a cell-free system and identification of the ubiquitin-carrier protein, E2, and a novel ubiquitin-protein ligase, E3, involved in conjugation. *J Biol Chem*, 270, 21707-14.
- OSBORNE, C. K. & ARTEAGA, C. L. (1990) Autocrine and paracrine growth regulation of breast cancer: clinical implications. *Breast Cancer Res Treat*, 15, 3-11.

- OSBORNE, C. K., CLEMMONS, D. R. & ARTEAGA, C. L. (1990) Regulation of breast cancer growth by insulin-like growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 37, 805-9.
- OTTO, A. M., FADERL, M. & SCHONENBERGER, H. (1991) Dissociation of estrogenic and cytotoxic properties of an estrogen receptor-binding platinum complex in human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, 51, 3217-23.
- OZOLS, R. F., BOOKMAN, M. A., CONNOLLY, D. C., DALY, M. B., GODWIN, A. K., SCHILDER, R. J., XU, X. & HAMILTON, T. C. (2004) Focus on epithelial ovarian cancer. *Cancer Cell*, 5, 19-24.
- PALMIERI, C., CHENG, G. J., SAJI, S., ZELADA-HEDMAN, M., WARRI, A., WEIHUA, Z., VAN NOORDEN, S., WAHLSTROM, T., COOMBES, R. C., WARNER, M. & GUSTAFSSON, J. A. (2002) Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9, 1-13.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J. & PISANI, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J.Clin.*, 55, 74-108.
- PEARCE, S. T. & JORDAN, V. C. (2004) The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev.Oncol.Hematol.*, 50, 3-22.
- PERRON, V., RABOUI, D., ASSELIN, E., PARENT, S., R, C. G. & BERUBE, G. (2005) Synthesis of 17beta-estradiol-linked platinum(II) complexes and their cytoidal activity on estrogen-dependent and -independent breast tumor cells. *Bioorg Chem*, 33, 1-15.
- POLLAK, A., ROKACH, A., BLUMENFELD, A., ROSEN, L. J., RESNIK, L. & DRESNER POLLAK, R. (2004) Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronary artery disease. *Eur Heart J*, 25, 240-5.
- PRALL, O. W., SARCEVIC, B., MUSGROVE, E. A., WATTS, C. K. & SUTHERLAND, R. L. (1997) Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem*, 272, 10882-94.

PROVENCHER-MANDEVILLE, J. (2007) "Synthèse et activité biologique d'une série de dérivés estradiol-platine(II) comportant une chaîne polyéthylène glycol", Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Trois-Rivières.

PUJOL, P., REY, J. M., NIRDE, P., ROGER, P., GASTALDI, M., LAFFARGUE, F., ROCHEFORT, H. & MAUDELONDE, T. (1998) Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.*, 58, 5367-73.

RAO, B. R. & SLOTMAN, B. J. (1991) Endocrine factors in common epithelial ovarian cancer. *Endocr Rev.*, 12, 14-26.

RAZANDI, M., PEDRAM, A., GREENE, G. L. & LEVIN, E. R. (1999) Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol.*, 13, 307-19.

REEDIJK, J. (1999) Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing S-donor ligands available in the cell? *Chem. Rev.*, 99, 2499-2510.

REVANKAR, C. M., CIMINO, D. F., SKLAR, L. A., ARTERBURN, J. B. & PROSSNITZ, E. R. (2005) A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307, 1625-1630.

ROLLERVA, E. & URBANCIKOVA, M. (2000) Intracellular estrogen receptors, their characterization and function (Review). *Endocr. Regul.*, 34, 203-218.

ROSE, C. (2003) A comparison of the efficacy of aromatase inhibitors in second-line treatment of metastatic breast cancer. *Am J Clin Oncol*, 26, S9-16.

ROSE, P. G., BUNDY, B. N., WATKINS, E. B., THIGPEN, J. T., DEPPE, G., MAIMAN, M. A., CLARKE-PEARSON, D. L. & INSALACO, S. (1999) Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*, 340, 1144-53.

- ROSSOUW, J. E., ANDERSON, G. L., PRENTICE, R. L., LACROIX, A. Z., KOOPERBERG, C., STEFANICK, M. L., JACKSON, R. D., BERESFORD, S. A., HOWARD, B. V., JOHNSON, K. C., KOTCHEN, J. M. & OCKENE, J. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama*, 288, 321-33.
- SABBAH, M., REDEUILH, G. & BAULIEU, E. E. (1989) Subunit composition of the estrogen receptor. Involvement of the hormone-binding domain in the dimeric state. *J Biol Chem*, 264, 2397-400.
- SANNA, M. G., DA SILVA CORREIA, J., DUCREY, O., LEE, J., NOMOTO, K., SCHRANTZ, N., DEVERAUX, Q. L. & ULEVITCH, R. J. (2002) IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: the TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition. *Mol Cell Biol*, 22, 1754-66.
- SANNA, M. G., DUCKETT, C. S., RICHTER, B. W., THOMPSON, C. B. & ULEVITCH, R. J. (1998) Selective activation of JNK1 is necessary for the anti-apoptotic activity of hILP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6015-20.
- SCHIFF, P. B., FANT, J. & HORWITZ, S. B. (1979) Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature*, 277, 665-7.
- SCHIFF, P. B. & HORWITZ, S. B. (1980) Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 77, 1561-1565.
- SCHIMMER, A. D., DALILI, S., BATEY, R. A. & RIEDL, S. J. (2006) Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell Death Differ*, 13, 179-88.
- SCHMEDTJE, J. F., JR., JI, Y. S., LIU, W. L., DUBOIS, R. N. & RUNGE, M. S. (1997) Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 272, 601-8.
- SCHWABE, J. W., CHAPMAN, L., FINCH, J. T. & RHODES, D. (1993) The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell*, 75, 567-78.

- SCHWABE, J. W., NEUHAUS, D. & RHODES, D. (1990) Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature*, 348, 458-61.
- SEVERIN, S. E., MOSKALEVA, E., SHIMYREV, II, POSY PANNOVA, G. A., BELOUSOVA YU, V., SOLOGUB, V. K., LUZHKOY YU, M., NAKACHIAN, R., ANDREANI, J. & SEVERIN, E. S. (1995) Alpha-fetoprotein-mediated targeting of anti-cancer drugs to tumor cells in vitro. *Biochem Mol Biol Int*, 37, 385-92.
- SHEARMAN, A. M., CUPPLES, L. A., DEMISSIE, S., PETER, I., SCHMID, C. H., KARAS, R. H., MENDELSOHN, M. E., HOUSMAN, D. E. & LEVY, D. (2003) Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease. *Jama*, 290, 2263-70.
- SHEARMAN, A. M., KARASIK, D., GRUENTHAL, K. M., DEMISSIE, S., CUPPLES, L. A., HOUSMAN, D. E. & KIEL, D. P. (2004) Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J Bone Miner Res*, 19, 773-81.
- SHERMAN, M. E., STURGEON, S., BRINTON, L. & KURMAN, R. J. (1995) - Endometrial cancer chemoprevention: implications of diverse pathways of carcinogenesis, *J Cell Biochem. Suppl* 23 160-164.
- SHERWIN, B. B. (2003) Estrogen and cognitive functioning in women. *Endocr Rev*, 24, 133-51.
- SHIBATA, H., SPENCER, T. E., ONATE, S. A., JENSTER, G., TSAI, S. Y., TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. (1997) Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res.*, 52:141-64; discussion 164-5, 141-164.
- SHIBATA, T., MAHOTKA, C., WETHKAMP, N., HEIKAUS, S., GABBERT, H. E. & RAMP, U. (2007) Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagn Mol Pathol*, 16, 1-8.
- SHULMAN, L. M. (2002) Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease? *Parkinsonism Relat Disord*, 8, 289-95.

- SILBERSTEIN, G. B., DRESSLER, G. R. & VAN HORN, K. (2002) Expression of the PAX2 oncogene in human breast cancer and its role in progesterone-dependent mammary growth. *Oncogene*, 21, 1009-16.
- SLAMON, D. J., CLARK, G. M., WONG, S. G., LEVIN, W. J., ULLRICH, A. & MCGUIRE, W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 235, 177-82.
- SLAMON, D. J., GODOLPHIN, W., JONES, L. A., HOLT, J. A., WONG, S. G., KEITH, D. E., LEVIN, W. J., STUART, S. G., UDOVE, J., ULLRICH, A. & ET AL. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707-12.
- SLEDZ, C. A. & WILLIAMS, B. R. (2004) RNA interference and double-stranded-RNA-activated pathways. *Biochem Soc Trans*, 32, 952-6.
- SLEE, E. A., ADRAIN, C. & MARTIN, S. J. (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 7320-6.
- SOBIN, L. H., WITTEKIND, C. (1997) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 5e éd., Toronto, A John Wiley & Sons, Inc., Publication, pp. 1-165.
- SORENSEN, C. M. & EASTMAN, A. (1988) Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res*, 48, 4484-8.
- SPEELMANS, G., SIPS, W. H., GRISEL, R. J., STAFFHORST, R. W., FICHTINGER-SCHEPMAN, A. M., REEDIJK, J. & DE KRUIJFF, B. (1996) The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochim Biophys Acta*, 1283, 60-6.
- SPEELMANS, G., STAFFHORST, R. W., VERSLUIS, K., REEDIJK, J. & DE KRUIJFF, B. (1997) Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*, 36, 10545-50.

STENNICKE, H. R., JURGENSMEIER, J. M., SHIN, H., DEVERAUX, Q., WOLF, B. B., YANG, X., ZHOU, Q., ELLERBY, H. M., ELLERBY, L. M., BREDESEN, D., GREEN, D. R., REED, J. C., FROELICH, C. J. & SALVESEN, G. S. (1998) Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J.Biol.Chem.*, 273, 27084-27090.

STENNICKE, H. R. & SALVESEN, G. S. (1998) Properties of the caspases. *Biochim.Biophys.Acta*, 1387, 17-31.

SYED, V., ULINSKI, G., MOK, S. C., YIU, G. K. & HO, S. M. (2001) Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Res.*, 61, 6768-76.

TAYLOR, J. A., LEWIS, K. J. & LUBAHN, D. B. (1998) Estrogen receptor mutations. *Mol Cell Endocrinol.*, 145, 61-6.

THIGPEN, J. T., BRADY, M. F., ALVAREZ, R. D., ADELSON, M. D., HOMESLEY, H. D., MANETTA, A., SOPER, J. T. & GIVEN, F. T. (1999) Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol.*, 17, 1736-44.

THOMAS, P., PANG, Y., FILARDO, E. J. & DONG, J. (2005) Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146, 624-632.

THOMPSON, C. B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462.

TING, A. Y., KIMLER, B. F., FABIAN, C. J. & PETROFF, B. K. (2007) Characterization of a preclinical model of simultaneous breast and ovarian cancer progression. *Carcinogenesis*, 28, 130-5.

TROMP, R. A., VAN BOOM, S. S., MARCO TIMMERS, C., VAN ZUTPHEN, S., VAN DER MAREL, G. A., OVERKLEEF, H. S., VAN BOOM, J. H. & REEDIJK, J. (2004) The beta-glucuronyl-based prodrug strategy allows for its application on beta-glucuronyl-platinum conjugates. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 4273-6.

- TSAI, M. J. & O'MALLEY, B. W. (1994) Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.*, 63:451-86., 451-486.
- TSUJII, M. & DUBOIS, R. N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, 83, 493-501.
- TZENG, D. Z. & KLINGE, C. M. (1996) Phosphorylation of purified estradiol-liganded estrogen receptor by casein kinase II increases estrogen response element binding but does not alter ligand stability. *Biochem Biophys Res Commun*, 223, 554-60.
- VAN ZUTPHEN, S. & REEDIJK, J. (2005) Targeting Platinum Anti-tumour Drugs: Overview of Strategies Employed to Reduce Systemic Toxicity. *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 2845-2853
- VIATOUR, P., MERVILLE, M. P., BOURS, V. & CHARIOT, A. (2005) Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci*, 30, 43-52.
- VIVACQUA, A., BONOFIGLIO, D., RECCHIA, A. G., MUSTI, A. M., PICARD, D., ANDO, S. & MAGGIOLINI, M. (2006) The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mol Endocrinol*, 20, 631-46.
- VIVANCO, I. & SAWYERS, C. L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2, 489-501.
- VOGEL, V. G., COSTANTINO, J. P., WICKERHAM, D. L., CRONIN, W. M., CECCHINI, R. S., ATKINS, J. N., BEVERS, T. B., FEHRENBACHER, L., PAJON, E. R., JR., WADE, J. L., 3RD, ROBIDOUX, A., MARGOLESE, R. G., JAMES, J., LIPPMAN, S. M., RUNOWICZ, C. D., GANZ, P. A., REIS, S. E., MCCASKILL-STEVENS, W., FORD, L. G., JORDAN, V. C. & WOLMARK, N. (2006) Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 trial. *Jama*, 295, 2727-41.

VOGEL, V. G. (2006) Recent results from clinical trials using SERMs to reduce the risk of breast cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1089, 127-42.

WALTER, P., GREEN, S., GREENE, G., KRUST, A., BORNERT, J. M., JELTSCH, J. M., STAUB, A., JENSEN, E., SCRACE, G. & WATERFIELD, M. (1985) Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 82, 7889-7893.

WANG, D. & LIPPARD, S. J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 307-20.

WATSON, C. S., ALYEA, R. A., JENG, Y. J. & KOCHUKOV, M. Y. (2007) Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues. *Mol Cell Endocrinol*, 274, 1-7.

WU, H., CHEN, Y., LIANG, J., SHI, B., WU, G., ZHANG, Y., WANG, D., LI, R., YI, X., ZHANG, H., SUN, L. & SHANG, Y. (2005) Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature*, 438, 981-987.

WU, K. K. (2005) Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 72, 89-93.

WWW.CANCER.CA (2006), Uniform Resource Locator
http://www.cancer.ca/ccs/internet/standard/0,3182,3649_369365__langId-fr,00.html

WWW.PANOMICS.COM, Uniform Resource Locator <http://www.panomics.com/>

WWW.INVITROGEN.COM, Uniform Resource Locator
http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=7&CID=KNC-GOOGLE&s_kwcid=invitrogen|539112853&gclid=CPLfi4y6tZICFQIGxgodOU EUQQ

WYLLIE, A. H., KERR, J. F. & CURRIE, A. R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.

- YAGER, J. D. & CHEN, J. Q. (2007) Mitochondrial estrogen receptors--new insights into specific functions. *Trends Endocrinol Metab*, 18, 89-91.
- YANG, Y., FANG, S., JENSEN, J. P., WEISSMAN, A. M. & ASHWELL, J. D. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science*, 288, 874-7.
- YANG, Y. L. & LI, X. M. (2000) The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res*, 10, 169-77.
- YANG, Z., SCHUMAKER, L. M., EGORIN, M. J., ZUHOWSKI, E. G., GUO, Z. & CULLEN, K. J. (2006) Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res*, 12, 5817-25.
- YARBRO, C. H., FROGGE, M.H., GOODMAN, M. (2005) *Cancer Nursing Principles and Practice*, 6e éd., Jones and Bartlett Publishers, Toronto, Canada, p.p. 1-1879.
- YI, P., DRISCOLL, M. D., HUANG, J., BHAGAT, S., HILF, R., BAMBARA, R. A. & MUYAN, M. (2002) The effects of estrogen-responsive element- and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ER alpha and ER beta. *Mol Endocrinol*, 16, 674-93.
- YIN, X. M. & DONG, Z. (2003) *Essentials of Apoptosis A Guide for Basic and Clinical Research*, 1e éd., Humana Press, Totowa, U.S.A., pp. 3-175.
- YLIKOMI, T., BOCQUEL, M. T., BERRY, M., GRONEMEYER, H. & CHAMBON, P. (1992) Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J*, 11, 3681-94.
- YUE, W., WANG, J. P., LI, Y., BOCCHINFUSO, W. P., KORACH, K. S., DEVANESAN, P. D., ROGAN, E., CAVALIERI, E. & SANTEN, R. J. (2005) Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin Cancer Res*, 11, 925s-30s.

- ZHANG, D. & TRUDEAU, V. L. (2006) Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 144, 306-15.
- ZHANG, H., D'ARPA, P. & LIU, L. F. (1990) A model for tumor cell killing by topoisomerase poisons. *Cancer Cells*, 2, 23-7.
- ZHANG, Q. X., HILSENBECK, S. G., FUQUA, S. A. & BORG, A. (1996) Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 59, 251-60.
- ZWELLING, L. A. (1989) Topoisomerase II as a target of antileukemia drugs: a review of controversial areas. *Hematol Pathol*, 3, 101-12.

ANNEXE A

Explications des différents stades du cancer de l'utérus classé selon la stadification

TNM qui est utilisé et approuvé par la FIGO, l'AJCC et l'UICC.

Stades	TNM			Explications
I	T1			La tumeur limitée au corps de l'utérus
IA	T1a	N0	M0	La tumeur limitée au revêtement interne de l'utérus (endomètre)
IB	T1b	N0	M0	La tumeur s'étant propagée à la moitié intérieure de la couche de muscle de l'utérus (myomètre)
IC	T1c	N0	M0	La tumeur s'étant propagée à la moitié extérieure de la couche de muscle de l'utérus (myomètre)
II	T2			La tumeur s'étant propagée au col de l'utérus, sans toutefois atteindre l'extérieur de l'utérus
IIA	T2a	N0	M0	La tumeur s'étant propagée aux glandes du col
IIB	T2b	N0	M0	La tumeur s'étant propagée au tissu conjonctif du col
III	T3			La tumeur s'étant propagée hors de l'utérus et du col, sans toutefois aller au-delà du bassin
IIIA	T3a	M0	N0	La tumeur s'étant propagée à l'un ou plusieurs des éléments suivants; la couche externe de l'utérus, le tissu situé juste à l'extérieur de l'utérus, le revêtement de la paroi interne de l'abdomen (péritoine)
IIIB	T3b	N0	M0	La tumeur s'étant propagée au vagin
IIIC	T1-3	N1	M0	La tumeur s'étant propagée aux ganglions lymphatiques situés dans le bassin ou autour de l'aorte (ganglions para-aortiques)
IV	T4			La tumeur s'étant propagée à la muqueuse de la vessie ou de l'intestin, ou encore à des emplacements éloignés
IVA	T4	Tout N	M0	La tumeur s'étant propagée à la muqueuse de l'intestin ou de la vessie
IVB	Tout T	Tout N	M1	Des métastases à distance, incluant les ganglions lymphatiques de l'abdomen ou de l'aine

Disponible sur le site : WWW.CANCER.CA (2006).

ANNEXE B

Explications des différents stades du cancer du sein classé selon la stadification TNM qui est utilisé et approuvé par l'AJCC et l'UICC.

Stades	TNM			Explications
0	Tis	N0	M0	Cancer confiné aux canaux, aux lobules ou au mamelon, qui ne s'est pas propagé au tissu mammaire avoisinant
I	T1	N0	M0	Le diamètre de la tumeur mesure 2 cm ou moins.
IIA	T0	N1	M0	Absence de tumeur dans le sein. Le cancer s'est propagé dans 1 à 3 ganglions axillaires.
	T1	N1	M0	La tumeur mesure 2 cm ou moins de diamètre. Le cancer s'est propagé dans 1 à 3 ganglions axillaires et/ou dans les ganglions mammaires.
	T2	N0	M0	La tumeur mesure plus de 2 cm, mais moins de 5 cm.
IIB	T2	N1	M0	La tumeur mesure plus de 2 cm, mais moins de 5 cm de diamètre. Le cancer s'est propagé dans 1 à 3 ganglions axillaires et/ou dans les ganglions mammaires.
	T3	N0	M0	La tumeur mesure plus de 5 cm de diamètre.
IIIA	T0	N2	M0	Absence de tumeur dans le sein. Le cancer s'est propagé dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires.
	T1	N2	M0	La tumeur mesure 2 cm ou moins de diamètre. Le cancer s'est propagé dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires.
	T2	N2	M0	La tumeur mesure plus de 2 cm, mais moins de 5 cm de diamètre. Le cancer s'est propagé dans 4 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires.
	T3	N1, N2	M0	La tumeur mesure plus de 5 cm de diamètre. Le cancer s'est propagé dans 1 à 9 ganglions axillaires ou dans les ganglions mammaires.
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0	La tumeur s'est propagée à la paroi thoracique ou à la peau. Le cancer ne s'est propagé dans aucun ganglion lymphatique, ou s'est propagé dans 1 à 9 ganglions axillaires; le cancer peut ou non s'être propagé dans les ganglions mammaires.
IIIC	tout T	N3	M0	Tumeur de toute taille. Le cancer s'est propagé dans 10 ganglions axillaires ou plus, ou dans 1 ganglion infraclaviculaire ou sus-claviculaire ou plus, ou dans plus de 3 ganglions axillaires et dans les ganglions mammaires.
	T4d			Cancer inflammatoire du sein. Ce type de cancer est de stade III (IIIB ou IIIC), sauf s'il s'est propagé vers des emplacements éloignés ou dans des ganglions lymphatiques situés loin du sein, auquel cas il est de stade IV.
IV	tout T	tout N	M1	Tumeur de toute taille. N'importe quel degré d'atteinte ganglionnaire. Le cancer s'est propagé vers des emplacements éloignés comme les os, le foie, les poumons, le cerveau ou des ganglions lymphatiques situés loin du sein.

Disponible sur le site : WWW.CANCER.CA (2006).

ANNEXE C

Explications des différents stades du cancer de l'ovaire classé selon la stadification TNM qui est utilisé et approuvé par l'AJCC et la FIGO.

Stades	TNM			Explication
I	T1	N0	M0	La tumeur limitée aux ovaires.
IA	T1a	N0	M0	La tumeur limitée à un ovaire.
IB	T1b	N0	M0	La tumeur affectant les deux ovaires. Les ovaires sont intacts.
IC	T1c	N0	M0	La tumeur est limitée à un ovaire ou affectant les deux ovaires et qui possède l'une des caractéristiques suivantes; rupture de l'ovaire (capsule), présence d'une tumeur à la surface de l'ovaire, présence de cellules cancéreuses dans le liquide prélevé dans l'abdomen (ascite ou lavâges péritonéaux). Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases.
II	T2	N0	M0	Extension pelvienne. Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases.
IIA	T2a	N0	M0	L'utérus ou des trompes sont atteints. Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases.
IIB	T2b	N0	M0	D'autres tissus du bassin sont atteints. Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases.
IIC	T2c	N0	M0	Il y a présence de cellules cancéreuses dans le liquide prélevé dans l'abdomen (ascite ou lavâges péritonéaux). Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases à distance.
III	Tout T	N0, N1	M0	Le péritoine hors du bassin ou des ganglions lymphatiques régionaux sont atteints. Il y a absence de métastases à distance.
IIIA	T3a	N0	M0	Il y a métastases péritonéales microscopiques. Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases à distance.
IIIB	T3b	N0	M0	Il y a des métastases péritonéales macroscopiques de 2 cm ou moins. Il n'y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases à distance.
IIIC	T3c	N0	M0	Il y a des métastases péritonéales de plus de 2 cm Il y a aucune atteinte ganglionnaire et absence de métastases à distance.
	Tout T	N1	M0	Il y a des tumeurs de toute taille. Il y a atteinte des ganglions lymphatiques régionaux, mais une absence de métastases à distance.
IV	Tout T	Tout N	M1	Il y a propagation vers des sites éloignés comme des organes ou des ganglions lymphatiques.

Disponible sur le site : WWW.CANCER.CA (2006).

ANNEXE D

Le tableau ci-dessous permet de comparer les systèmes de stadification du cancer de l'ovaire de la classification TNM, de l'AJCC et de la FIGO.

Stades selon l'AJCC	Stadification TNM			Stades selon la FIGO
I	T1	N0	M0	I
IA	T1a	N0	M0	IA
IB	T1b	N0	M0	IB
IC	T1c	N0	M0	IC
II	T2	N0	M0	II
IIA	T2a	N0	M0	IIA
IIB	T2b	N0	M0	IIB
IIC	T2c	N0	M0	IIC
III	Tout T	N0, N1	M0	III
IIIA	T3a	M0	M0	IIIA
IIIB	T3b	N0	M0	IIIB
IIIC	T3c	N0	M0	IIIC
	Tout T	N1	M0	IIIC
IV	Tout T	Tout N	M1	IV

Disponible sur le site : WWW.CANCER.CA (2006).

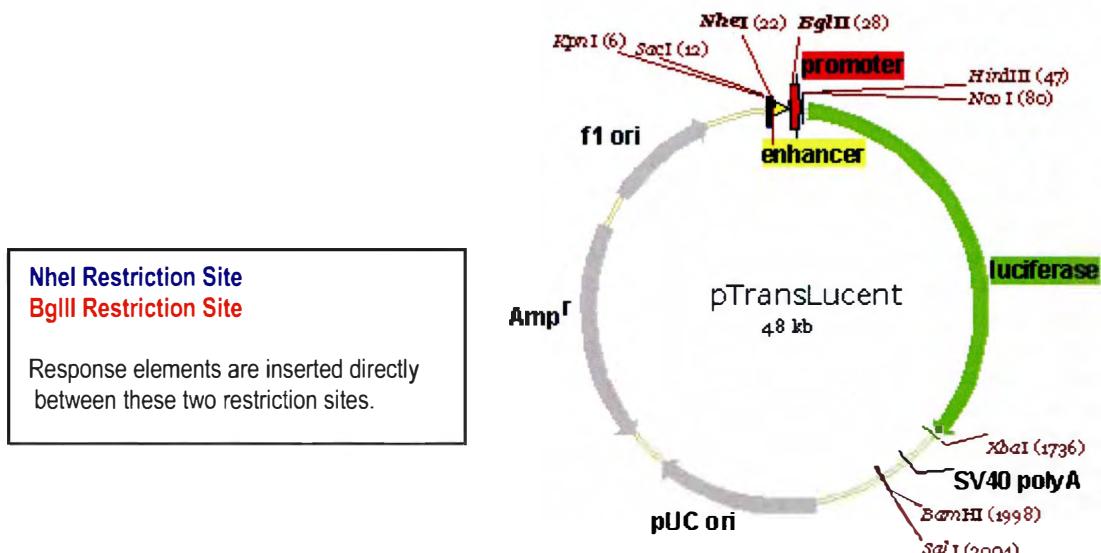
ANNEXE E

Carte schématisée et séquence du plasmide Translucent ERE Reporter Vector 4.8 Kb



TransLucent Reporter Control Vector Sequence, Catalog #: LR0000

Vector contains minimal TA promoter immediately upstream of luciferase gene (*Photinus pyralis*).

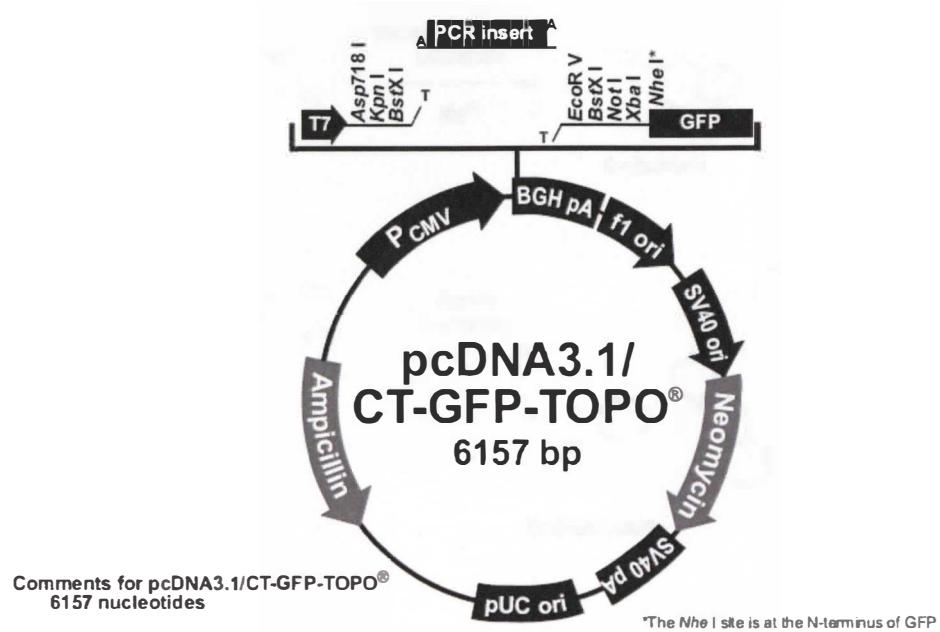


ggtaaccggagcttacgcgt**gctagc**ccgggctcg**agatct**gggtatataatggaaagcttggcattccggactgttgtaaaggccaccatggaaagacgcacaaaacataaagaaggccggcgccattctatccgctggagatggaaaccgcgtggagagacaactgcataaggctatgaagagatacgcctggcgttctggaaacaattgctttacagatgcacatatcgagggtggacatcacttgcgtgagacttgcggaaatgtccgttcgggtggcagaa gctatgaaacgatatgggctgaatacaaatacagaatcgtcgtatgcagtggaaaactcttcaattctt atgcccgtgttggcgcgttatttatcgagggtgcagttgcagttgcgcggcgaacgcacattataatgaacgtg aattgctcaacagtatgggcatttcgcagcctaccgtggtgcgttccaaaagggggttgcaaaaaattt tgaacgtgcaaaaaaagctcccaatcatccaaaaatttattatcatggattctaaaacggattaccagggatttcagtgcgttgcacacgttgcgtcacatctcatctacccgggtttaatgaatacgtatttgcgcag agtccttcgataggacaagacaattgcactgatcatgaactcctctggatctactggctgcctaaaggtgtcgcctgcctcatagaactgcctgcgtgagatttcgcgcattttggcaatcaaatttccggatactgcgattttaagtgttgcgttccattccatcaggtttggaaatgttactacactcggatattgatatgtggatttcgcgttgcgtcttaatgtatagattgaagaagagactgtttctgaggagccttcaggattacaagattcaaagtgcgcgtgcgttgcacccatttccttcgcacaaagcactctgattgacaatacqatttataatttacacqaaattqcttctqgtqgcqctccctctctaqqaaqtgcqqqaag

cggttgccaaaggatccatctgccaggatcaggcaaggatatgggctactgagactacatcagctatt
 ctgattacacccgagggggatgataaaaccgggcgcggtcgtaaagtgttccattttgaagcgaagg
 tgtggatctggataccgggaaaacgctggcggttaatcaaagaggcgaactgtgtgagaggcttatga
 ttatgtccggttatgtaaacaatccggaagcgaaccccttattcatcggtgaccgcctgaagtctgat
 ggagacatagcttactggacgaagacaaacttcttcatcggtgaccgcctgaagtctgat
 caaaggctatcaggtggctcccgctgaatttgaatccatcttgcctcaacacccaaacatctcgacgc
 gtgcgcaggcttcccgacgtacgcggtaacttccgcgcgttgggtttggacacggaa
 acatgacggaaaaagagatcgtggattacgtgcgcagtcaagtaacaaccgcggaaaatgtgcgcggagg
 agttgtgtttgtggacgaagttaccggaaaactcgacgcagaaaaatcagagagatcc
 tcataaaggccaagaaggcgaaagatcgccgttaattcttagatcgccccggccgcctcgagca
 gacatgataagatacattgtgatgatggacaaaccacaactagaatgcagtaaaaaatgttttattt
 tggaaatttgcgtattgcatttttgcattataagctgcataaaacaagttacaacaacaaatt
 gcattcatttatgtttcaggttcagggggaggtgtggaggtttttaagcaagtaaaaccttacaaa
 tggtaaaatcgataaggatccgtcgaccggccaaaccagatgatcttccgcgcaccagatgatc
 tggctcgatgccttgcggcctcaaccaggatcgccttccgcgtggcgccggcatgactatcg
 gccgacttatgactgttttatcatgcactcgtaggcacagggtgcgcgcagcgcttccgcct
 cgctactgactcgctcgctcggtcggtcgccgcggatcactcaaggcgtaata
 cggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcc
 cgtaaaaggccgcgttgcggcgttttccataggctccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
 gctcaagtcagagggtggcggaaaccgcacaggactataaagataccaggcgttccgc
 gtgcgtctccgttccgcaccctgcgttaccggatacctgtccgccttccgc
 gcttctcatagctcacgcgttaggtatctcagttcggttaggtcgctcgatcc
 acgaaccggccgttgcggccttgcgccttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagc
 aggttcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agccagttacccgcggaaaagagttgttagcttgcgttgcgttgcgttgc
 tttttgtttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ggggtctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcacctagatcctttaattaaatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gacagttaccaatgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgactcccgctgttagataactacgatcgggagggttaccatct
 cgcgagaccacgcgtcaccggctccagattatcagcaataacc
 agtggcctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 gccagttatagttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tggcttcattcagtcgggttccacgcataaggcgagttacat
 gttgtcaaaaaagcg
 gttagctccgtccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 agactgcataattcttactgtcatgcgttgcgttgcgttgc
 agtcatctgagaatagtgtatgcggcgttgcgttgcgttgc
 ccacatagcagaactttaaaagtgcgttgcgttgcgttgc
 accgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ccagcggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tggtaataactcatactttcaatattattgttgcgttgcgttgc
 atacatattgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ctgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
 gccagcgccctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tcaagctctaaatcgccgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ttgattagggtatgggtacgttagtggccatcgccgtat
 tccacgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 tgatttataaggatgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cgaatttataacaaaatattacgttacaatttccatt
 caggctgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 cgtatcggtgcggcgcgcgcgcgcgcgcgcgc
 ggagggtacttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 atcgatagactaacacgcgttgcgttgcgttgcgttgc
 ccagtgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc

ANNEXE F

Carte schématisée du plasmide pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO 6157 bp.



Disponible sur le site : WWW.INVITROGEN.COM

ANNEXE G

Schéma présentant les réactions de bioluminescences catalysées par les luciférases de luciole et de pensée de mer.

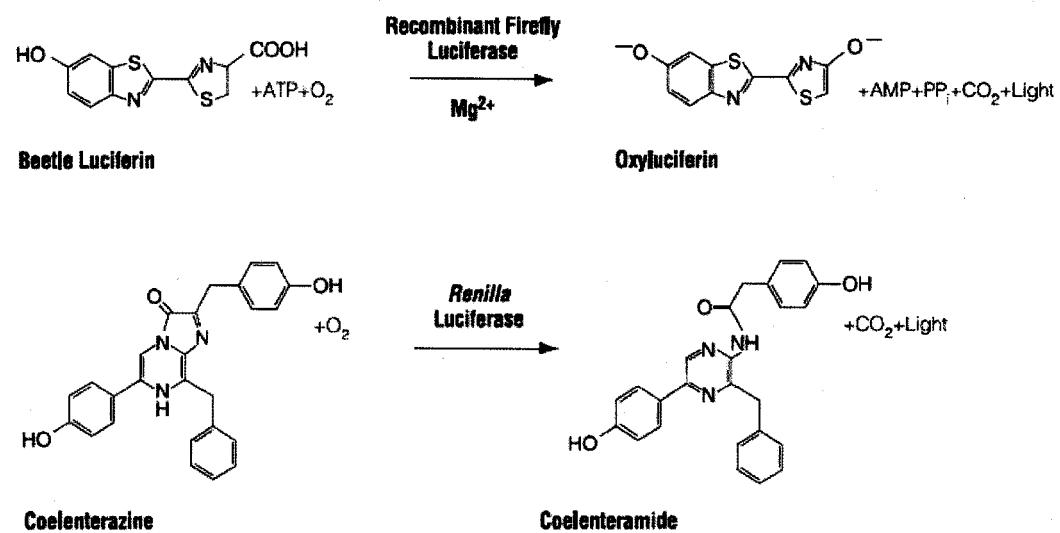


Image tirée du site internet : WWW.PANOMICS.COM.