



HAL
open science

Impact des ligands de PPARs, et leurs dérivés, sur les cellules cancéreuses coliques humaines : modifications des statuts redox et glycolytique

Sophie Huber-Villaume

► **To cite this version:**

Sophie Huber-Villaume. Impact des ligands de PPARs, et leurs dérivés, sur les cellules cancéreuses coliques humaines : modifications des statuts redox et glycolytique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0217 . tel-01751199

HAL Id: tel-01751199

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751199>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Sophie HUBER-VILLAUME

**Impact des ligands de PPAR, et de leurs dérivés,
sur les cellules cancéreuses coliques humaines :
modifications des statuts redox et glycolytique**

Le 25 novembre 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Thierry FOURNIER (DR INSERM, Université Paris Descartes)

M. Jean-Noël FREUND (DR INSERM, Université de Strasbourg)

Examineurs :

M. Pierre LEROY (PU, Université de Lorraine)

M. Benoît MAUNIT (PU, Université d'Orléans)

M. Tony HEURTAUX (Chercheur associé, Université du Luxembourg)

Mme. Stéphanie HESSE (MCU, Université de Lorraine)

M. Patrick CHAIMBAULT (PU, Université de Lorraine, **Directeur de thèse**)

M. Hervé SCHOHN (MCU, Université de Lorraine, **Co-directeur de thèse**)

UMR 7565, SRSMC - Laboratoire Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, Faculté des Sciences et Techniques, Université de Lorraine, 54506 Vandoeuvre les Nancy

EA 4632, LCP-A2MC - Laboratoire de Chimie et Physique Approche Multiéchelle des Milieux Complexes, ICPM, Université de Lorraine, 57078 Metz Cedex 3

Remerciements

Ce travail de doctorat a été réalisé sous la direction du Professeur Patrick CHAIMBAULT et d'Hervé SCHOHN, Maître de conférences, au sein du laboratoire SRSMC (Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires) et du LCPA2MC (Laboratoire de Chimie et Physique Approche Multiéchelle des Milieux Complexes) de l'Université de Lorraine.

Je remercie Jean-Noël FREUND et Thierry FOURNIER, Directeurs de Recherche, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs et membres du jury. Je remercie également les Professeurs Benoit MAUNIT et Pierre LEROY, tout comme Stéphanie HESSE, Maître de conférences, et Tony HEURTAUX, chercheur associé, d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Merci également aux Professeurs Denyse BAGREL et Gilbert KIRSCH de m'avoir accueillie au sein du LIMBP, puis aux Professeurs Yves FORT et Raphael DUVAL pour leur accueil au sein du SRSMC.

Merci à tous les membres du laboratoire que j'ai côtoyés durant cette thèse et qui ont participé à sa bonne réalisation. Merci à Adeline, Aline, Hélène A., Emilie, Tzvete, Sandrine et Stéphanie P. pour leurs conseils avisés, mais également pour toutes nos discussions de "filles" ! Merci à Stéphanie H., Germain, Estelle et Loïc pour leur aide précieuse en chimie ! Merci à Eric pour son soutien, que ce soit en matière de recherche ou d'enseignement et merci à Hélène S., la dernière arrivée, pour son aide à la préparation de l'oral. J'adresse également mes remerciements à tous les stagiaires, que j'ai eu la chance d'encadrer durant cette thèse, et qui ont participé activement à la réalisation de ce travail. Enfin, je remercie tout particulièrement Hervé, de m'avoir suivi tout au long de cette thèse, et même auparavant. Merci pour toutes ces discussions scientifiques ou non scientifiques, ce soutien sans faille et cette gentillesse bienveillante.

Je remercie mes proches pour leur soutien inconditionnel tout au long de cette aventure. Tout d'abord, mes parents, pour m'avoir toujours permis de concilier mes études avec mes rêves sportifs et mon petit frère qui se lance à son tour dans le périple de la thèse. Puis, un grand merci à mon mari tout neuf de m'avoir supportée dans la phase de rédaction. Pour finir, une pensée pour ce petit bout de chou qui était déjà présent lors de la soutenance et qui viendra illuminer nos vies dans quelques mois.

Liste des publications et des communications

Publications

S. Huber, S. Valente, P. Chaimbault, H. Schohn. Evaluation of $\Delta 2$ -pioglitazone, an analogue of pioglitazone, on colon cancer cell survival: Evidence of drug treatment association with autophagy and activation of the Nrf2/Keap1 pathway. *Int J Oncol*. 2014, 45, 426-38. doi: 10.3892/ijo.2014.2408.

G. Revelant, **S. Huber**, S. Dunand, G. Kirsch, H. Schohn, S. Hesse. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents. *Manuscrit soumis à Eur. J. Med. Chem*, 2014

S. Huber, G. Revelant, E. Sibille, S. Philippot, D. Bagrel, P. Chaimbault, S. Hesse, H. Schohn. 2-(Thienothiazolyimino)-1,3-thiazolidin-4-ones inhibit Cell Division Cycle 25 A phosphatase. *Manuscrit en preparation*.

S. Huber, C. Fiatte, N. Kieffer, M. Dauça, H. Schohn. Fenofibrate inhibits human colon adenocarcinoma HT29 cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Manuscrit en préparation*.

Posters & communications

S. Huber, P. Chaimbault, H. Schohn, Impact du Fénofibrate, un agoniste de PPAR α , sur les cellules cancéreuses coliques humaines HT29 *in vitro* et *in vivo*, 15^{ème} réunion AEP-Bio, 13 juin 2014, Dijon. **Présentation orale de 10 min.**

S. Huber, S. Valente, P. Chaimbault, H. Schohn, Impact de la Δ Pioglitazone, un analogue de la Pioglitazone, sur la prolifération et le statut oxydant de cellules cancéreuses coliques humaines *in vitro*. 32^{ème} Congrès CECED, 20 et 21 mars 2014, Paris. **Présentation orale de 10 min.**

S. Huber, S. Valente, P. Chaimbault, H. Schohn, Impact de la $\Delta 2$ -Pioglitazone sur les cellules cancéreuses coliques humaines HT29. Journée de l'école doctorale Biose, 1^{er} avril 2014. Prix du meilleur **Poster**.

S. Huber, G. Revelant, S. Dunand, G. Kirsch, D. Bagrel, S. Hesse, H. Schohn, Impact des dérivés thiazolidinones sur les cellules cancéreuses coliques humaines, 7^{ième} Forum Du Cancéropôle Grand-Est (CGE), 25-26 novembre 2013, Strasbourg. **Poster**

G. Revelant, E. Girot, **S. Huber**, H. Schohn, S. Hesse, D. Bagrel, G. Kirsch Synthesis and Biological evaluation of 1,3-thiazolidin-4-ones on human colon HT29 cells, 48th International Conference on Medicinal Chemistry, Interfacing Chemical Biology and Drug Discovery - Poitiers, 4-6 july, 2012. **Poster**

Table des matières

Introduction

I.	Généralités sur les cancers coliques	1
	A. La cancérogénèse	1
	B. Incidence des cancers coliques	1
	C. Les différents types de cancers coliques et leurs origines génétiques	4
	D. Implication de l'alimentation dans l'incidence des cancers coliques	6
II.	Le récepteur nucléaire PPAR et ses agonistes	6
	A. Présentation des récepteurs PPAR	6
	B. Mode d'action des récepteurs PPAR	8
	C. Régulation de l'activité des récepteurs PPAR	9
	D. Les agonistes des récepteurs PPAR	10
	1. Les agonistes de PPARα	10
	2. Les agonistes de PPARγ	12
	a. La ΔPGJ2	12
	b. Les Thiazolidinédiones (TZD)	14
	E. Antagonistes des récepteurs PPAR	17
	1. Les antagonistes de PPARα	17
	2. Les antagonistes de PPARγ	18
III.	Action des ligands de PPAR dans la biologie des cancers	20
	A. Rôle de PPARα dans la biologie des cancers	20
	1. Implication de PPARα dans la cancérogénèse	20
	2. Propriétés anticancéreuses des agonistes de PPARα	20
	a. Propriétés apoptotiques des agonistes de PPARα	20
	b. Propriétés anti-prolifératives des agonistes de PPARα	21
	c. Propriétés anti-invasives des agonistes de PPARα	21
	d. Propriétés anti-angiogéniques des agonistes de PPARα	22
	e. Propriétés préventives des agonistes de PPARα	22
	B. Rôle de PPARβ/δ dans la biologie des cancers	22
	1. Implication de PPARβ/δ dans la cancérogénèse	22
	2. Propriétés anti-cancéreuses des agonistes de PPARβ/δ	24
	C. Rôle de PPARγ dans la biologie des cancers	24
	1. Implication de PPARγ dans la cancérogénèse	24

2. Propriétés anti-cancéreuses des agonistes de PPAR γ	25
a. Propriétés pro-apoptotiques des agonistes de PPAR γ	25
b. Propriétés anti-prolifératives des agonistes de PPAR γ	26
c. Propriétés anti-invasives des agonistes de PPAR γ	28
d. Propriétés anti-angiogéniques des agonistes de PPAR γ	28
e. Propriétés préventives des agonistes de PPAR γ	29
IV. Le stress oxydant	29
A. Espèces réactives et système antioxydant	29
1. Les espèces réactives	29
2. Le système antioxydant	31
a. Le système du glutathion	31
b. Les enzymes antioxydantes	33
c. Les molécules non enzymatiques	33
B. Effets du stress oxydant et réponses cellulaires	34
1. Rôle des ROS dans la signalisation cellulaire	34
2. Rôle des ROS dans la dégradation cellulaire	35
3. Rôle des ROS dans l'induction de l'apoptose et la nécrose	35
4. Rôle des ROS dans l'induction de l'autophagie	35
5. Rôle des ROS dans la réponse UPR	36
C. La voie de signalisation antioxydante Nrf2/Keap1	36
1. Activation de la voie Nrf2/Keap1 en réponse à un stress oxydant	36
2. Régulation de la voie Nrf2/Keap1	39
3. La voie de signalisation Nrf2/Keap1 et la cancérogénèse	40
a. La voie Nrf2/Keap1 lutte contre la cancérogénèse	40
b. La voie Nrf2/Keap1 impliquée dans la cancérogénèse	40
4. Implication de la voie Nrf2/Keap1 dans la biogénèse mitochondriale et la régulation du métabolisme énergétique	41
5. Autres implications de la voie de signalisation Nrf2/Keap1	42
D. PPAR et stress oxydant	43
1. PPAR α et stress oxydant	43
2. PPAR γ et stress oxydant	43
a. PPAR γ impliqué dans le système antioxydant	43
b. Les agonistes de PPAR γ inducteurs d'espèces réactives	45

V. Les 4- thiazolidinones, des dérivés de TZD, non agonistes de PPARγ	48
A. Activité anti-cancéreuse des 4-thiazolidinones	48
1. Inhibition des phosphatases et kinases	50
2. Inhibition des MMPs	51
3. Inhibition de COX2	51
4. Inhibition de l'aldose réductase	52
5. Inhibition de l'angiogénèse	52
B. Autres activités des 4-thiazolidinones	52
VI. Métabolique et Cancer	53
A. Les principales voies métaboliques	53
1. La glycolyse	54
2. Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative	55
3. La voie des pentoses phosphates	57
4. La lipolyse	58
B. Le métabolisme, pilote du devenir cellulaire	60
1. Métabolisme et cycle cellulaire	60
2. Métabolisme et mort cellulaire	60
3. Métabolisme et autophagie	61
4. Métabolisme et stress oxydant	61
C. Altération du métabolisme dans les cellules cancéreuses : l'effet Warburg	61
1. Définition de l'effet Warburg	61
2. Implication des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs	62
a. HIF-1	62
b. Sirt1, p53 et c-myc	64
3. Interférence des agonistes de PPAR avec l'effet Warburg	64
a. Interférence des agonistes de PPAR α avec l'effet Warburg	64
b. Interférence des agonistes de PPAR β/δ avec l'effet Warburg	66
c. Interférence des agonistes de PPAR γ avec l'effet Warburg	66
Objectifs et Stratégies	69

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire	71
A. Entretien des cellules	71
B. Traitement des cellules	71
C. Tests de prolifération	72
1. Test MTT	72
2. Comptage au Bleu Trypan	72
3. Test de clonogénicité	72
II. Analyse par cytométrie en flux	72
A. Etude du cycle cellulaire	72
B. Test de viabilité	73
C. Mesure quantitative de la production d'espèces réactives	73
D. Quantification des vésicules autophagiques	74
III. Dosage du GSH par fluorimétrie	74
A. Traitement des cellules et préparation des échantillons	74
B. Dosage de la forme réduite du glutathion	75
IV. Immunoréplique	75
A. Préparation des extraits totaux, cytoplasmiques et nucléaires	75
B. Electrophorèse en conditions dénaturantes et transfert sur membrane	76
C. Détection immunologique	77
D. Dot blot	77
V. Techniques cytologiques	77
A. Utilisation de sondes fluorescentes	77
B. Immunocytochimie	78
VI. Dosages colorimétriques	78
A. Dosage du glucose	78
B. Dosage du lactate	79
C. Dosage de l'activité LDH	79
VII. Analyses statistiques	79

Résultats et Discussion

I. Activité anticancéreuse des ligands de PPAR	83
A. Diminution de la croissance cellulaire par les ligands de PPAR	83
1. Diminution de la croissance cellulaire par les ligands de PPAR γ	83
2. Diminution de la croissance cellulaire par Féno	85
B. Arrêt du cycle cellulaire par les ligands de PPAR	88
C. Effet des ligands de PPAR sur la mort cellulaire	89
1. Absence d'induction de la mort cellulaire par apoptose par les ligands de PPAR γ	89
2. Absence d'induction de la mort cellulaire par apoptose par Féno	91
D. Induction du phénomène d'autophagie	94
1. Action des ligands de PPAR γ	94
2. Action du Féno	96
E. Induction d'un stress oxydant par les ligands de PPAR	98
1. Induction d'un stress oxydant par les ligands de PPAR γ	98
a. Production de ROS et de RNS	98
b. Implication de PPAR γ dans la production du stress oxydant	102
c. Origine des espèces réactives	103
2. Induction d'un stress oxydant par Féno	105
a. Production de ROS et de RNS	105
b. Implication de PPAR α dans la production du stress oxydant	109
c. Origine des espèces réactives	110
F. Diminution du contenu en glutathion réduit (GSH) par les ligands de PPAR	111
1. Diminution du contenu en GSH par les ligands de PPAR γ	111
2. Diminution du contenu en GSH par Féno	115
G. Impact des ligands de PPAR sur l'activation de la voie Nrf2/Keap1	117
1. Activation de la voie Nrf2/Keap1 par les ligands de PPAR γ	117
a. Translocation nucléaire de Nrf2	117
b. Expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1	119
c. Induction de l'expression de HO-1 dépendante du stress oxydant, mais indépendante de l'activation du récepteur PPAR γ	121

d. Absence d'effet de la voie Nrf2/Keap1 sur la diminution de viabilité induite par les ligands de PPAR γ	123
2. Absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1 par Féno	124
a. Absence de translocation nucléaire de Nrf2	124
b. Absence d'induction de l'expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1	125
H. Impact du stress oxydant sur la viabilité cellulaire	125
1. Modification de la viabilité cellulaire par les ligands de PPAR γ dépendante du stress oxydant	125
a. Diminution de la prolifération par les ligands de PPAR γ - Importance du stress oxydant	125
b. Induction de l'autophagie par les ligands de PPAR γ - Importance du stress oxydant	128
2. Modification de la viabilité cellulaire par Féno - Importance du stress oxydant	128
I. Modification du métabolisme glycolytique par les ligands de PPAR	129
1. Augmentation du métabolisme glycolytique par les ligands de PPAR γ	130
2. Augmentation du métabolisme glycolytique par Féno	132
J. Conclusion	134
II. Activité anticancéreuse des dérivés 4-thiazolidinones	136
A. Etudes préliminaires	136
1. Criblage par MTT	136
2. Criblage par comptage au bleu Trypan	140
3. Conclusion des essais préliminaires	141
B. Etude approfondie des effets des dérivés 4-thiazolidinones sélectionnés	142
1. Effets des dérivés de la série thiophénique	142
a. Diminution de la prolifération cellulaire	142
b. Diminution de la viabilité cellulaire	143
c. Induction du phénomène d'autophagie	146
d. Induction d'un stress oxydant	147
e. Modification du taux de GSH	149
f. Absence d'impact du stress oxydant sur la croissance cellulaire	150

g. Absence d'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1	151
2. Effets des dérivés de la série thiazolique	152
a. Diminution de la prolifération cellulaire	152
b. Diminution de la viabilité cellulaire	154
c. Induction du phénomène d'autophagie	156
d. Impact sur le stress oxydant	157
e. Absence de modification du taux de GSH	159
f. Absence d'impact du stress oxydant sur la croissance cellulaire	159
g. Absence d'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1	160
C. Conclusion	161
III. Inhibition de la phosphatase CDC25A par les 4-thiazolidinones	161
A. Inhibition de l'activité des CDC25 <i>in vitro</i>	162
B. Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires	164
C. Arrêt du cycle cellulaire	166
D. Inhibition de l'activité des CDC25 <i>in cellulo</i>	166
E. Absence de modification de la viabilité cellulaire	167
F. Absence d'induction de l'autophagie	168
G. Production d'un stress oxydant	169
Conclusion et Perspectives	
I. Impact des ligands de PPAR sur les cellules cancéreuses coliques	171
II. Impact des dérivés 4-thiazolidinones sur les cellules cancéreuses	173
Bibliographie	I
Publications	

Liste des abréviations

5-FU : 5-Fluorouracile
ACC : AcetylcoA Carboxylase
ACLY : *ATP-citrate synthase*
ACO : Aconitase
ACO : AcylcoA oxydase
ACS : AcylcoA synthétase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADRP : *Adipose differentiation-related protein*
ALA : Acide lipoïque
ALDO : *Aldolase*
ALR2 : Aldose réductase 2
AMPK : *5' AMP-activated protein Kinase*
AOM : Azoxyméthane
AP-1 et 2 : *Activator Protein-1 and 2*
APC : *Adenomatous Polyposis Coli*
ARE : *Antioxydant Response Element*
ARN : Acide RiboNucléique
ASB : Albumine Sérique Bovine
Asc : Acide ascorbique
Atg : *Autophagy-related proteins*
ATM : *Ataxia Telangiectasia Mutated*
ATP : Adénosine-5'-triphosphate
Bad : *Bcl-2-associated death promoter*
Bax : *Bcl-2-associated X protein*
BCL2 : *B-cell lymphoma 2*
Bim : *Bcl2-interacting mediator of cell death*
BSO : L-Buthionine-(S-R)-sulfoximine
CBP : *CREB-binding protein*
CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CDC25 : *Cell Division Cycle 25*
CDDO : *2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid*
Cdk : *cyclin dependent kinase*
CIN : instabilité chromosomique
CK2 : *Caseine Kinase 2*
CO : oxyde de carbone

CoA : Coenzyme A
CoQ : Ubiquinone
CoQH2 : Ubiquinone réduite
COX : CycloOXygénase
CPT : Carnitine palmitoyltransférase
Cpt : Camptothécine
Cul3 : *Cullin 3*
CXCR4 : *C-X-C chemokine receptor type 4*
DAF : triazolofluorescéine
DAF2-DA : 4,5-diaminofluorescéine diacétate
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCC : *Deleted in Colorectal Cance*
DCF : Dichlorofluorescéine
DCF-DA : 2'-7'-dichlorofluorescéine diacétate
DFO : Desferrioxamine
DHA : Acide docosahexaénoïque
DHLA : Acide Dihydrolipoïque
DHR : Dihydrorhodamine 123
DMEM : Milieu Essentiel Minimum modifié par Dulbecco
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DR1 : *Direct Repeat 1*
Drg-1 : *Differentiation-related gene-1*
DRIP205 : *Vitamin D-interacting Protein 205*
DSS : *Dextran Dodium Sulfate*
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGCG : *Epigallocatechin-3-gallate*
EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor*
ENO : *Enolase*
Erk : *Extracellular signal-regulated kinases*
FABPs : *Fatty-Acid-Binding Proteins*
FACS : *Fluorescence-activated cell sorting*
FADH2 : Flavine adénine dinucléotide réduite
FAP : *Familial Adenomatous Polyposis*
FAS : *Fatty Acid Synthase*
Féno : Fénofibrate
FGF21 : *Fibroblast growth factor 21*

FH : *fumarate hydratase*
FITC : *Fluorescein isothiocyanate*
FoxO3A : *Forkhead box O3*
FSH : *Follicle Stimulating Hormone*
G6PDH : *Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase*
GAPDH : *Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogénase*
GCL : *γ-GlutamylCystéine Ligase*
GK : *Glycerol Kinase*
GLS : *Glutaminase*
GLUT1 : *Glucose Transporter 1*
GPD : *Glycerol-3-Phosphate Déshydrogénase*
GPI : *Glucose-6- Phosphate Isomérase*
GPx : *GSH Peroxydase*
GR : *GSH Réductase*
GS : *Glutathion Synthétase*
GSH : *Glutathion réduit*
GSK3β : *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*
GSSG : *Glutathion oxydé*
GSTs : *Glutathion-S-Transférases*
GTP : *Guanosine triphosphate*
GW : *GW9662*
h : *heures*
H₂O₂ : *Peroxyde d'hydrogène*
HEX : *Hexokinase*
HIF : *Hypoxia-Inducible Factor*
HIV-1 : *Human Immunodeficiency Virus*
hMLH1 : human mutL homolog 1
hMSH2 : human mutS homolog 2
HNE : *4-hydroxynonénal*
HNPCC : *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*
HO-1 : *Heme Oxygenase 1*
HPH : *HIF prolyl hydroxylases*
HRP : *horseradish peroxidase*
Hsp : *Heat Shock Protein*
hTERT : *human telomerase reverse transcriptase*
IC₅₀ : *half maximal inhibitory concentration*
IDH : *Isocitrate DésHydrogénase*

IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor I*
IKK : *IκB kinase*
IL : *Interleukine*
iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*
IP : Iodure de Propidium
IRS-1 : *Insulin Receptor Substrate 1*
JNK : *c-Jun N-terminal kinases*
Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein 1*
KLF4 : *Krüppel-like factor 4*
KO : *knock out*
LBD : *Ligand Binding domain*
LC-MS : Chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse
LDH : Lactate Déshydrogénase
LKB1 : *Liver kinase B1*
LMW-PTP : *Low molecular weight protein tyrosine phosphatase*
L-NAME (L-N) : L-N^G-Nitroarginine methyl ester
LOX : Lipoxygénase
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharide
LXRα : *Liver X Receptors*
Mad-1 : *Mitotic spindle assembly checkpoint protein*
MALDI-TOF : *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight mass spectrometry*
Man : D-Mannitol
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinases*
MDH : Malate DésHydrogénase
ME : Enzyme malique
MEK : MAPK kinase
Min : *Multiple intestinal neoplasia*
min : minutes
MIN : Instabilités des microsattellites
miR : microARN
MK : MK886
MMP : *Matrix Metalloproteinases*
MMR : *MisMatch Repair*
MRP : *Multidrug Resistance associated Proteins*
mTOR : *mammalian Target Of Rapamycin*
MTT : Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)

NAC : N-acétyl cystéine
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAG-1 : *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-Activated Gene-1*
NAT1 : Arylamine N-acétyl-transférase 1
NCoR : *Nuclear receptor co-repressor*
NDA : 2,3-naphtalène dicarboxaldéhyde
NES : *Nuclear export sequence*
NFκB : *Nuclear Factor-kappa B*
NHR : *Nuclear hormone receptor*
NO : oxide nitrique
NOX : NADPH oxydase
NP40 : Tergitol-type NP-40
NQO1 : *NAD(P)H dehydrogenase quinone 1*
NRF1 : *Nuclear Respiratory Factor-1*
Nrf2 : *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
NS : NS398
O₂^{•-} : Anions superoxydes
OGDH : *2-OxoGlutarate DésHydrogénase*
OH• : Radical hydroxyl
OMF : *3-O-methylfluoresceine*
OMFP : *3-O-methylfluoresceine phosphate*
ONOO⁻ : Peroxyde nitrique
p38MAPK : *p38 mitogen-activated protein kinases*
PARP-1 : Poly(ADP-ribose) polymérase-1
PBP : *PPAR-binding protein*
pBQ : para Benzoquinone
PBS : Tampon phosphate
PC : Pyruvate Carboxylase
PDH : Pyruvate DésHydrogénase
PDK : Pyruvate Déshydrogénase Kinase
PDK1 : *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*
PERK : *Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*
PFK : *PhosphoFructoKinase*
PGAM5 : *Phosphoglycerate mutase family member*
PGC1α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PGK : *PhosphoGlycerate Kinase*
PGM : *PhosphoGlucoMutase*

pH : *Potentiel hydrogène*
PhOH : Polyphénols
PI3K : *PhosphatidyInositol 3-Kinase*
Pio : Pioglitazone
PKA : Protéine kinase A
PKC : Protéine kinase C
PKM : *Pyruvate Kinase*
PLC γ : Phospholipase C
POX : Proline oxydase
PPAR : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*
PPRE : *Peroxisome Proliferator Responsive Element*
PRD : Pyrrolidine-2,5-dione
PRDM16 : *PR domain containing 16*
Prx : Peroxyredoxines
PTEN : *Phosphatase and tensin homolog*
PTK : *Protein tyrosine kinase*
PTP1B : *Protein-tyrosine phosphatase 1B*
PUMA : *p53 upregulated modulator of apoptosis*
Rb : Rétinoblastome
RegI α : *Regenerating gene IA*
RNS : *Reactive Nitrogen Species*
ROS : *Reactive Oxygen Species*
RXR : *Retinoid X Receptor*
SCD1 : Stearoyl-CoA désaturase
SDF-1 α : *Stromal cell-derived factor-1*
SDH : *Succinate DésHydrogénase*
SDS : Dodécylsulfate de sodium
siRNA : *Small interfering RNA*
Sirt1 : *Silent information regulator 1*
SMRT : *Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*
SOD : Superoxyde dismutase
Sp1 : *Specificity protein 1*
SRC-1 : *p160 Steroid Receptor Co-activator 1*
SREBP1 : *Sterol regulatory element-binding protein 1*
Srx : Sulfiredoxines
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
SUCL : *succinyl-CoA synthase*

TAK 1: *Transforming growth factor- β -Activating Kinase 1*
TBS-T : *Tris-Buffered Saline and Tween 20*
TCA : *Acides tricarboxyliques*
TCF4 : *Transcription factor 4*
Tfam : *mitochondrial transcription factor A*
TGF: *Transforming growth factor*
TIMP : *Tissue Inhibitor MetalloProteinase*
TKTL1: *Transketolase-like protein 1*
TNF : *Tumor Necrosis Factor*)
TPI : *TriosePhosphate Isomérase*
TR : *Thiorédoxine réductase*
TRAIL : *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*
Tri : *Trigonelline*
Trolox (α -Tocophérol) : *Tro*
Trx : *Thiorédoxines*
TSP-1: *Thrombospondine 1*
TZD : *Thiazolidinédiones*
UCP2 : *Mitochondrial uncoupling protein 2*
UHRF1: *Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1*
UPR : *Unfolded protein response*
UV : *Ultraviolet*
VDAC : *Voltage-dependent anion channel*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VHL : *Von Hippel–Lindau tumor suppressor*
WT : *wild type*
XIAP : *X-linked inhibitor of apoptosis protein*
XOX : *Xanthine oxydase*
 β -TrCP : *β -transducin repeat-containing protein*
 γ -Toc : *γ -Tocophérol*
 Δ PGJ2 : *15-déoxy-prostaglandine J2*
 Ψ m : *potentiel membranaire mitochondrial*
 Δ Pio : *Δ 2-Pioglitazone*

Introduction

I. Généralités sur les cancers coliques

A. La cancérogénèse

La cancérogénèse présente trois étapes distinctes (Figure 1) :

- **L'initiation tumorale** correspond à une mutation non létale de l'ADN entraînant l'activation d'oncogènes (*C-MYC*, *RAS*, *C-FOS*, *C-JUN*...) ou une inhibition des gènes suppresseur de tumeurs (*P53*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*...). Cette mutation peut être provoquée par des agressions génotoxiques, des radiations ionisantes, des agressions virales (même si elles sont rares chez l'homme) ou encore des erreurs "spontanées" et non réparées de réplication de l'ADN. Il s'en suit un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation des dommages.
- **La promotion tumorale** correspond à l'expansion clonale de la cellule transformée par une augmentation de la survie et de la prolifération et/ou une inhibition de l'apoptose, dues à la présence continue de molécules qui favorise la promotion tumorale. Ces molécules sont capables d'inhiber les défenses antioxydantes, accumulant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Leur concentration est suffisamment basse pour assurer la stimulation de la croissance cellulaire. Ce processus est réversible.
- **La progression tumorale** correspond à la transformation de la cellule bénigne en cellule maligne. Cette étape est marquée par une accumulation de dommages génétiques responsables de modifications moléculaires, de la dérégulation de la croissance cellulaire et de la formation de tumeurs. Cette dernière est accompagnée par un processus d'angiogenèse permettant la survie des cellules tumorales et le développement des tumeurs ¹.

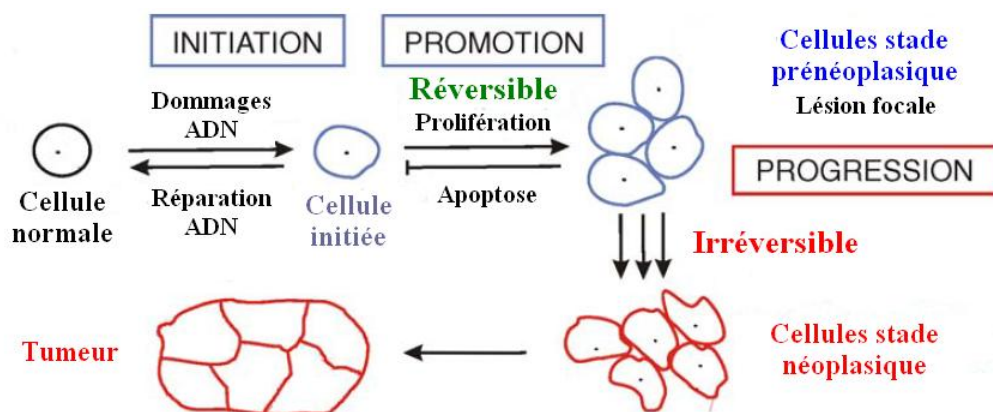


Figure 1: Les étapes de la cancérogénèse (Adaptée de ¹)

Les 3 étapes de la cancérogénèse sont présentées (initiation, promotion, progression), ainsi que les mécanismes cellulaires qui y sont associés.

B. Incidence des cancers coliques

A l'image de l'Europe Occidentale, la France se classe parmi les pays ayant une fréquence élevée de cancer colique (juste derrière les Etats-Unis et l'Australie), contrairement à l'Amérique du sud, l'Asie et surtout l'Afrique ². Si l'on considère les deux sexes séparément,

Introduction

la fréquence du cancer du colon, en France, vient au troisième rang chez l'homme, derrière le cancer du poumon et le cancer de la prostate, et au deuxième rang chez la femme, derrière le cancer du sein (Figure 2) ².

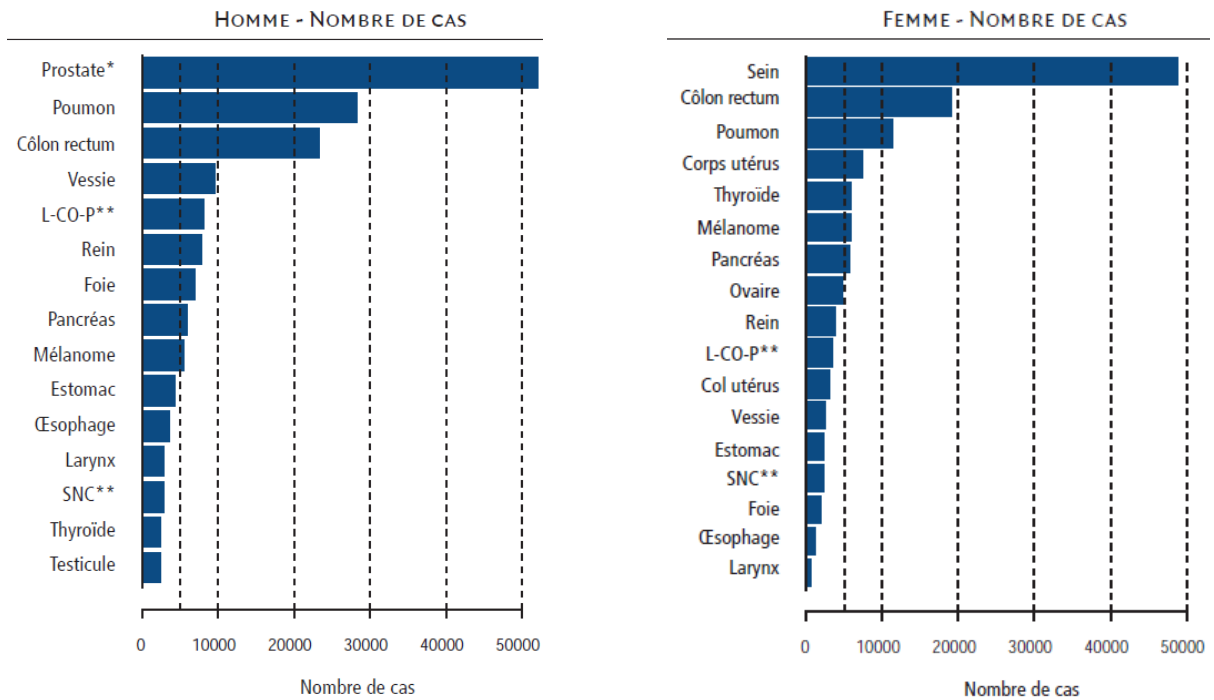


Figure 2 : Estimation du nombre de cas, en France, par localisation en 2012, chez l'homme et la femme ²

Dans 95 % des cas, les cancers colorectaux touchent des personnes de plus de 50 ans (Figure 3) ².

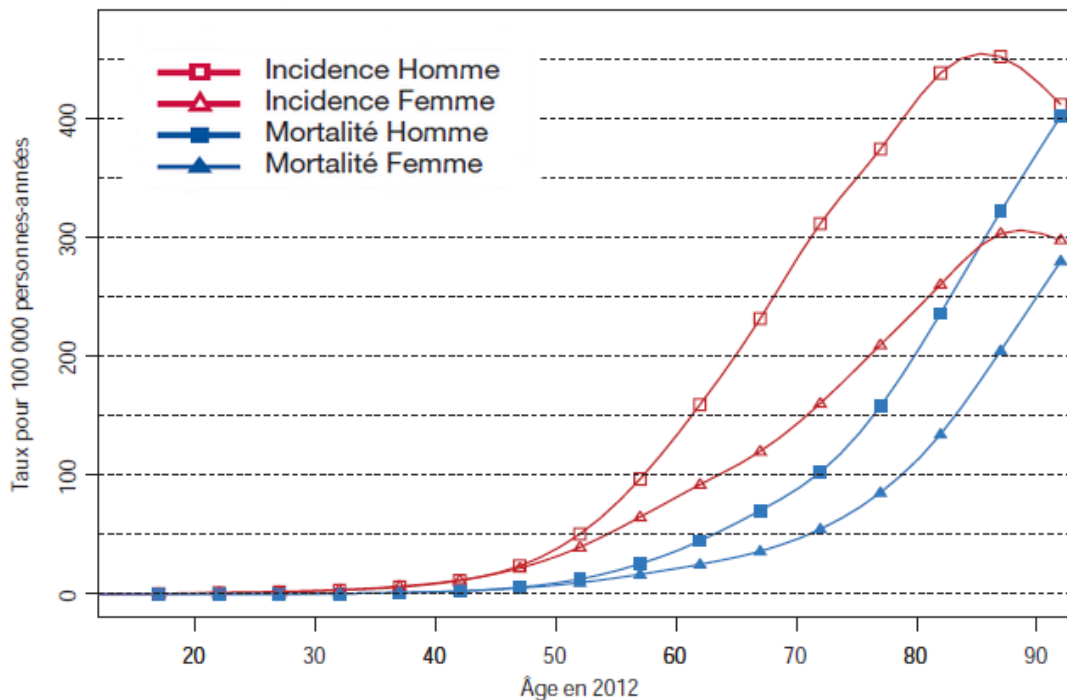


Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer du côlon par âge pour l'année 2012 ²

Le taux d'incidence, ou de mortalité, rapporte le nombre de nouveaux cas observé, ou de décès, dans une population pendant une période donnée.

En 2012, le cancer du côlon représente la deuxième cause de décès par cancer, derrière le cancer du poumon, soit 42% de décès, soit presque 18000 morts chaque année (Figure 4) ².

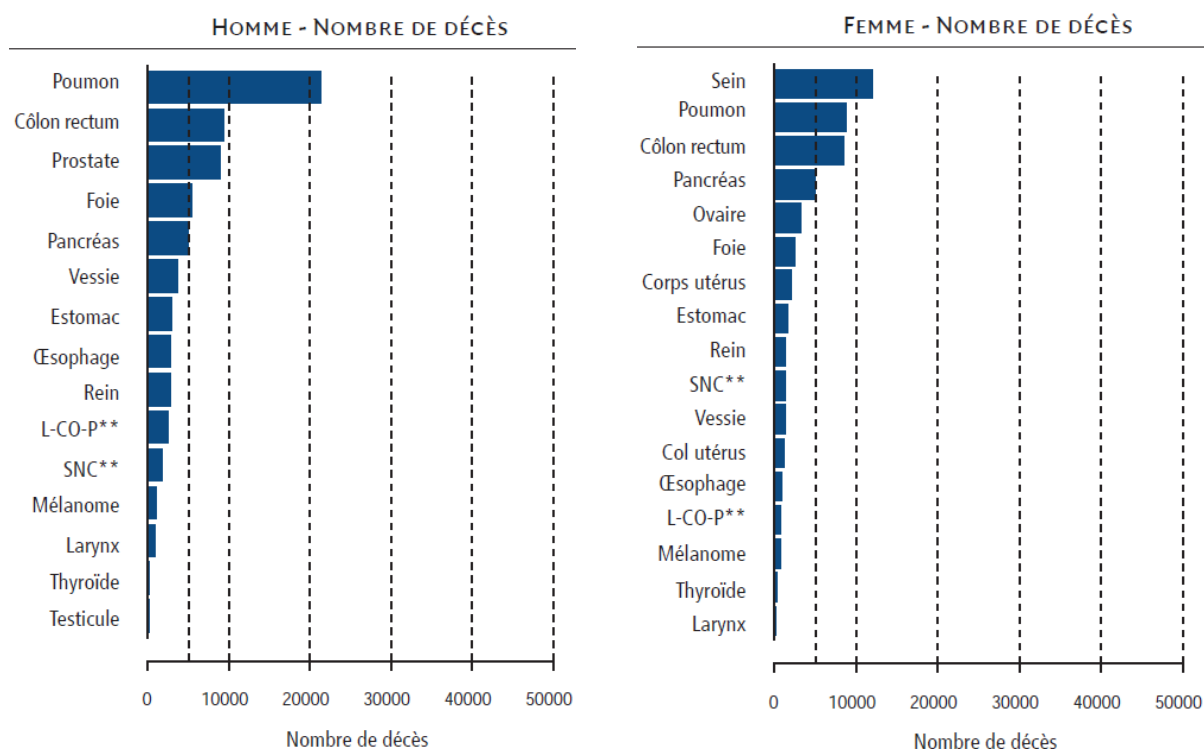


Figure 4 : Estimation du nombre de décès par localisation en 2012, chez l'homme et la femme ²

Le nombre de nouveaux cas détectés par an ne cesse de s'accroître. On observe une hausse de près de 100% du nombre de nouveaux cas entre 1980 et 2012 (Tableau 1) ².

	Sexe	Année					
		1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	Homme	12 681	15 589	18 903	20 756	22 570	23 226
	Femme	11 625	14 075	16 146	17 406	18 569	18 926
Mortalité	Homme	7 595	7 995	8 409	8 745	9 142	9 275
	Femme	7 569	7 531	7 559	7 780	8 246	8 447

Tableau 1 : Nombres estimés de cas et de décès du cancer du côlon en France selon l'année ²

Cependant, le taux d'incidence standardisé qui était en augmentation constante jusqu'en 2000, s'est stabilisé entre 2000 et 2005, avant de diminuer entre 2005 et 2012 (Tableau 2). En revanche, le taux de mortalité standardisé n'a cessé d'être freiné entre 1985 et 2012 (Tableau 2) ².

		Année					
Sexe		1980	1990	2000	2005	2010	2012
Incidence	Homme	34,7	38,1	39,4	39,2	38,8	38,4
	Femme	23,0	24,5	24,6	24,3	23,9	23,7
Mortalité	Homme	19,9	18,2	16,0	14,9	13,8	13,3
	Femme	12,5	10,6	9,2	8,6	8,1	7,9

Tableau 2 : Taux d'incidence et de mortalité standardisés dans la population française selon l'année ²

Le taux d'incidence standardisé rapporte le nombre de nouveaux cas d'une pathologie pour 100 000 personnes dans le monde. De même, le taux de mortalité standardisé rapporte le nombre de décès pour 100 000 personnes dans le monde.

Actuellement, en France, plus de 42 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année, dont 61% localisés au niveau du côlon, 27% dans la région rectale et 12% à la jonction entre rectum et côlon sigmoïde. D'après les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait augmenter dans les prochaines années, pour atteindre 45 000 nouveaux cas annuels en 2020 ³.

C. Les différents types de cancers coliques et leurs origines génétiques

Plus de 85% des cancers colorectaux ont une origine sporadique, les autres sont héréditaires : il s'agit du syndrome FAP (pour *Familial Adenomatous Polyposis*) et du syndrome HNPCC (pour *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*). Dans ces cas, la mutation d'un seul gène, accompagnée par une perte d'hétérozygotie, peut entraîner la maladie. En revanche, pour les cancers sporadiques une succession de plusieurs évènements génétiques est nécessaire pour l'apparition de carcinomes (Figure 5).

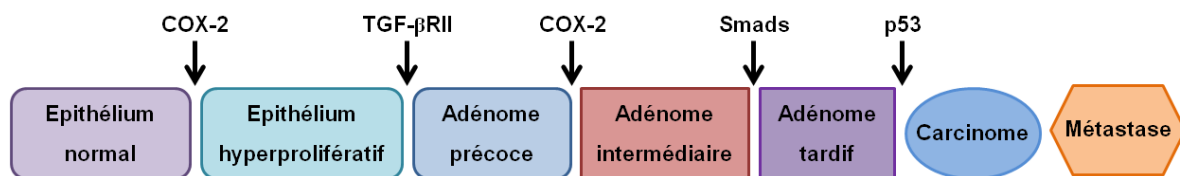


Figure 5 : Evènements génétiques associés à la transformation d'un épithélium colique (Adaptée de ⁴)

Pour le syndrome FAP, il s'agit principalement de la mutation du gène *APC* (pour *Adenomatous Polyposis Coli*). Ce gène contrôle la prolifération des cellules coliques en inhibant la voie Wnt/ β caténine. Sa mutation entraîne donc une activation de cette voie de signalisation (Figure 6).

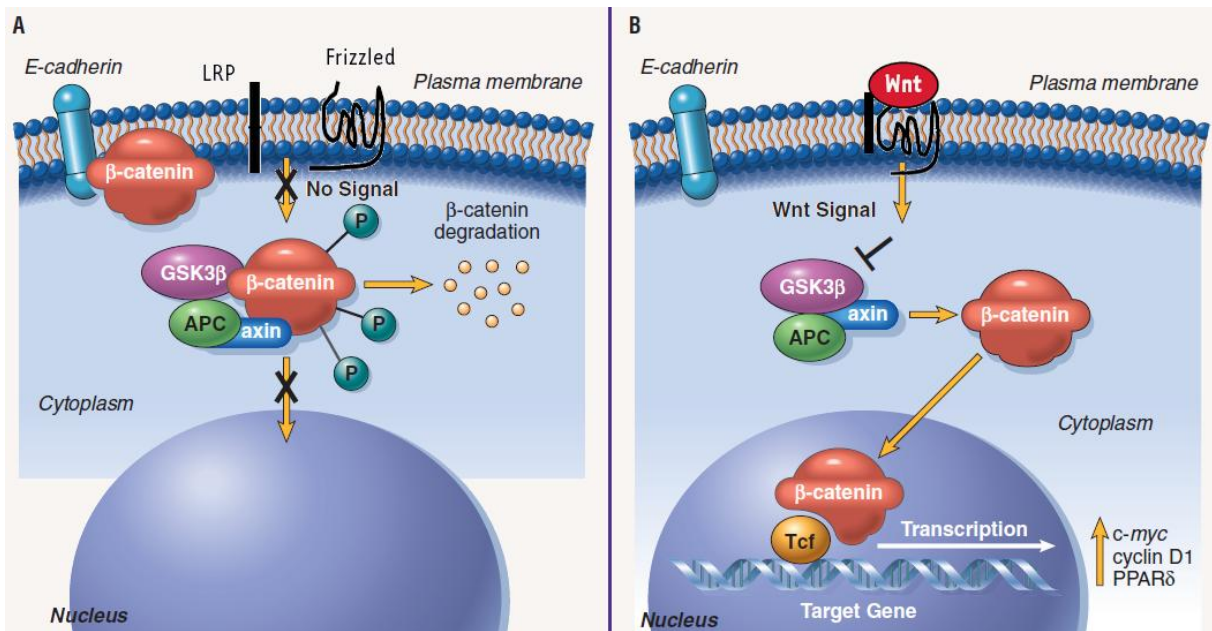


Figure 6 : Voie de signalisation APC/β-caténine (Adaptée de ⁴)

La voie de signalisation APC/β-caténine est responsable de la prolifération des cellules souches coliques humaines. Ces dernières sont localisées dans les deux tiers inférieurs des structures glandulaires, qui constituent l'épithélium colique.

A : En absence de signal de prolifération (*No signal*), la β-caténine (*β-catenin*) est associée à un complexe constitué de l'axine (*axin*), la protéine APC (*pour Adenomatous Polyposis Coli*) et la GSK3β (*pour glycogen synthase kinase 3 β*). La formation du complexe est favorisée par l'interaction entre la protéine APC et la β-caténine. APC joue le rôle d'un inhibiteur fonctionnel: l'interaction favorise la phosphorylation, par GSK3β, de la β-caténine, qui est ensuite ubiquitinylée et dégradée par le protéasome.

B : L'activation de la voie de transduction (*Wnt Signal*) passe par la liaison de glycoprotéines, appelées Wnt (*pour Wnt/Wingless*), à un récepteur appelé Frizzled. Ce dernier est associé au récepteur LRP6, qui appartient à la famille des récepteurs des lipoprotéines. La fixation de Wnt entraîne l'inhibition de l'activité de GSK3β, puis l'accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme. Elle est ensuite transloquée dans le noyau, où elle s'associe au facteur de transcription Tcf (*pour T-cell factor*). Ce complexe se lie à un élément de réponse, localisé dans le promoteur de gènes-cibles et accroît leur transcription. Un des gènes impliqués est PPARδ. Les autres sont soit impliqués dans la prolifération des cellules, tels que *c-myc* ou la cycline D1 (*cyclin D1*), soit responsables de la synthèse de ligands impliqués dans ce processus, tels que BMP4 (*pour Bone morphogenic protein 4*).

Dans les cancers du colon, APC est fréquemment délété, ce qui conduit à une activation constitutive de la voie de signalisation.

Il est à noter que dans l'épithélium intestinal, la R-spondine1 humaine (hRSpo1) accentue l'accumulation de la β-caténine induite par Wnt. En effet, cette spondine est capable d'activer la voie canonique Wnt/β-caténine décrite ci-dessus, mais elle agit également selon un autre mécanisme qui n'a pas encore été décrit précisément à ce jour ⁵.

Pour le syndrome HNPCC, les mutations concernent un des gènes de réparation des mésappariements (*hMSH2*, *hMLH1* et/ou *hPMS2*). Les personnes porteuses de ces mutations ne développeront pas forcément un cancer, mais elles représentent une population à risques. L'étude de ces formes héréditaires a permis de mieux comprendre le développement des cancers sporadiques. En effet, 85% des cancers sporadiques sont des cancers à CIN (instabilité chromosomique), c'est pourquoi, ils présentent des similarités avec le syndrome FAP. On observe ainsi de nombreuses délétions affectant les gènes APC, DCC (*pour Deleted in Colorectal Cancer*) ou des mutations affectant *p53* et *K-Ras*. Leurs mutations sont

Introduction

nécessaires à la transformation maligne d'un polype ou d'un adénome en carcinome. Les autres cancers sporadiques sont des cancers à MIN (instabilités des microsatellites). Ils se caractérisent par une réparation déficiente de l'ADN ou MMR (pour *MisMatch Repair*) due à une transformation des gènes *hMSH2* et *hMLH1*, ce qui les rapproche du syndrome HNPCC. L'inactivation de ces gènes aboutit à la formation de mutations affectant, par exemple les gènes *BAX* (pour *Bcl-2-associated X protein*), *E2F* ou *TGFβ3* (pour *Transforming growth factor beta 3*)⁶.

D. Implication de l'alimentation dans l'incidence des cancers coliques

La différence géographique de l'incidence des cancers coliques pourrait s'expliquer par une alimentation différente. En effet, une étroite corrélation entre une alimentation riche en graisses et la survenue de cancers colorectaux a été démontrée. Plus précisément, Reddy et al. ont montré qu'un régime riche en acides gras oméga-6 augmentait la formation de tumeurs chez les rats F344 traités par l'azoxyméthane (AOM), un inducteur de tumeurs. En revanche, un régime riche en acides gras oméga-3 diminue l'incidence tumorale induite par AOM⁷. L'effet délétère des acides gras oméga-6 a également été observé chez le modèle de souris *Apc^{Min}* (pour *Multiple Intestinal Neoplasia*)⁸. Ce modèle présente une prédisposition à la formation d'adénomes intestinaux en raison de la perte d'un allèle fonctionnel du gène *APC*, provoquée par une mutation non sens au niveau du codon 850⁹. Enfin, l'effet protecteur du DHA (pour acide docosahexaénoïque), un acide gras oméga-3, a été également mis en évidence dans un autre modèle de souris, où la perte d'un allèle fonctionnel d'*APC* est obtenue par une mutation non sens au niveau du codon 716¹⁰.

II. Le récepteur nucléaire PPAR et ses agonistes

A. Présentation des récepteurs PPAR

Les récepteurs PPAR (pour *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) sont des facteurs de transcription ligands inductibles, qui appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires des hormones (NHR). Il existe trois isotypes de ce récepteur (PPAR α , β/δ et γ), codés par des gènes différents, avec des fonctions et des expressions tissulaires différentes. Ils sont activés par des ligands hydrophobes, les acides gras poly-insaturés et leurs dérivés, qui sont amenés dans le noyau par des protéines cytoplasmiques FABPs (pour *Fatty-Acid-Binding Proteins*). Les acides gras poly-insaturés activent les 3 isotypes avec une faible affinité, tandis que leurs dérivés métaboliques sont des ligands spécifiques.

PPAR α est exprimé principalement dans des tissus présentant un catabolisme des acides gras et un métabolisme des peroxyosomes important. Il est ainsi impliqué dans l'homéostasie

énergétique, mais également dans la diminution de la réponse inflammatoire. Les fibrates sont des agonistes de ce récepteur. Leur propriété hypolipémiante est utilisée pour traiter différentes formes de dyslipidémie ¹¹.

En revanche, le récepteur PPAR β/δ est ubiquitaire, avec des variations d'expression selon les tissus. Il est activable par des acides gras polyinsaturés et par les prostacyclines de la série I2 ¹². Son activation est impliquée dans le développement placentaire ^{13,14} et le contrôle du métabolisme des lipides. Il occupe également un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie des kératinocytes, en particulier ¹².

Les récepteurs PPAR γ ont une expression très spécifique. Ils sont fortement exprimés dans les tissus adipeux blanc et brun et en proportion plus faible au niveau de l'épithélium intestinal, la rétine, les muscles squelettiques et les organes lymphoïdes. Il existe deux sous type de récepteurs γ : PPAR γ_1 et PPAR γ_2 . Le deuxième comporte 28 nucléotides supplémentaires (Figure 7) ¹⁵. Plusieurs variants d'épissage ont été mis en évidence pour PPAR γ_1 . L'épissage concerne essentiellement la région 5' qui participe à la régulation de l'expression du taux d'ARNm. Leur proportion varie en fonction du type cellulaire ¹⁶. PPAR γ_1 est exprimé dans la plupart des tissus tandis que PPAR γ_2 serait plus spécifique des adipocytes. Ils sont impliqués dans le contrôle de la réaction inflammatoire. En effet, l'activation de PPAR γ dans les macrophages induit une inhibition de l'expression de facteurs pro-inflammatoires, IL-1 (pour *Interleukine 1*), IL-4, TNF (pour *Tumor Necrosis Factor*), iNOS (pour *inducible Nitric Oxide Synthase*) et l'inhibition des voies inflammatoires AP-1 (pour *Activator Protein-1*), STAT (pour *Signal Transducers and Activators of Transcription*) et NF κ B (pour *Nuclear Factor-kappa B*). PPAR γ participe également à la régulation du métabolisme du glucose en modulant la sensibilité à l'insuline. Il régule aussi la croissance cellulaire et la différenciation, notamment adipocytaire ¹⁷. PPAR γ est également impliqué dans la différenciation du placenta. En effet, les embryons de souris KO PPAR $\gamma^{-/-}$ ou RXR $^{-/-}$ meurent in utero en raison d'un développement anormal du placenta ¹⁸⁻²⁰. Chez l'Homme, l'activation de PPAR γ induit la différenciation du trophoblaste villositaire en syncytiotrophoblaste. En revanche, elle inhibe la migration des cellules du trophoblaste non villositaire, ce qui peut entraîner une pré-clampsie *in vivo* ²¹. Les thiazolidinédiones (TZD) sont des agonistes synthétiques de ce récepteur. Ils sont utilisés pour le traitement du diabète et ont une action hypoglycémisante ¹¹.

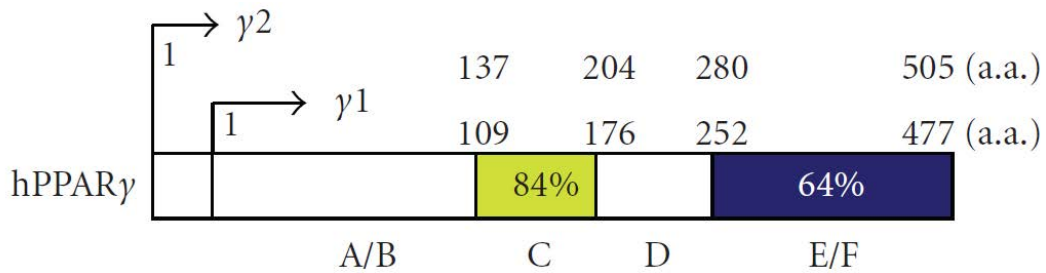


Figure 7 : Organisation structurale du récepteur nucléaire PPAR γ ¹⁵

Comme tous les récepteurs nucléaires, PPAR γ possède 5 domaines fonctionnels distincts. Le domaine A/B, en position N-terminale, est un domaine de transactivation indépendant de la liaison du ligand et possède plusieurs sites de phosphorylation. Le domaine C présente deux structures en doigt de zinc, interdépendantes, qui permettent la liaison du récepteur avec l'ADN. Le domaine D est un domaine charnière, qui permet le changement de conformation spatiale du récepteur. Cette région contient une séquence d'adressage au noyau. Le domaine E/F forme le site de liaison du ligand. PPAR γ 1 et PPAR γ 2 se distinguent par 28 acides aminés supplémentaires à l'extrémité N-terminale de PPAR γ 2. Le nombre d'acides aminés composant les différents domaines de chaque récepteur est précisé. Le pourcentage d'homologie est indiqué pour les domaines C et E/F.

B. Mode d'action des récepteurs PPAR

La fixation d'un ligand, naturel ou synthétique, au niveau du site de fixation localisé dans le domaine E/F, modifie la conformation du récepteur. Les corépresseurs, tels que NCoR (pour *nuclear receptor co-repressor*) et SMRT (pour *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors*), sont alors libérés et remplacés par des coactivateurs, tels que SRC-1 (pour *p160 Steroid Receptor Co-activator 1*), PBP (pour *PPAR-binding protein*), DRIP205 (pour *Vitamin D-interacting Protein 205*, aussi appelé TRAP220 ou MED1) ou le complexe p300/CBP (pour *CREB-binding protein*)²²⁻²⁵. PGC1 α (pour *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) a été décrit, dans un premier temps, comme un coactivateur spécifique du récepteur PPAR γ ²⁶. Mais, depuis il a été montré qu'il coopère aussi avec PPAR α ²⁷. La liaison de ces différents coactivateurs permet au récepteur PPAR de former un hétérodimère avec le récepteur de l'acide 9-cis rétinolique, ou RXR (pour *Retinoid X Receptor*), lui-même activé par l'acide 9-cis rétinolique. Cet hétérodimère est ensuite capable de se lier à une séquence spécifique de l'ADN, appelée PPRE (pour *Peroxisome Proliferator Responsive Element*), présente dans les promoteurs des gènes-cibles (*Target gene*). Les PPRE présentent 2 demi-sites spécifiques séparés par un nucléotide quelconque (5'AGGTCAnAGGTCA3'). Cette séquence est appelée DR1 (pour *Direct Repeat 1*). PPAR et RXR se fixent, chacun, sur un demi-site. La fixation du dimère entraîne le recrutement du complexe de transcription et module l'expression des gènes-cibles (Figure 8)¹².

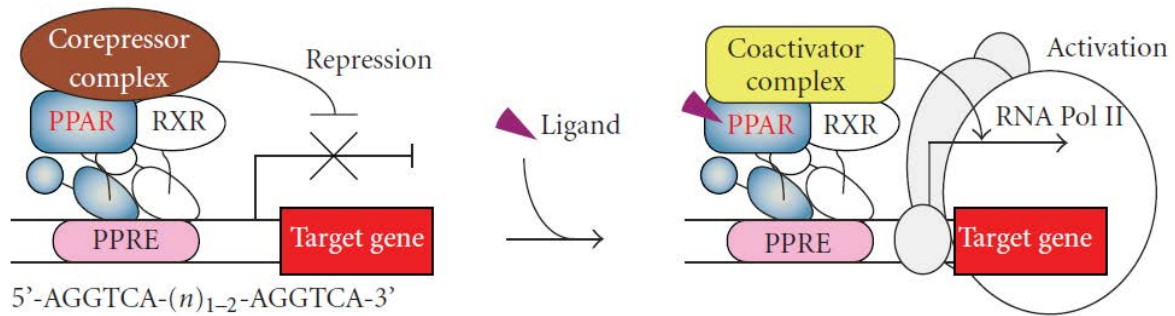


Figure 8 : Mécanisme d'activation des PPAR¹⁵

Corepressor complex : complexe de corépresseurs ; *Target gene* : gènes-cibles ; *Coactivator complex* : complexe de coactivateurs ; RNA Pol II : ARN polymérase II.

C. Régulation de l'activité des récepteurs PPAR

Chez l'Homme, l'activité de PPAR γ est régulée par diverses phosphorylations, sumoylations et désacétylations. La phosphorylation de PPAR γ par AMPK (pour 5' *AMP-activated protein Kinase*) engendre une répression de la transactivation de PPAR γ . De plus, la sumoylation du récepteur au niveau de la Lysine 107 de PPAR γ 2 ou de la Lysine 77 de PPAR γ 1 bloque l'activité du récepteur *via* un recrutement de co-répresseurs. FGF21 (pour *fibroblast growth factor 21*) prévient la sumoylation de PPAR γ dans les adipocytes, ce qui permet une augmentation de son activité. Par ailleurs, l'activation de la voie de signalisation MAPK/MEK/Erk (pour *Mitogen-Activated Protein Kinases/MAPK kinase/Extracellular signal-regulated kinases*) entraîne une phosphorylation de la Sérine 82 de PPAR γ 1 et la Sérine112 de PPAR γ chez la souris. Il s'en suit une réduction de l'activité du récepteur et même sa dégradation. Au contraire, la phosphorylation de ces mêmes sites par Cdk7 ou 9 (pour *cyclin dependent kinases*) accroît l'activité de PPAR γ (Figure 9)²⁸. De même, la phosphorylation de PPAR γ par PKA (pour *protéine kinase A*) entraîne une modification de la conformation du récepteur, qui augmente l'affinité pour le ligand. Ainsi, le recrutement des coactivateurs est facilité, ce qui conduit à une hausse de l'activité du récepteur²⁹. En revanche, la phosphorylation de PPAR γ 2 par Cdk5 au niveau de la Sérine 273 diminue l'expression d'un groupe de gènes distincts en cas d'obésité, tels que les gènes codant pour l'adiponectine ou la leptine³⁰. La liaison d'un agoniste sur le récepteur prévient cette phosphorylation. De plus, la sumoylation au niveau de la Lysine 395, dans les macrophages, permet un recrutement de PPAR γ au niveau du promoteur de gènes pro-inflammatoires (le gène codant iNOS, par exemple), ce qui a pour conséquence une inhibition de leur transcription³¹. La désacétylation des Lysines 268 et 293 par Sirt1 (pour *silent information regulator 1*) promeut, quant à elle, le recrutement de PRDM16 (pour *PR domain containing 16*), un facteur de transcription impliqué dans la transformation du tissu adipeux blanc en tissu

Introduction

adipeux brun. Enfin, on observe une hausse de l'ubiquitinylation de PPAR γ suite à une liaison d'un agoniste ou l'exposition des adipocytes aux cytokines et aux interférons. Cette ubiquitinylation induit une dégradation du récepteur par le protéasome (Figure 9)²⁸.

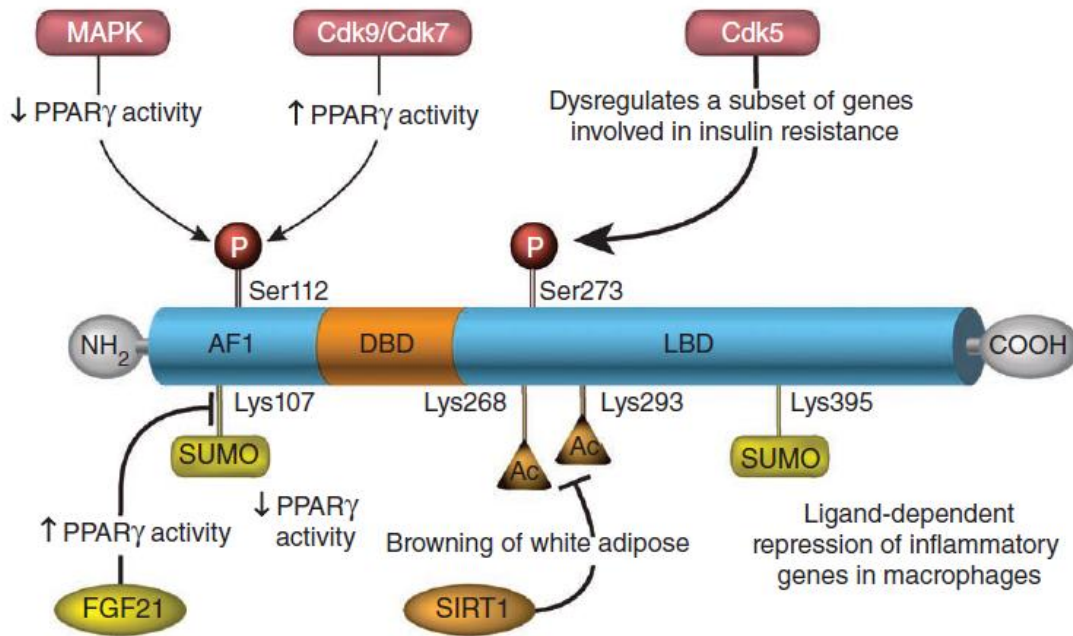


Figure 9 : Régulation de l'activité de PPAR γ 2²⁸

PPAR γ activity : Activité PPAR γ ; AF1 : Activation Function 1 ; DBD : DNA-binding domain ; LBD : Ligand-binding domain ; Ser : Sérine ; Lys : Lysine.

De la même manière, diverses phosphorylations régulent l'activité des autres récepteurs PPAR. La phosphorylation de PPAR α par PKA ou p38MAPK (pour *P38 mitogen-activated protein kinases*) induit une hausse de son activité, tandis que les phosphorylations induites par GSK3 β (pour *Glycogen Synthase Kinase 3 beta*) et PI3K (pour *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) diminuent l'activité du récepteur et facilite sa dégradation. En revanche, les phosphorylations engendrées par MAPK/Erk peuvent avoir un effet activateur ou inhibiteur en fonction du contexte cellulaire. Enfin, la phosphorylation de PPAR β/δ par PKA, PI3K ou p38MAPK accentue l'activité du récepteur²⁹.

D. Les agonistes des récepteurs PPAR

1. Les agonistes de PPAR α

Les ligands naturels de PPAR α sont les eicosanoïdes, tels que le leucotriène B₄, synthétisé à partir de l'acide arachidonique *via* la voie de la lipoxigénase (LOX). Les fibrates et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont quant à eux des ligands synthétiques de PPAR α (Figure 10).

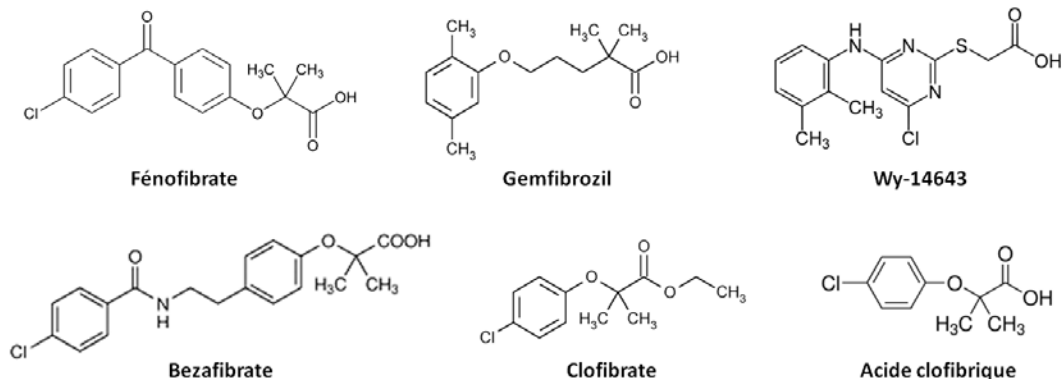


Figure 10 : Structure de quelques agonistes de PPAR α

Ces agonistes peuvent présenter une activité anti-inflammatoire, notamment grâce à une diminution de l'expression de COX2 (pour *CycloOXYgenase 2*), comme cela a été démontré suite au traitement des cellules de mélanome B16-F10 par le Fénofibrate (Féno) ou Wy-14643³². Les fibrates sont aussi capables de réduire le taux de triglycérides *via* une augmentation de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif des lipides, tels que la carnitine acyl transférase, l'acylCoA synthétase (ACS), l'acylCoA oxydase (ACO), la thiolase... (Figure 11), notamment dans le foie de rongeur^{33,34}. Des séquences PPRE sont retrouvées au sein des promoteurs de ces gènes. En revanche, le Féno n'induit pas ACS dans les cellules cancéreuses hépatiques humaines HepG2³⁴. Mais, le Gemfibrozil est capable de diminuer l'incidence des maladies coronariennes grâce à cette activité hypolipidique³⁵. De plus, le Féno exerce un effet protecteur chez ces patients par une hausse de la concentration plasmatique de l'apolipoprotéine A2³⁶.

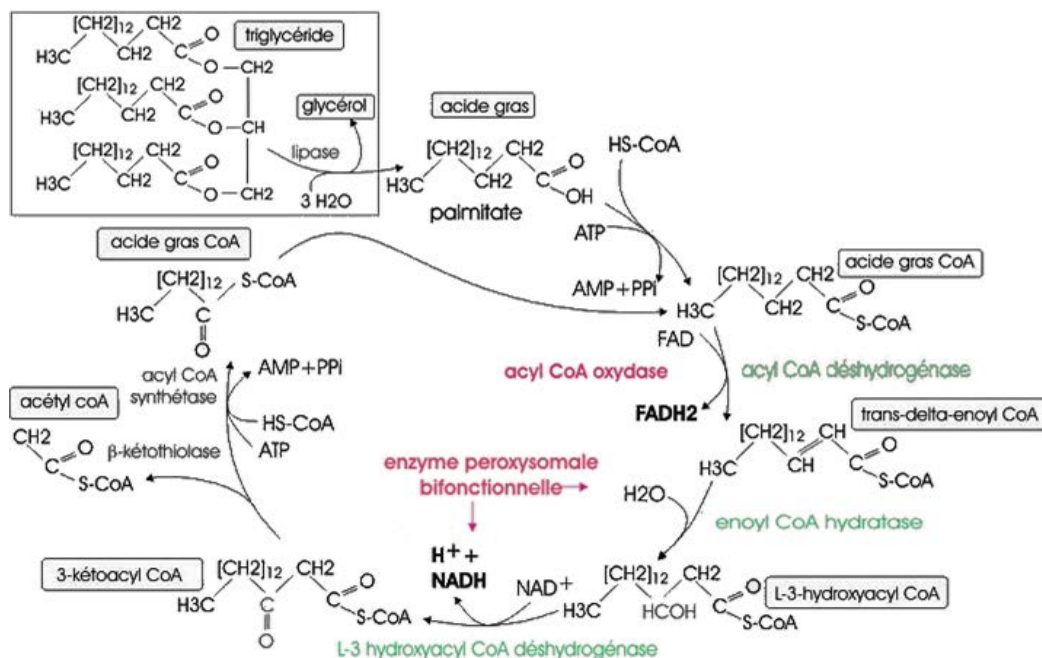


Figure 11 : Schéma de la beta-oxydation des acides gras³⁷

En rose : les enzymes peroxysomales. En vert : les enzymes mitochondriales

2. Les agonistes de PPAR γ

a. La Δ PGJ2

La 15-déoxy-prostaglandine J2 (Δ PGJ2) est un des ligands endogènes de PPAR γ . Sa synthèse est réalisée à partir de l'acide arachidonique, suite à l'action successive des cyclooxygénases et de la PGD2 synthase, et de plusieurs déshydratations chimiques (Figure 12A). La présence d'un groupement carbonyle insaturé électrophile dans le cycle pentane lui confère des caractéristiques uniques. En effet, les carbones C9 et C13 du cycle pentane peuvent réagir avec des résidus cystéyles de protéines, selon une réaction d'addition dite de Michael (Figure 12B) ³⁸.

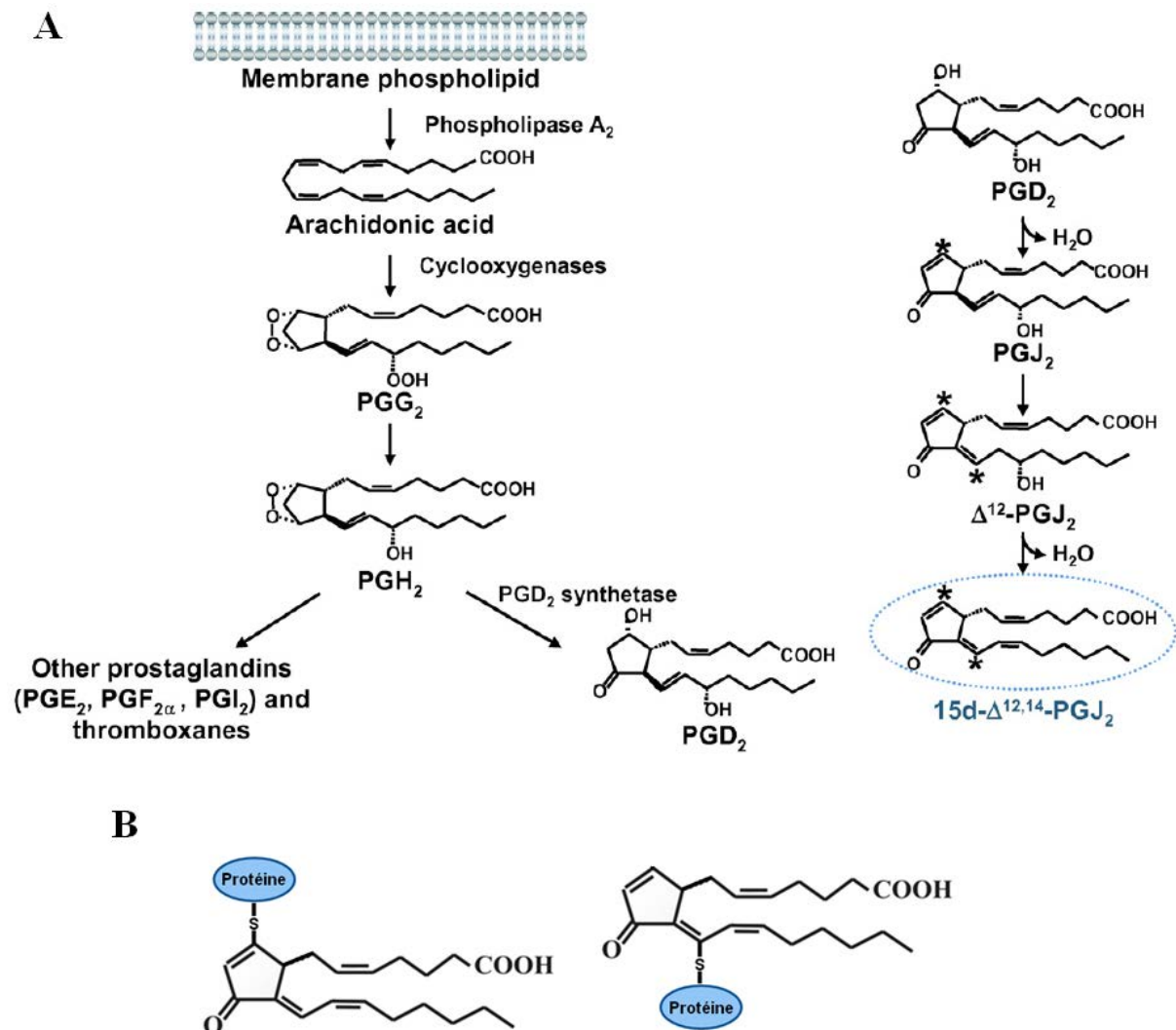


Figure 12 : Synthèse de Δ PGJ2 et réaction d'addition de Michael ³⁸

(A) La phospholipase A2 transforme les phospholipides membranaires en acide arachidonique, lui-même transformé en prostaglandines PGG2 par les cyclooxygénases (COX). Cette dernière donne lieu à la PGH2, qui se transforme en différents isomères de prostaglandines, dont la PGD2, synthétisée par la PGD2 synthase. La PGD2 subit une déshydratation chimique pour former la PGJ2. Une nouvelle déshydratation de ce composé aboutit à la formation de la Δ^{12} PGJ2, dont la migration 13,14 de la double liaison produit la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2 (Δ PGJ2).

(B) Réaction d'addition de Michael entre la Δ PGJ2 et les résidus cystéyles des protéines.

Cette réaction d'addition de Michael permet d'ailleurs la liaison de la Δ PGJ2 sur le récepteur PPAR γ , suivant un mécanisme *dock-lock*. En effet, la Δ PGJ2 se retrouve dans la poche de liaison du ligand du récepteur (*LBD pour Ligand Binding domain*) et se lie de manière covalente à la cystéine 285 *via* son carbone C13. Cette liaison irréversible entraîne l'activation du récepteur PPAR γ , notamment par la libération de ses corépresseurs (R ; Figure 13) ³⁸. Ainsi, cette prostaglandine permet une hausse de l'expression du récepteur, l'augmentation de son activité transcriptionnelle et de sa capacité à se lier à l'ADN ³⁹.

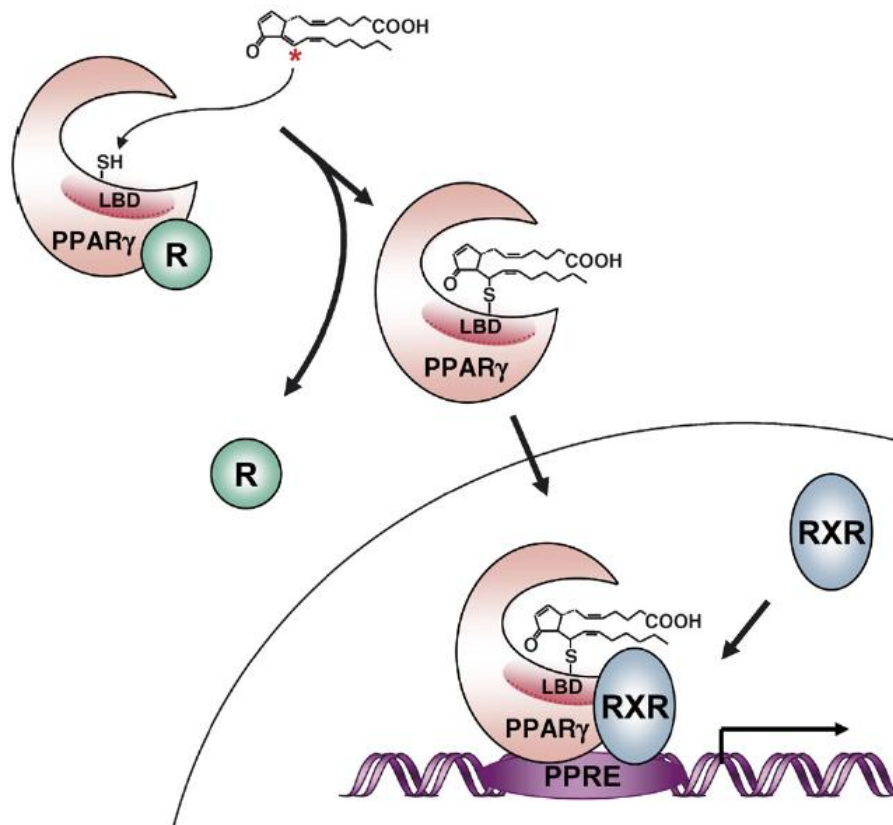


Figure 13 : Activation du récepteur PPAR γ par la Δ PGJ2 ³⁸

Cette prostaglandine présente également des effets totalement indépendants de PPAR γ . Selon les types cellulaires, les conditions et la concentration de la Δ PGJ2, les effets peuvent être totalement antagonistes. En effet, Δ PGJ2, exerce un effet anti inflammatoire en inhibant la voie AP-1. Pour cela, elle peut empêcher la formation du complexe AP-1 en se liant de manière covalente à c-jun (Figure 14) ou en diminuant la phosphorylation de c-jun par l'inhibition des kinases JNK (pour *c-Jun N-terminal kinases*). La Δ PGJ2 peut aussi bloquer la liaison du complexe AP-1 à l'ADN ^{39,40}.

Introduction

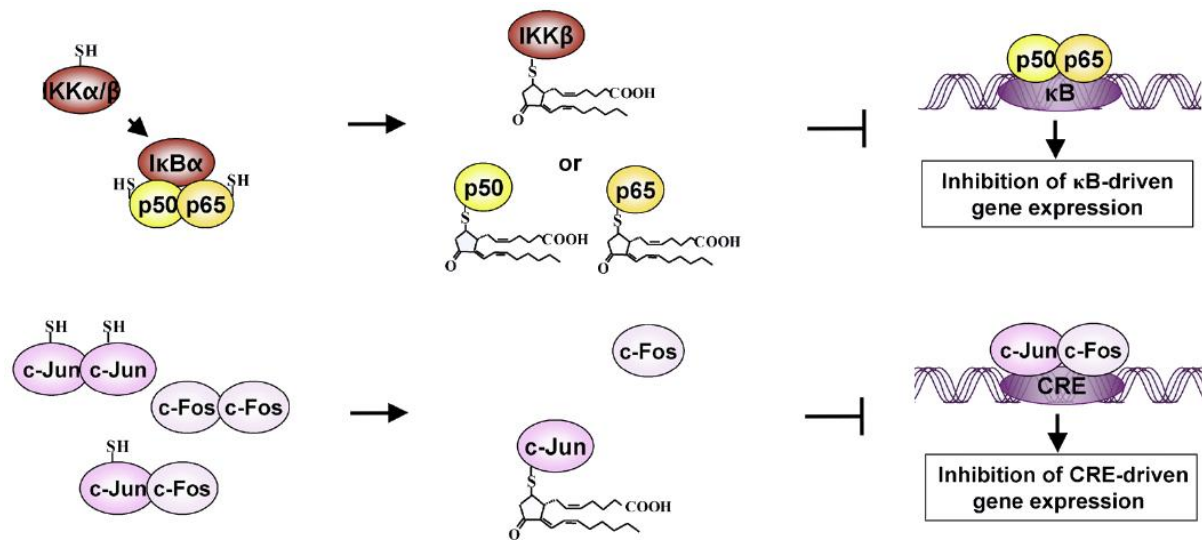


Figure 14 : Implication de la Δ PGJ2 dans les voies de signalisation NF κ B et AP-1 ³⁸

La Δ PGJ2 peut également jouer ce rôle anti inflammatoire en inhibant la voie NF κ B, par liaison covalente sur des résidus cystéines spécifiques de p50, p65 ou IKK (pour *I κ B kinase*) : Cys 62 pour p50, Cys 38 pour p65 et Cys 179 pour IKK (Figure 14) ³⁸. Elle peut aussi avoir un rôle dans la prolifération cellulaire par liaison covalente sur la Cystéine 184 de H-Ras, ce qui entraîne l'activation des MAPK ³⁸. Dans d'autres conditions, elle peut jouer un rôle anti prolifératif, indépendamment de PPAR γ , en bloquant les récepteurs oestrogènes, en potentialisant TNF α ou en augmentant l'expression de son récepteur TRAIL (pour *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) ³⁹. Elle peut également induire l'apoptose cellulaire par une hausse de l'expression de p53 ³⁸. Cette dernière pourrait être provoquée par une diminution de l'expression de Sirt1, protéine capable d'inhiber l'activité et l'expression de p53 ⁴¹. En effet, le traitement par la Δ PGJ2 est capable de réduire l'expression de Sirt1, de manière indépendante de PPAR γ , comme cela a été démontré dans des cellules cancéreuses ovariennes ⁴².

Enfin, la Δ PGJ2 peut jouer un rôle anti-angiogénique ou angiogénique, entraîner des modifications de formation du cytosquelette, par liaison sur l'actine et la tropomyosine, ou provoquer un dysfonctionnement du protéasome ³⁸.

b. Les Thiazolidinédiones (TZD)

Les composés de la famille des thiazolidinédiones (TZD), tels que la Rosiglitazone, la Ciglitazone, la Troglitazone ou la Pioglitazone (Pio), sont des agonistes de PPAR γ (Figure 15).

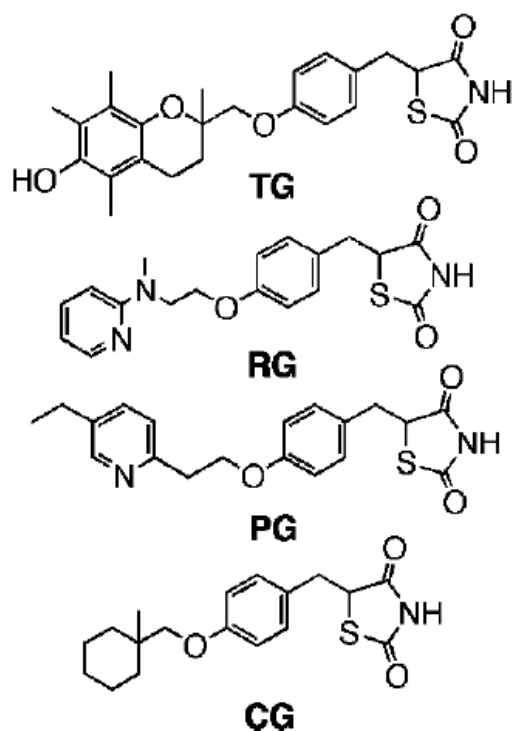


Figure 15 : Structure des Thiazolidinédiones⁴³

TG : Troglitazone ; RG : Rosiglitazone ; PG : Pioglitazone ; CG : Ciglitazone

L'analyse de la structure par rayons X du domaine LBD de PPAR γ associé à la Rosiglitazone a montré que la reconnaissance s'effectuait en trois points (Figure 16). Il est à noter que les deux fonctions cétones du cycle thiazolidine sont impliquées dans cette reconnaissance⁴⁴.

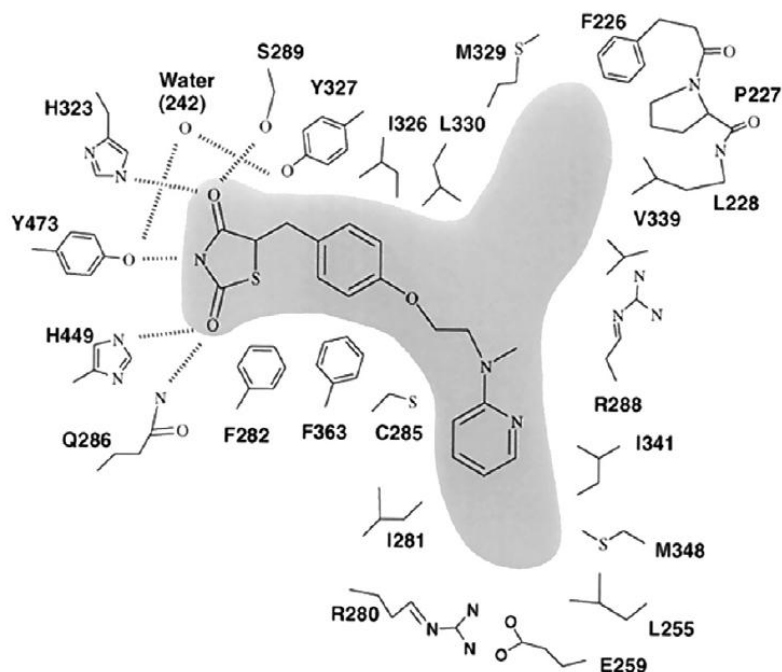


Figure 16 : Interaction de la Rosiglitazone avec le domaine LBD de PPAR γ ⁴⁴

Introduction

La Ciglitazone a été la première TZD synthétisée, mais elle n'a jamais été développée pour une utilisation clinique. En revanche, les autres TZD ont été testées lors d'essai clinique pour traiter le diabète de type II. Ces composés agissent en régulant la sensibilité à l'insuline et en accroissant le métabolisme et le transport des lipides dans les adipocytes. Ainsi, la diminution des acides gras circulants protège les cellules β pancréatiques, le foie et les muscles squelettiques de leurs effets toxiques. Elle induit également la différenciation des préadipocytes, en mimant les effets de l'insuline, et régule l'homéostasie du glucose^{15,44}. La Troglitazone a été mise sur le marché en 1997, avant d'être retirée en 2000 en raison de son hépatotoxicité. La Rosiglitazone a, quant à elle, été mise sur le marché en 1999 avant d'être retirée en 2010 en raison de sa cardiotoxicité.

La Pio a été commercialisée en 2000, avant d'être retirée du marché en France le 9 juin 2011 en raison d'une augmentation de l'incidence des cancers de la vessie suspectée chez les patients traités^{44,45}. Deux études ont montré qu'une administration de Pio (16mg/kg/j) pendant 4 ou 85 semaines chez le rat mâle induisait la présence de microcristaux calciques dans l'urine, responsables de la carcinogénèse de l'urothélium. Si les rats traités par la Pio ont en parallèle une alimentation acide, ces microcristaux ne sont plus présents et les carcinomes urothéliaux disparaissent. Il est à noter que ce phénomène n'est pas observé chez la souris^{46,47}. Néanmoins, chez l'Homme, l'association entre le traitement par la Pio et l'incidence des cancers de la vessie reste controversée. En effet, deux études taïwanaises ont montré qu'il n'existait pas d'association significative dans la population asiatique^{48,49}. Cependant, un risque potentiel pour une utilisation de la Pio supérieure à 3 ans ne peut pas être exclu⁴⁹. De plus, un traitement par la Pio provoque une ostéoporose accélérée chez les utilisateurs à long terme⁵⁰, ce qui augmente le risque de fractures^{51,52}. Elle induit également une prise de poids, notamment par un accroissement des graisses dans les jambes et le tronc⁵³. La substitution du cycle TZD par un cycle pyrrolidine-2,5-dione (PRD) pourrait permettre de diminuer la toxicité de ces molécules. En effet, le dérivé PRD correspondant à la Troglitazone (Figure 17), appelé Trosuccinimide, présente une affinité similaire pour PPAR γ et réduit également le taux de glucose sans former d'intermédiaires toxiques. La substitution du cycle TZD par le cycle PRD pourrait être une stratégie pour développer des agonistes de PPAR γ plus sûrs⁴⁴.

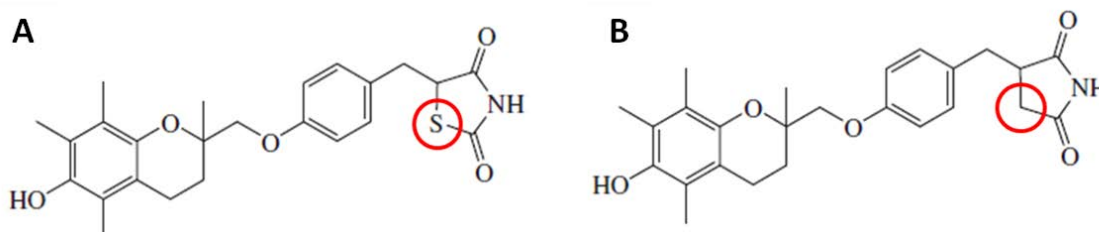


Figure 17 : Structure de la Troglitazone (A) et de la Trosuccinimide (B)

La synthèse d'agonistes partiels de PPAR γ pourrait être une autre solution pour développer des molécules antidiabétiques plus sûres. En effet, il a été montré que l'agoniste partiel de PPAR γ , INT131 (Figure 18), diminue le taux de glucose dans un modèle de souris diabétique, tout en réduisant les effets secondaires observés avec les TZD commercialisées⁵⁴.

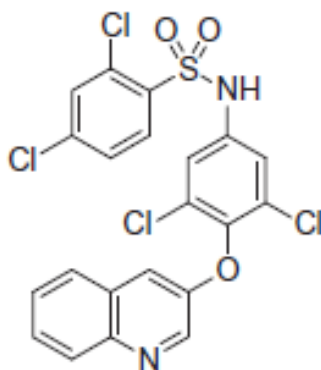


Figure 18 : Structure de INT131⁵⁴

Hormis leur capacité hypoglycémiant, les TZD présentent d'autres propriétés. En effet, la Pio présente des propriétés inflammatoires qui pourraient être utilisées pour traiter la sclérose en plaque ou la maladie de Parkinson⁵⁵. La Ciglitazone réduit, quant à elle, l'inflammation allergique des voies respiratoires chez un modèle murin⁵⁶. L'effet anti-inflammatoire des TZD serait induit par une diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, STAT1, STAT3, NF κ B et AP-1) dans les macrophages, de manière indépendante de PPAR γ ⁵⁷. Enfin, la Pio réduirait l'apoptose des cellules progénitrices endothéliales dans la moelle osseuse de rat, ce qui en ferait un traitement éventuel pour les maladies vasculaires⁵⁸.

E. Antagonistes des récepteurs PPAR

1. Les antagonistes de PPAR α

Plusieurs antagonistes de l'activation de PPAR α ont été développés. MK886 (Figure 19) inhibe l'activation de PPAR α , par son agoniste Wy14643, dans les cellules cancéreuses pulmonaires A549. Il agirait selon un mécanisme non compétitif en prévenant la modification de conformation du récepteur. Cette dernière est nécessaire au recrutement des coactivateurs.

Introduction

Il n'aurait que peu d'influence sur les récepteurs PPAR β/δ et PPAR γ . MK886 induit également l'apoptose des cellules Jurkat, selon un mécanisme indépendant du récepteur PPAR α ⁵⁹. GW6471 (Figure 19) inhibe également l'activation de PPAR α en favorisant le recrutement des co-répresseurs SMRT et NCoR au détriment des co-activateurs SRC-1 et CBP ⁶⁰.

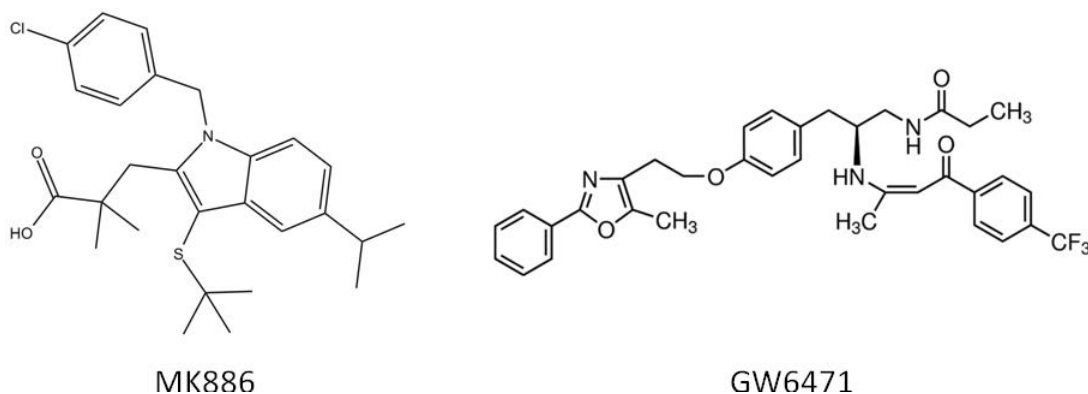


Figure 19 : Structure des antagonistes de PPAR α

2. Les antagonistes de PPAR γ

Du fait de l'importance de PPAR γ dans des pathologies comme le diabète ou l'obésité, de nombreux antagoniste du récepteur PPAR γ ont été développés. Le plus connu, GW9662 (Figure 20) se lie irréversiblement à PPAR γ par une modification covalente au niveau de la cystéine 285, ce qui inhibe l'activation du récepteur. L'inhibition des autres récepteurs PPAR α et PPAR β/δ est très faible ⁶¹. T0070907 (Figure 20) se lie, quant à lui, de manière covalente à la cystéine 313 de PPAR γ 2, isoforme impliqué dans la différenciation terminale des adipocytes, ce qui induit une inhibition du récepteur. En effet, cette liaison diminue le recrutement des co-activateurs, mais augmente l'interaction avec le co-répresseur NCoR ⁶². L'antagoniste SR202 (Figure 20) empêche le recrutement du co-activateur SRC-1, ce qui inhibe l'activation du récepteur PPAR γ par les TZD ⁶³. BADGE (pour bisphenol A diglycidyl ether ; Figure 20) empêche également l'activation de PPAR γ par la Troglitazone dans les cellules adipocytaires NIH-3T3 ⁶⁴. Néanmoins, il se comporte comme un agoniste de PPAR α dans les macrophages RAW 264.7 ⁶⁵. BADGE induit également l'apoptose des cellules HCT116 et Jurkat, et potentialise l'effet pro-apoptotique de l'indométacine. Cet effet serait indépendant du récepteur PPAR γ , puisque les cellules Jurkat n'expriment pas ce récepteur ⁶⁶. En revanche, il diminue la prolifération des cellules Caco-2 sans modifier leur intégrité cellulaire ⁶⁷. Enfin, G3335 (Figure 20) inhiberait l'activation de PPAR γ par la Rosiglitazone, en se liant notamment à la Cystéine 285 du récepteur. Cela empêcherait le recrutement du co-activateur CBP ⁶⁸.

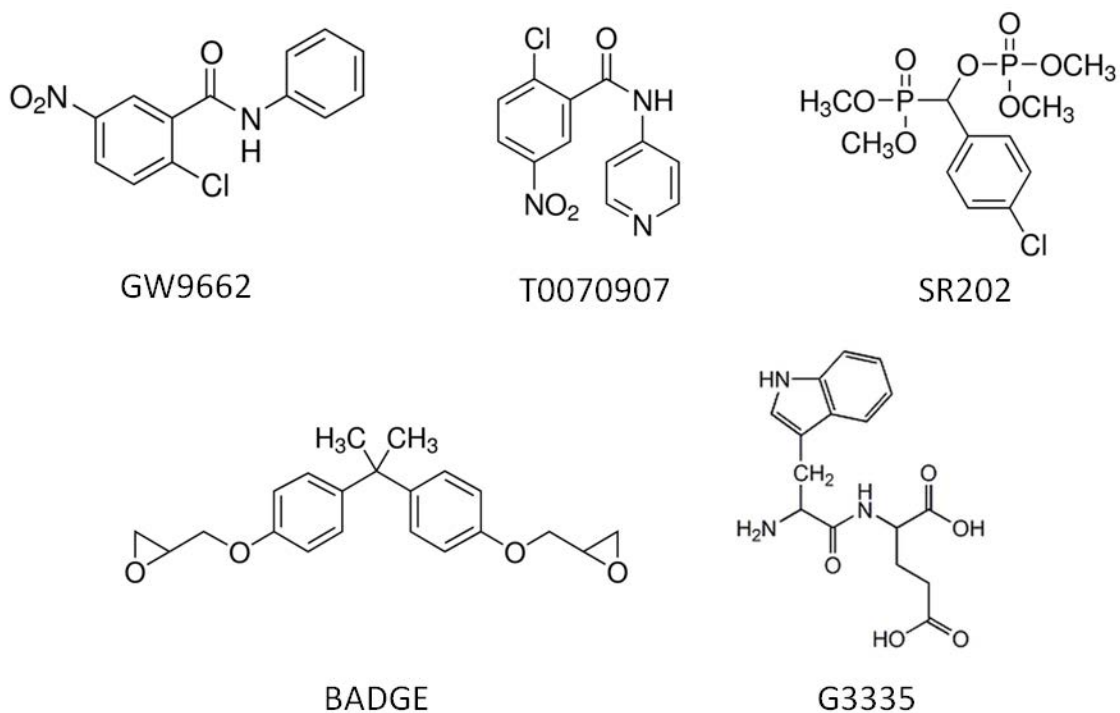


Figure 20 : Structure des antagonistes de PPAR γ

Des analogues des TZD peuvent également se comporter comme des antagonistes de PPAR γ . Ces derniers se caractérisent par l'ajout d'une double liaison à l'extrémité du cycle thiazolidine (Figure 21). Ils se lient à PPAR γ sans entraîner son activation⁴³.

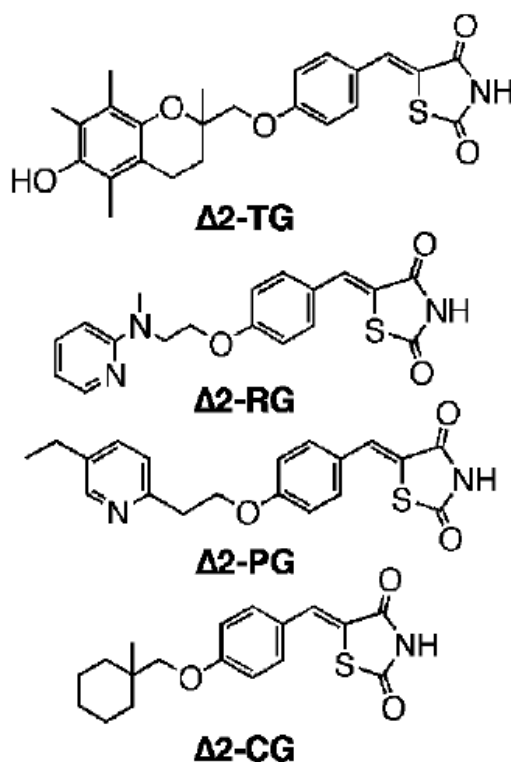


Figure 21 : Structure des analogues des TZD⁴³

Δ^2 -TG : Δ Troglitazone ; Δ^2 -RG : Δ Rosiglitazone ; Δ^2 -PG : Δ Pioglitazone ; Δ^2 -CG : Δ Ciglitazone

III. Action des ligands de PPAR dans la biologie des cancers

A. Rôle de PPAR α dans la biologie des cancers

1. Implication de PPAR α dans la cancérogénèse

L'administration prolongée de fibrates, chez le rongeur, engendre une accumulation de lipides mitogéniques (PGE2 et PGF2 α) responsables d'une prolifération cellulaire aigüe, à l'origine d'une hépatocarcinogénèse⁶⁹⁻⁷¹. Pour autant, selon les données actuelles, le Gemfibrozil et le Clofibrate ne semblent pas induire de cancer chez l'Homme^{69,70}. De surcroît, aucune variation de l'expression de PPAR α n'a été retrouvée dans les cellules cancéreuses coliques humaines⁷² ou dans d'autres types de cancers⁷³. Cette différence d'action des fibrates chez la souris et chez l'Homme s'explique par une différence d'expression et d'activation de PPAR α entre les deux espèces. En effet, PPAR α est fortement exprimé dans le foie des rongeurs, contrairement au foie humain, et son activité de liaison à l'ADN est 10 fois moins importante chez l'Homme que chez la souris^{70,74}. De plus, l'utilisation de souris humanisée pour PPAR α (souris KO (*knock-out*) pour PPAR α avec transfert du gène *PPAR α* humain pendant le développement) a montré qu'il existait des différences de régulation des gènes par le récepteur murin ou le récepteur humain⁷⁵. Enfin, il a été montré que PPAR α était impliqué dans l'induction de l'expression de COX2 par les acides biliaires dans les cellules cancéreuses coliques HT29 et HCT116⁷⁶. Etant donné que COX2 est considéré comme un promoteur de tumeur, PPAR α pourrait présenter une activité pro-tumorale dans les cellules cancéreuses coliques⁷³.

2. Propriétés anticancéreuses des agonistes de PPAR α

Différentes études ont montré que les fibrates présentaient une action anti-cancéreuse. Par exemple, le Féno est capable de diminuer la taille de tumeurs orales *in vivo*⁷⁷. De plus, le traitement par le Bézafibrate, un autre membre de la famille des fibrates, inhibe la carcinogénèse induite par AOM chez les rats F344 et les souris CD-1^{78,79}. Il est également capable de réduire la carcinogénèse chez les souris *Apc*^{Min}⁸⁰, notamment *via* l'induction de la lipoprotéine lipase (LPL). Cette enzyme est capable d'hydrolyser les triglycérides impliqués dans la carcinogénèse colique⁸¹. Enfin, le traitement par Wy-14643 diminue de 30% la formation de tumeurs de la peau, induites chimiquement chez la souris. En revanche, le Bézafibrate ne présente que des effets limités⁸².

a. Propriétés apoptotiques des agonistes de PPAR α

Le Féno diminue la prolifération de cellules de médulloblastome en induisant un arrêt du cycle cellulaire, suivi d'une apoptose, grâce à l'inhibition d'IGF-1 (pour *Insulin-like Growth*

Factor 1). Il en résulte une baisse de la phosphorylation de ces protéines cibles, telles que IRS-1 (pour *Insulin Receptor Substrate 1*), Akt, ERKs et GSK3 β ⁸³. Ce composé est également capable d'induire une apoptose massive des cellules de glioblastome. Cette apoptose est précédée d'une accumulation nucléaire de FoxO3A (pour *Forkhead box O3*) responsable de l'augmentation de l'expression de la protéine apoptotique Bim (pour *Bcl2-interacting mediator of cell death*). L'inhibition de l'expression de PPAR α par siRNA (pour *small interfering RNA*) atténue cette apoptose, cet effet est donc à la fois dépendant et indépendant de PPAR α ⁸⁴. De surcroît, le traitement de kératinocytes humains par le Clofibrate induit une apoptose, modulée par une diminution de l'expression de BCL2 (pour *B-cell lymphoma 2*) et une hausse de l'expression de Bad (pour *Bcl-2-associated death promoter*). L'utilisation de l'antagoniste de PPAR α , MK886, montre l'implication du récepteur dans ce processus ⁸⁵. Enfin, une étude a montré que l'expression de PPAR α était nécessaire à l'action anticancéreuse de l'hydroxycamphothécine dans les cellules cancéreuses coliques SW1116. En effet, l'inhibition de l'expression de ce récepteur par le miR-506 (microARN 506) entraîne une résistance des cellules à ce composé ⁸⁶.

b. Propriétés anti-prolifératives des agonistes de PPAR α

Le Féno peut diminuer la prolifération des cellules d'hépatome humain en entraînant une accumulation de ces cellules en phase G0/G1, par une baisse de la cycline A et de Cdk1, et une augmentation de p27, de manière indépendante du récepteur PPAR α . Ce traitement inhibe également la voie PI3K/Akt dans ces cellules ⁸⁷. Le Féno inhibe aussi la croissance des cellules cancéreuses endométriales. Un des mécanismes mis en jeu est la diminution de l'expression de la cycline D1, qui provoque une accumulation des cellules en phase G0/G1. Cependant, cet effet antiprolifératif n'a pu être mis en évidence *in vivo* ⁸⁸.

c. Propriétés anti-invasives des agonistes de PPAR α

Le Féno est responsable d'une diminution du potentiel métastatique des cellules de mélanome *via* une réduction de la voie de signalisation Akt. En revanche, le Féno n'a aucun effet sur la prolifération des cellules de la tumeur primaire ^{89,90}. De plus, le Féno possède une activité anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo*. En effet, il entraîne une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales, ainsi qu'une inhibition de leur migration par la désorganisation du cytosquelette d'actine ⁹¹. Une diminution de la motilité est également observée lorsque les cellules de glioblastome sont traitées par ce composé, grâce à l'inhibition de l'activité du récepteur de l'IGF-1 ⁹².

d. Propriétés anti-angiogéniques des agonistes de PPAR α

Le traitement par Wy-14643 induit une diminution du volume tumoral chez la souris BALB/c suite à une xéno greffe de cellules cancéreuses colique murines CT26. Cet effet est associé à une réduction de l'angiogénèse *via* une baisse de la prolifération des cellules endothéliales. Aucun effet anti-tumoral n'est observé chez les souris KO pour PPAR α , il serait donc dépendant du récepteur⁹³. Cette action anti-tumorale, par une inhibition de l'angiogénèse, a également été observée suite au traitement, par des agonistes de PPAR α , de souris xéno greffées avec des cellules de mélanome, de carcinome pulmonaire, de glioblastome et de fibrosarcome. Cette inhibition de l'angiogénèse est induite par une baisse de la production de VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) et une augmentation de la production d'endostatine et de thrombospondine 1 (TSP-1)³². La diminution de l'expression de VEGF, observée suite au traitement par Clofibrate, permet également une inhibition de la prolifération de cellules cancéreuses ovariennes chez un modèle murin⁹⁴. Enfin, le Féno est capable d'inhiber la croissance de tumeurs primaires chez la souris par une inhibition de l'inflammation et de l'angiogénèse dans le tissu hôte. En effet, il est capable d'inhiber les voies inflammatoires NF κ B et AP-1, de diminuer l'expression de COX-2 et du facteur pro-angiogénique VEGF^{32,95}.

e. Propriétés préventives des agonistes de PPAR α

Les agonistes de PPAR α présentent des effets préventifs contre la cancérogénèse. Par exemple, il a été montré que le Bézafibrate prévenait des événements précoces de la tumorigénèse colique, en diminuant l'inflammation du colon induite par le DSS (pour *Dextran Sodium Sulfate*) et la formation de cryptes aberrantes induite par AOM⁷⁸. De même, ce traitement permet de réduire le nombre de polypes intestinaux de 67% chez les souris KO Apc^{-/-}⁸⁰.

B. Rôle de PPAR β/δ dans la biologie des cancers

1. Implication de PPAR β/δ dans la cancérogénèse

Les cellules cancéreuses coliques expriment fortement le récepteur PPAR β/δ ⁹⁶ et il a été montré que son expression augmentait au cours du processus de cancérogénèse colique⁹⁷. De plus, la mutation du gène *APC*, qui entraîne l'activation de la voie β -caténine/TCF4 (pour *Transcription factor 4*), induit la transcription de ce récepteur nucléaire⁹⁸. Cependant, l'inactivation du gène *APC* chez les souris Apc^{Min} induit bien une accumulation de la β -caténine dans le noyau des cellules intestinales, même si elle n'est pas corrélée à une hausse de l'expression de PPAR β/δ . L'expression de ce récepteur ne serait donc pas régulé

directement par la β -caténine⁹⁹. L'expression de PPAR β/δ est associée à un effet prolifératif. C'est pourquoi, il peut participer au développement de cancers coliques. En effet, il a été montré que l'activation de PPAR β/δ était responsable d'une hausse de l'expression de la protéine 14-3-3 dans les cellules cancéreuses coliques. Cette dernière est responsable de la diminution de l'apoptose par la séquestration cytosolique de la protéine pro-apoptotique Bad¹⁰⁰. De surcroît, les cellules cancéreuses coliques KO PPAR $\beta/\delta^{-/-}$, inoculées à des souris *nude*, sont moins aptes à induire des tumeurs que les cellules HCT116 qui expriment ce récepteur¹⁰¹. De plus, COX2 est surexprimée dans 80% des cancers coliques. Cette enzyme catalyse la transformation de la PGH2 en PGI2, prostaglandine capable d'activer PPAR β/δ ¹⁷. C'est pourquoi, une colocalisation de COX2 et PPAR β/δ est retrouvée au niveau des tumeurs coliques⁹⁶. Il a également été montré que le traitement de souris *Apc*^{Min} par un ligand de PPAR β/δ augmentait la tumorigénèse intestinale¹⁰². Une autre étude a démontré que le traitement de ces souris par de la NO-aspirine diminuait l'incidence des tumeurs intestinales *via* une baisse de l'expression de PPAR β/δ ¹⁰³. Le sulindac, un anti-inflammatoire non stéroïdien, inhibe l'activation de PPAR β/δ , en empêchant sa liaison sur les séquences PPRE, ce qui réduit la tumorigénèse colique⁹⁸. Enfin, l'expression et l'activité de PPAR β/δ seraient accrues, suite à l'activation de MAPK, dans les cellules intestinales transformées par K-Ras. Ainsi, le récepteur PPAR β/δ pourrait moduler la transformation cellulaire médiée par K-Ras¹⁰⁴.

Les cellules cancéreuses ovariennes expriment le récepteur PPAR β/δ de manière importante. Le traitement de ces cellules par l'aspirine diminue la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* grâce à une inhibition de COX1, PPAR β/δ et Erk1/2¹⁰⁵ en cascade. A l'inverse, l'activation du récepteur par GW501516 accroît la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques en augmentant l'expression de COX2^{106,107}. De plus, l'activation de PPAR β/δ stimule la prolifération des cellules réceptives aux hormones sexuelles, telles que les cellules cancéreuses mammaires ou prostatiques¹⁰⁸. De même, l'activation de PPAR β/δ par GW501516 accélère la formation de tumeurs mammaires dans un modèle murin de carcinogénèse, notamment par l'augmentation de PDK1 (pour *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*), une protéine effectrice de la voie PI3K/Akt¹⁰⁹.

Le récepteur PPAR β/δ présente également une activité protumorale grâce à ses capacités à induire l'angiogénèse. Le traitement par GW501516 accroît la prolifération des cellules endothéliales, ainsi que la production de VEGF et de son récepteur FLT-1, dans les cellules endothéliales ou les cellules cancéreuses mammaires T47D¹⁰⁸. L'expression de VEGF est aussi retrouvée dans les cellules cancéreuses coliques suite à l'activation de PPAR β/δ ¹¹⁰. De

Introduction

plus, la délétion de PPAR β/δ inhibe l'angiogénèse et la prolifération de cellules cancéreuses pancréatiques ¹¹¹. Enfin, l'inhibition de la transcription dépendante de PPAR β/δ par des aptamères diminue l'expression de VEGF dans les cellules HCT116, ce qui inhibe leur potentiel tumoral ¹¹².

2. Propriétés anti-cancéreuses des agonistes de PPAR β/δ

Le traitement par GW0742, un agoniste spécifique de PPAR β/δ , diminue le nombre de polypes coliques dans un modèle de souris où la tumorigénèse a été induite par AOM. Cet effet est dépendant du récepteur car il n'est pas visible chez les souris KO PPAR β/δ ^{-/-} ¹¹³. De plus, la délétion de PPAR β/δ chez les souris Apc^{Min} semble augmenter la formation de polypes ^{99,114}. Cette même délétion accroît la tumorigénèse de cellules cancéreuses coliques *in vitro* et *in vivo*, notamment par une réduction de l'expression de gènes impliqués dans la différenciation, tels que ADRP (pour *Adipose differentiation-related protein*), FABP et la cathepsine E ^{113,115}. La promotion chimique de la carcinogénèse de la peau dans un modèle murin est également plus importante si le gène PPAR β/δ est délété ¹¹⁶. Enfin, PPAR β/δ augmente la survie des keratinocytes en activant la voie Akt par une hausse de l'expression de PDK1 ¹¹⁷.

C. Rôle de PPAR γ dans la biologie des cancers

1. Implication de PPAR γ dans la cancérogénèse

Plusieurs travaux ont montré des résultats contradictoires quant à l'expression de PPAR γ dans les cellules cancéreuses coliques ¹¹⁸. Il a été rapporté que l'expression de PPAR γ était accrue dans les tumeurs coliques par rapport à la muqueuse colique normale ¹¹⁹. L'activation de la voie Wnt/ β -caténine dans les cellules cancéreuses coliques, en raison de la mutation du gène *APC*, serait responsable de l'augmentation de l'expression et de l'activité de PPAR γ ¹²⁰. Cependant, une autre étude a démontré que la diminution de l'expression de PPAR γ , et en conséquence ses gènes cibles, par UHRF1 (pour *Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains 1*) pourrait être une étape importante de la progression des cancers colorectaux. Ainsi, les tumeurs sporadiques qui expriment fortement UHRF1 sont caractérisées par un phénotype indifférencié, un niveau de prolifération plus important et un mauvais pronostic pour les stades II-IV ¹²¹.

De plus, certaines tumeurs coliques humaines présentent différentes mutations de PPAR γ , ce qui entraîne une perte de ses fonctions ¹²². Dans une autre étude, aucune mutation de PPAR γ n'est observée, suite à l'analyse de près de 400 échantillons de différents types de cancer ¹²³. Ces mutations sont, par conséquent, très rares et contribuent à la carcinogénèse sans en être la

véritable cause. Le traitement de souris Apc^{Min} par la Troglitazone augmente le nombre de tumeurs coliques¹²⁴. Néanmoins, la délétion du gène $PPAR\gamma$ (KO $PPAR\gamma^{+/-}$ ou KO $PPAR\gamma^{-/-}$) accroît aussi le nombre de tumeurs coliques chez la souris Apc^{Min} ¹²⁵. Enfin, le traitement de cellules HT29 (APC^{mut}) par une faible quantité de $\Delta PGJ2$ ou de Pio (0,1 μ M) augmente la prolifération cellulaire en induisant une accumulation de la β -caténine et de c-myc. Une hausse du volume tumoral est effectivement observée suite au traitement de souris *nude*, xénotreffées avec des cellules HT29, par une faible quantité de Pio¹²⁶.

2. Propriétés anti-cancéreuses des agonistes de $PPAR\gamma$

Les agonistes de $PPAR\gamma$ présentent aussi des propriétés anticancéreuses. Par exemple, le traitement par les TZD de souris, servant de modèle pour la carcinogénèse colique, diminue le développement tumoral^{12,79,81,127,128}. Ces composés agissent également sur d'autres types cellulaires (cellules mammaires, prostatiques, leucémiques myéloïdes, pulmonaires, thyroïdiennes...) ¹²⁹. En effet, le traitement par GW7845, un agoniste de $PPAR\gamma$, ralentit l'apparition de tumeurs mammaires dans un modèle murin de carcinogénèse¹⁰⁹. L'action anticancéreuse des agonistes de $PPAR\gamma$ serait due à des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques, anti-invasifs, anti-angiogéniques ou encore préventifs. Ces effets peuvent être dépendants ou indépendants du récepteur $PPAR\gamma$. Ces effets indépendants ont été notamment mis en évidence par l'utilisation d'un antagoniste de $PPAR\gamma$, GW9662.

a. Propriétés pro-apoptotiques des agonistes de $PPAR\gamma$

Par le biais de l'activation de $PPAR\gamma$, la $\Delta PGJ2$ est capable d'inhiber la croissance des cellules de neuroblastome en induisant une apoptose, si les lipides sont préalablement retirés du milieu, ou une autophagie si le milieu cellulaire est complet¹³⁰. Les TZD induisent également l'apoptose des cellules cancéreuses coliques HCT116, *in vitro* et *in vivo*, grâce à l'expression du facteur de transcription KLF4 (pour *Krüppel-like factor 4*) et de son gène cible pro-apoptotique, NAG-1 (pour *Nonsteroidal anti-inflammatory drug-Activated Gene-1*). En revanche, la $\Delta PGJ2$ n'est pas capable d'induire l'expression de KLF4 ou NAG-1 dans ces cellules¹³¹. Cependant, elle induit l'expression de KLF4 dans les cellules HT29, contrairement à la Rosiglitazone, *via* l'activation de la voie MAPK/Erk¹³². De surcroît, les traitements par les TZD ou la $\Delta PGJ2$ peuvent induire l'apoptose des cellules cancéreuses coliques par l'inhibition de l'expression de NF κ B et de BCL2 ou l'induction de Bax^{133,134}. Le traitement par la Pio est également capable d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses coliques, qui n'expriment pas la protéine Rb (pour Rétinoblastome), en diminuant l'expression des protéines anti-apoptotiques XIAP (pour *X-linked inhibitor of apoptosis*

protein) et Bcl2 et en augmentant l'expression de Bax¹³⁵. Enfin, les TZD réduisent l'expression de la PGE2 synthase, qui possède des propriétés anti-apoptotiques. L'utilisation de GW9662 a montré que cet effet est indépendant de PPAR γ ¹³⁶. L'utilisation des analogues des TZD a permis de mettre en évidence l'induction d'effets apoptotiques, par les TZD, indépendants de PPAR γ . La Δ Ciglitazone et la Δ Troglitazone ont un effet apoptotique supérieur à la Ciglitazone et à la Troglitazone, sur des cellules dérivées de carcinome prostatique (PC3 et LNCap). A l'inverse, le traitement par la Pio ou son analogue, la Δ Pioglitazone (Δ Pio), n'a aucun effet sur ces lignées⁴³. En revanche, le traitement par la Pio inhibe la croissance de ces lignées, lorsqu'elles sont cultivées en sphéroïdes, grâce à une modulation du métabolisme du glucose¹³⁷.

b. Propriétés anti-prolifératives des agonistes de PPAR γ

Il a été montré que l'activation de PPAR γ pouvait avoir des effets anti-tumoraux sur les cellules cancéreuses coliques grâce à des propriétés de différenciation et anti-prolifératives. En effet, les TZD diminuent la prolifération cellulaire, notamment, par une augmentation de l'expression de p21^{135,138,139}. Cette dernière peut être provoquée par une hausse de TSC-22¹⁴⁰ ou de p27¹⁴¹, une baisse de sa dégradation par le protéasome¹⁴² ou par l'augmentation de l'expression de Sp1 (pour *specificity protein 1*)¹⁴³. Les TZD peuvent aussi exercer leur activité anti-proliférative en réduisant l'expression de c-myc et de la cycline D1, notamment grâce à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, ou encore grâce à une baisse de l'expression de GSK3 β ^{85,134,144-147}. La diminution de l'expression de c-myc, associée à la hausse de l'expression de Mad-1 (pour *Mitotic spindle assembly checkpoint protein*), induite par la Δ PGJ2 et la Rosiglitazone, permet l'inactivation de hTERT (pour *human telomerase reverse transcriptase*) et donc l'inhibition de la prolifération des cellules Caco-2¹⁴⁸. Les TZD peuvent aussi inhiber la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* et *in vivo* en réduisant l'expression d'autres cyclines (A, B, et E)^{135,149,150}. La Ciglitazone est quant à elle capable de réduire l'expression et l'activité de Cdk5 et Cdk2^{142,151}. Ainsi, il a été montré que l'activation de PPAR γ par la Rosiglitazone provoquait l'arrêt du cycle des cellules cancéreuses coliques en phase G0/G1¹⁵². Cet effet nécessite la présence de la protéine Rb, impliquée dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, *via* la séquestration du facteur de transcription E2F. En absence de la protéine Rb, le traitement par les TZD induit une apoptose¹⁵³. Les TZD inhibent aussi la progression du cycle en inhibant la liaison à l'ADN de l'hétérodimère E2F/DP-1¹⁵⁴ ou en diminuant l'expression de RegI α (pour *regenerating gene IA*)¹⁵⁵.

Une autre étude a montré que l'expression transitoire de Sirt1 et de son gène cible β -TrCP (pour *β -transducin repeat-containing protein*), une sous-unité de l'ubiquitine ligase E3, induite par les TZD, serait responsable de la dégradation protéosomale de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, comme la cycline D1, la β -caténine, Wee1 et CDC25A (pour *Cell Division Cycle 25 A*) dans les cellules LNCap ou MCF7^{156,157}. Ces effets sont indépendants de PPAR γ et sont retrouvés suite à une privation de glucose. Les TZD pourraient donc être responsables d'une restriction énergétique au sein de ces modèles cellulaires. L'expression de Sirt1 induite par les TZD, dans les cellules LNCap ou MCF7, serait également à l'origine de l'activation de la voie AMPK¹⁵⁶. En effet, Sirt1 active LKB1 (pour *liver kinase B1*), enzyme responsable de l'activation de AMPK par phosphorylation au niveau de la Thréonine 172¹⁵⁸. L'activation d'AMPK induit la production d'un stress du reticulum endoplasmique¹⁵⁶ et l'autophagie^{156,159,160}, toujours indépendamment de PPAR γ . Sirt1 est aussi capable d'induire directement l'autophagie en activant les protéines Atg5, Atg7 et Atg8 (pour *Autophagy-related proteins*)¹⁶¹ ou indirectement en activant FOXO3A et E2F1, deux facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes impliqués dans les processus d'autophagie¹⁶². Néanmoins, l'induction de Sirt1 par les TZD diffère selon le type cellulaire. En effet, la Ciglitazone diminue l'expression de cette protéine dans les cellules cancéreuses ovariennes A2780/AD⁴¹.

La capacité anti-proliférative des agonistes de PPAR γ est également associée à leur capacité à induire la différenciation cellulaire¹⁶³. En effet, ils induisent l'expression de marqueurs de différenciation, tels que les cytokératines, la sialyl transférase, Drg-1 (pour *Differentiation-related gene-1*) et la E-cadhérine, dans les cellules cancéreuses coliques^{118,138,139,155}, et réduisent l'expression de marqueurs tumoraux, tels que l'ornithine décarboxylase ou la *laminin binding protein*¹⁶⁴.

Une mutation du récepteur PPAR γ au niveau du codon 422, dans certaines cellules cancéreuses coliques, empêche le recrutement de cofacteurs spécifiques nécessaires à l'induction des marqueurs de différenciation. Les agonistes de PPAR γ sont alors incapables de diminuer la prolifération cellulaire. La transfection de PPAR γ WT (pour *wild-type*) dans ces cellules permet l'induction des marqueurs de différenciation par les agonistes de PPAR γ , associée à une baisse de la prolifération cellulaire¹⁶⁵.

Les TZD agissent sur d'autres cibles pour réduire la croissance des cellules tumorales. Par exemple, le dérivé 5-benzylidene-1,3-thiazolidin-2,4-dione (Figure 22A) inhibe le récepteur d'IGF-1R¹⁶⁶, tandis que le dérivé 5-alkyliden-1,3-thiazolidin-2,4-dione (Figure 22B) bloque les voies de signalisation MAPK/MEK/Erk et PI3K/Akt par inhibition de MEK1 et PI3K¹⁶⁷.

Introduction

Les TZD inhibent aussi la voie PI3K/Akt en augmentant l'expression de PTEN (pour *Phosphatase and tensin homolog*), un inhibiteur de cette voie de survie^{104,168,169}, ou en interagissant avec le récepteur EGFR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) pour faciliter sa dégradation¹⁷⁰. La diminution de la phosphorylation et de l'expression d'EGFR est également observée suite au traitement de cellules cancéreuses coliques par le curcumin¹⁷¹. Ce dernier semble induire l'activité de PPAR γ sans en être un véritable ligand¹⁷². Un autre dérivé 5-benzylidene-1,3-thiazolidin-2,4-dione (Figure 22C) inhibe l'aldose réductase 2 (ALR2), un oncogène surexprimé dans de nombreux types de cancer¹⁷³.

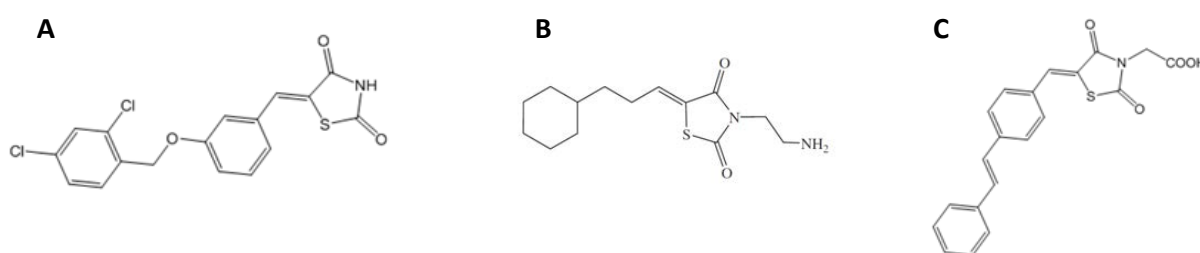


Figure 22 : Structure des dérivés TZD avec une activité d'antagoniste

(A) antagoniste d'IGF-1R ; (B) antagoniste de MEK1 et PI3K ; (C) antagoniste de ALR2

c. Propriétés anti-invasives des agonistes de PPAR γ

Les TZD agissent sur les processus de migration et d'invasion. Il a été ainsi montré que le traitement par ces agonistes inhibait l'activité invasive des cellules cancéreuses coliques *in vitro* et *in vivo*, en diminuant l'expression de COX2 et de diverses métalloprotéinases (MMP2, 7 et 9 pour *Matrix Metalloproteinase*), tout en augmentant l'expression de leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP1 et 2 pour *Tissue Inhibitor MetalloProteinase 1 et 2*)^{17,174-176}. De plus, les TZD réduisent l'expression du récepteur aux chemokines CXCR4 (pour *C-X-C chemokine receptor type 4*) à la surface des cellules HT29, de manière dépendante de PPAR γ ¹⁷⁷. Ce récepteur joue un rôle important dans le processus métastatique, car il favorise la migration cellulaire, par chimiotactisme, vers les organes libérant son ligand SDF-1 α (pour *Stromal cell-derived factor-1*) en grande quantité, comme les poumons, les os ou le foie¹⁷⁸.

d. Propriétés anti-angiogéniques des agonistes de PPAR γ

La Δ PGJ2 est responsable de l'inhibition de la formation de vaisseaux sanguins *in vitro* et *in vivo*¹⁷⁹. Elle est également capable de diminuer la production des cytokines pro-inflammatoires IL-10 et IL-12 par les macrophages¹⁸⁰, cytokines qui stimulent indirectement l'angiogénèse et l'invasion tumorale⁷³. De même, la Rosiglitazone inhibe la prolifération des cellules endothéliales, tout en réduisant la sécrétion du facteur pro-angiogénique VEGF par les cellules cancéreuses de glioblastome ou pulmonaires *in vitro*. Par ailleurs, son efficacité a

été démontrée *in vivo*. Effectivement, la Rosiglitazone diminue la croissance tumorale, suite à une greffe orthotopique de cellules cancéreuses prostatiques LNCaP chez la souris. Le traitement entraîne une baisse de la densité des vaisseaux ¹⁸¹. De la même manière, la Rosiglitazone et la Δ PGJ2 induisent une réduction de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques PANC-1 *in vitro* et *in vivo* grâce à une diminution de l'expression de VEGF ¹⁸². Cependant, la Δ PGJ2 et la Troglitazone peuvent induire l'expression de VEGF et de son récepteur dans les cellules leucémiques THP-1, les cellules endothéliales de l'artère coronaire et les myofibroblastes de rat ^{183,184}.

e. Propriétés préventives des agonistes de PPAR γ

Un effet préventif des TZD a été démontré dans diverses études. En effet, on observe une diminution de l'inflammation du colon, et donc de la formation de cryptes aberrantes, chez des rongeurs traités par ces agonistes ^{15,79,164}. Le traitement par la Pio permet de réduire le nombre de polypes intestinaux chez les souris Apc^{Min} ^{80,81}. Le traitement de souris par la Troglitazone permet également la prévention de la formation de tumeurs gastriques ¹⁸⁵.

Chez l'Homme, un traitement préventif d'un mois avec la Pio (15mg/jour) diminue significativement le nombre de cryptes aberrantes. Néanmoins, ce traitement n'engendre pas de changement significatif du nombre et de la taille des adénomes ¹⁸⁶. Une étude taïwanaise a aussi montré que le traitement de patients diabétiques avec les TZD réduisait le risque de cancer de l'estomac ou du pancréas, risque qui est plus élevé chez les patients diabétiques que dans la population normale ¹⁸⁷.

IV. Le stress oxydant

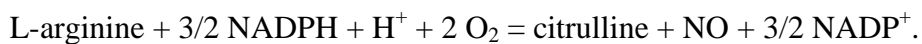
A. Espèces réactives et système antioxydant

1. Les espèces réactives

Les espèces réactives oxygénées (ROS) sont principalement générées par le métabolisme énergétique, lors de la synthèse d'ATP, *via* la chaîne respiratoire. Ainsi, la mitochondrie produit 85% des anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) cellulaires, ce qui en fait le site majeur de production de ROS *in vivo* ¹⁸⁸. Il existe toutefois d'autres mécanismes mineurs. En effet, les enzymes COX produisent également des $O_2^{\cdot-}$ en effectuant la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines et eicosanoïdes ¹⁸⁹. Il existe deux isoformes : COX1, présentant une activité constitutive, et COX2 une activité inductible (facteurs pro-inflammatoires, hormones, facteurs de croissance, oncogènes...) ¹⁹⁰. De plus, la NOX (NADPH oxydase), une enzyme associée à la membrane plasmique, génère aussi des anions superoxydes lors de l'oxydation du NADPH en $NADP^+$ (pour *Nicotinamide Adénine*

Introduction

Dinucléotide Phosphate)¹⁹¹. La surexpression de COX2 et NOX1 est retrouvée dans la plupart des cancers colorectaux et semblerait être un évènement précoce de la cancérogénèse^{192,193}. Enfin, la POX (Proline oxydase), une enzyme localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale, produit des anions superoxydes lors de la transformation de la proline en Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (PC5)¹⁹⁴, tout comme la XOX (Xanthine oxydase) lors du catabolisme des purines¹⁹⁵. Ces anions superoxydes sont transformés, par le biais de la superoxyde dismutase (SOD), en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Lorsque ce dernier est présent en forte concentration, il est transformé en eau (H_2O) et en oxygène (O_2), par la catalase. Mais, il peut également être dismuté en deux radicaux hydroxyls ($OH\bullet$), très réactifs avec le fer et le cuivre (Figure 23). Les espèces réactives azotées (RNS), notamment le peroxyde nitrique $ONOO^-$ qui se forme à partir de l'oxyde nitrique (NO) et des anions superoxydes (O_2^-), sont très réactives et jouent un rôle important dans la cancérogénèse¹. L'oxyde nitrique est une molécule importante pour la signalisation cellulaire. Il est synthétisé par les NOS selon la réaction suivante :



Il existe trois isoformes de NOS, endothéliale (eNOS), neuronale (nNOS) et inducible (iNOS).

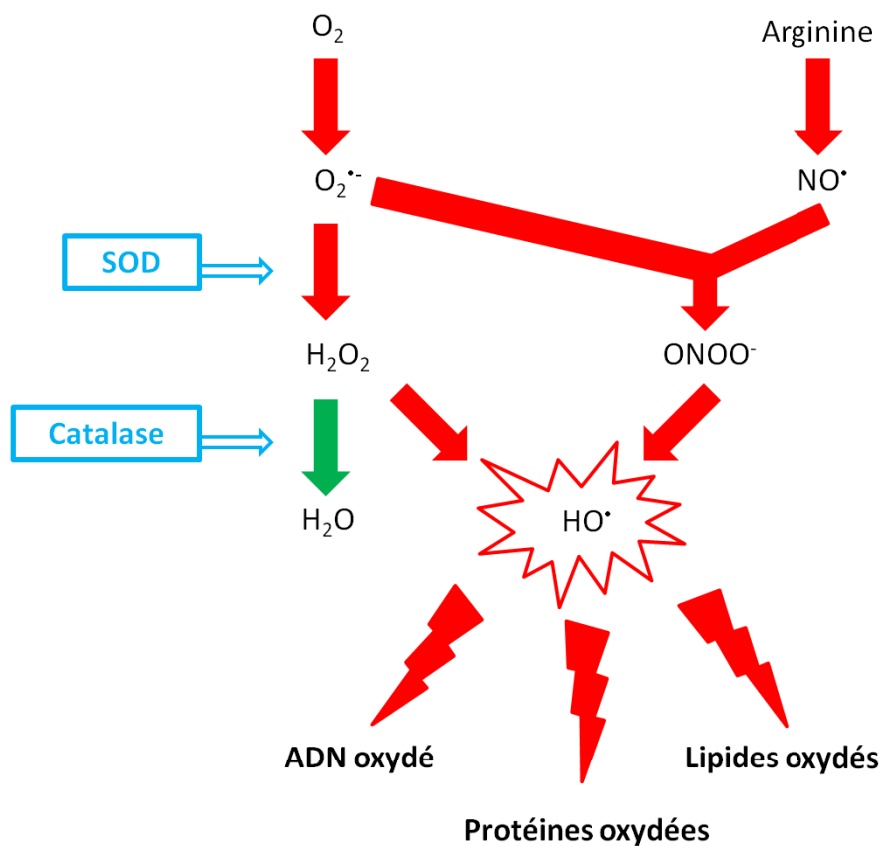


Figure 23 : Stress oxydant et système enzymatique antioxydant (Adaptée de¹)

2. Le système antioxydant

a. Le système du glutathion

Le glutathion (γ -L-glutamyl-L-cystéinyl-glycine) représente le réducteur cellulaire majoritaire, dans toutes les cellules eucaryotes ¹. Il existe sous deux formes principales : une forme réduite majoritaire (GSH) et une forme oxydée (GSSG) (Figure 24). Le rapport GSH/GSSG est un indicateur important du statut redox cellulaire. Un déséquilibre de ce rapport a été rapporté dans de nombreuses pathologies, notamment les cancers et les maladies neurodégénératives. En revanche, la régulation du statut redox extracellulaire est indépendante du niveau de GSH. En effet, le système de transport cystéine-cystine et/ou des oxydoréductases membranaires en sont les principaux acteurs ¹⁹⁶.

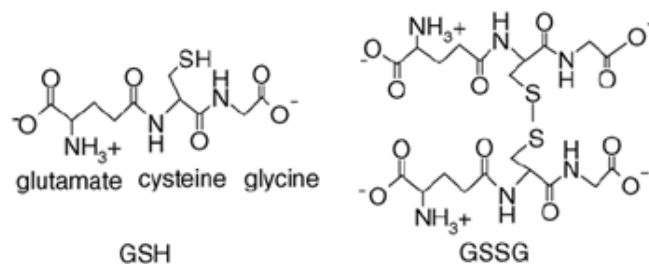
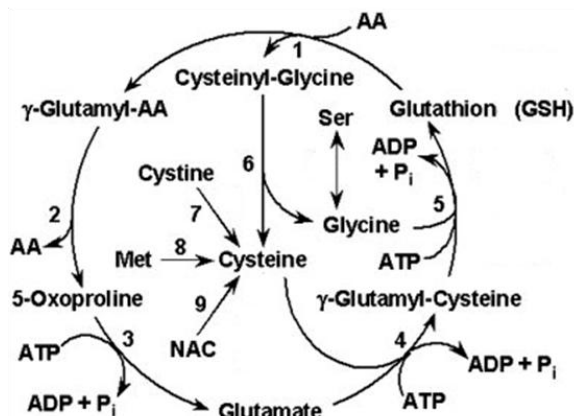


Figure 24 : Structure du glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) ¹

La synthèse du GSH comprend deux étapes principales. La première étape correspond à la conjugaison de la cystéine avec le glutamate pour former le γ - glutamyl-cystéine. Cette étape est catalysée par la γ -glutamylcystéine ligase (GCL), enzyme formée de deux sous-unités, une catalytique (GCLC) et une régulatrice (GCLM). La production de NO, suite à l'activation d'iNOS, peut engendrer une S-nitrosation de la GCL. Cela a pour conséquence d'inhiber son activité et d'entraîner une diminution de la synthèse du GSH. La deuxième étape de cette synthèse consiste à conjuguer la γ -glutamylcystéine et la glycine pour former le GSH. Cette étape est catalysée par la glutathion synthétase (GS) (Figure 25) ¹⁹⁷.



- 1) γ -glutamyl transpeptidase
- 2) γ -glutamyl cyclotransférase
- 3) 5-oxoprolinase
- 4) γ -glutamylcystéine ligase
- 5) glutathion synthétase
- 6) Dipeptidase
- 7) Thioltransférase
- 8) voie de transsulfuration
- 9) déacylase

Figure 25 : Synthèse du GSH ¹⁹⁷

AA = Acide Aminé ; Ser = Sérine ; Met = Méthionine ; NAC = N-acétyl-cystéine.

Introduction

La cystéine, produite par le catabolisme de la méthionine, est l'acide aminé limitant de la synthèse du GSH. Le glutamate joue aussi un rôle très important dans la régulation de la synthèse du GSH. En effet, une forte concentration intracellulaire en glutamate empêche l'inhibition de la GCL par le GSH, par un mécanisme de compétition. Enfin, le glutathion est synthétisé principalement dans le foie, puis exporté vers les autres organes, notamment les reins, les poumons et les intestins. Au sein de la cellule, 85 à 90% du GSH se trouve dans le cytosol et le reste dans les organelles (mitochondries, matrice nucléaire et peroxysomes)¹⁹⁷.

Le glutathion constitue le plus important agent de défense cellulaire, chez les mammifères. En effet, les peroxydes, dont H_2O_2 , sont éliminés par la GSH peroxydase (GPx), selon une réaction de réduction, qui utilise GSH comme substrat et le transforme en GSSG. Ce dernier est reconverti en GSH par la GSH réductase (GR) (Figure 26). Cette réaction nécessite l'apport de NADPH, synthétisé principalement *via* la voie des pentoses phosphates¹.

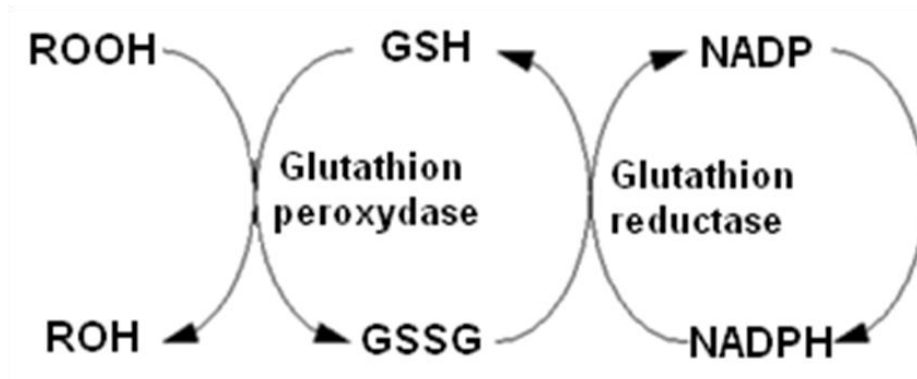


Figure 26 : Le cycle du glutathion¹

Les peroxydes (ROOH), dont H_2O_2 , sont transformés en alcool (ROH), par la Glutathion peroxydase (GPx), selon une réaction de réduction qui utilise GSH comme substrat et le transforme en GSSG. Ce dernier est reconverti en GSH par la Glutathion réductase (GR), en transformant NADPH en NADP.

Le glutathion participe aussi à la détoxification des xénobiotiques, par conjugaison. Cette réaction est effectuée par les glutathion transférases (GSTs). Les conjugués sont exportés dans le domaine extracellulaire par des transporteurs membranaires, qui appartiennent à la famille MRP (pour *Multidrug Resistance associated Proteins*)¹. De plus, le glutathion intervient dans la survie cellulaire. En effet, la surexpression de BCL2 entraîne la redistribution du GSH du cytoplasme vers le noyau. La séquestration du GSH dans le noyau modifie le statut redox, bloque l'activité des caspases et favorise ainsi la survie cellulaire¹⁹⁸. Le taux basal de GSH est également associé aux cancers du colon. Un contenu faible en GSH dans les cellules de la muqueuse colique et rectale est corrélé à une susceptibilité à la cancérogénèse. Néanmoins, de manière paradoxale, une concentration élevée dans la tumeur, au moment du diagnostic, est un mauvais pronostic pour le cancer colorectal¹⁹⁹.

b. Les enzymes antioxydantes

Le système antioxydant est composé d'enzymes antioxydantes, comme la SOD et la catalase, dont les actions ont été décrites précédemment, ou encore les thiorédoxines (Trx), qui sont des enzymes à activité antioxydante intrinsèque. Les protéines oxydées par les ROS voient leur groupements thiols être modifiés en groupements sulféniques, réduits par les thioredoxines. Ce sont alors ces dernières qui sont oxydées et qui sont réduites par la thiorédoxine réductase (TR). Les thioredoxines sont également impliquées dans le contrôle de nombreuses protéines régulant la prolifération et la mort cellulaire ¹. Les peroxyredoxines (Prx) sont des enzymes possédant des cystéines à activité redox, qui permettent la réduction d' H_2O_2 , lorsqu'il est présent à de faibles concentrations. Les cystéines oxydées des Prx forment alors des ponts disulfures, réduits par les Trx. L'hydroxylation des Prx (formation de groupements sulféniques : SO_2H) est réversible suite à l'action des sulfiredoxines (Srx) (Figure 27) ²⁰⁰.

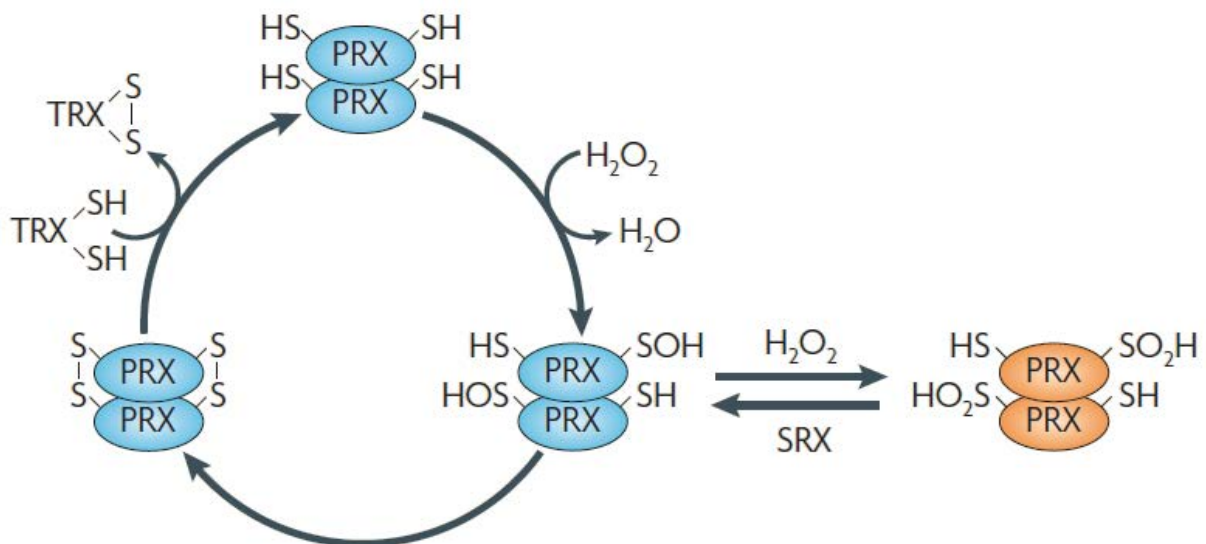


Figure 27 : Action et régénération des peroxyredoxines ²⁰¹

c. Les molécules non enzymatiques

Le système antioxydant est aussi composé de molécules non enzymatiques.

La vitamine E, lipophile, dont l' α -tocophérol est la forme la plus active, joue un rôle majeur dans la protection des membranes contre la peroxydation lipidique. Après réaction avec les peroxydes, elle est régénérée par l'action de la vitamine C.

L'acide lipoïque (ALA), dont la forme réduite est le DHLA (Acide Dihydrolipoïque), permet l'élimination des ROS et la régénération des vitamines C et E, du GSH et des groupements thiols des protéines oxydées.

Les caroténoïdes sont des pigments présents dans les plantes. Ils sont capables de délocaliser les électrons célibataires et d'éteindre O_2^- , ROO^- et OH^- , grâce à leur structure double liaison.

Les flavonoïdes sont des polyphénols (PhOH) qui transfèrent un hydrogène sur ROO- pour former le peroxyde correspondant (ROOH). L'intermédiaire (PhO-) issu de cette réaction est plutôt stable¹.

B. Effets du stress oxydant et réponses cellulaires

1. Rôle des ROS dans la signalisation cellulaire

En conditions normales, la production de ROS n'est pas, en soi, une situation de stress oxydant. Tout d'abord, la cellule possède un système antioxydant efficace. De plus, les ROS stimulent les mêmes voies de signalisation que les facteurs de croissance, par le biais de MAPK, PI3K et PLCγ (pour *Phospholipase C*; Figure 28). Ainsi, elles permettent l'expression de différents gènes de prolifération cellulaire (*c-fos*, *c-jun* et *c-myc*) et activent les facteurs de transcription AP-1 et NFκB, qui permettent la survie cellulaire¹⁸⁸.

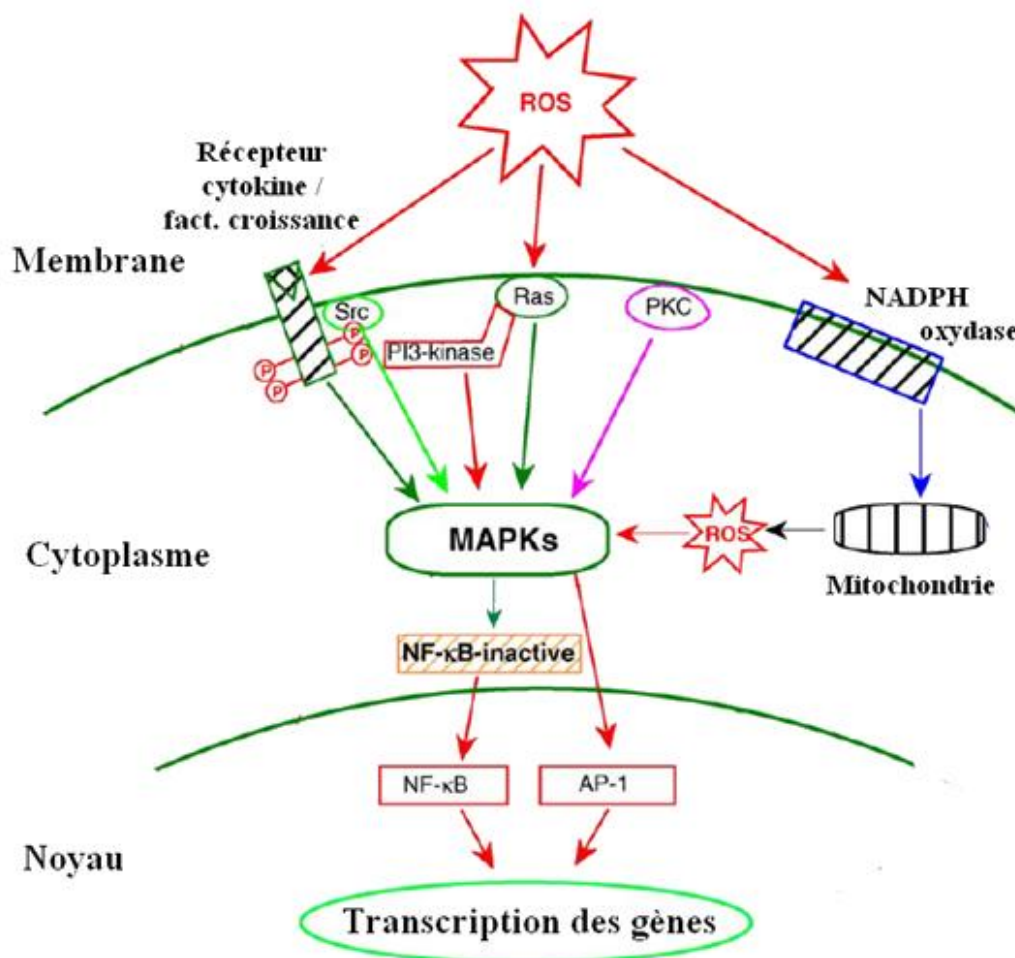


Figure 28 : La signalisation cellulaire induite par les ROS (adaptée de²⁰²)

Les ROS peuvent également intervenir dans la signalisation cellulaire en modulant l'activité des protéines par l'oxydation de leur groupement thiol. De même, les RNS sont capables de moduler l'activité des protéines par le biais de S-nitrosylation. Enfin, l'ajout de NO sur les

acides gras permet la production de composés électrophiles. Ces derniers sont capables de former des adduits avec les groupements thiols des résidus latéraux des protéines, modifiant ainsi la fonction de la protéine et sa distribution ²⁰³.

2. Rôle des ROS dans la dégradation cellulaire

Une perturbation du statut redox peut causer de sérieux dommages oxydatifs : mutations de l'ADN et apparition de mésappariements, peroxydation des lipides et dégradation de protéines. Cette modification du statut redox provoque ainsi l'apparition de différentes maladies : troubles cardiovasculaire, maladies neurodégénératives et cancers.

3. Rôle des ROS dans l'induction de l'apoptose et la nécrose

Le stress oxydant modéré peut entraîner une apoptose, par une augmentation de la production de céramides, une activation de JNK, p53 et des caspases. Lorsque, le stress oxydant est important, la forte dose de ROS entraîne une inactivation des caspases et une nécrose cellulaire. Cette caractéristique cytotoxique des ROS est utilisée en thérapeutique pour induire la mort des cellules cancéreuses, notamment celles qui présentent une déficience du système antioxydant ²⁰⁴.

4. Rôle des ROS dans l'induction de l'autophagie

La production en excès de ROS est associée au processus d'autophagie. Cette dernière consiste à dégrader les organelles ou les molécules non fonctionnelles afin de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'autophagie est induite par différents stimuli intra ou extracellulaires (privation de nutriments, infection pathogène, agrégats protéiques et dommages aux organelles), qui sont capables d'inhiber la protéine mTOR (pour *mammalian Target Of Rapamycin*). L'autophagie consiste à la formation d'une vésicule à double membrane, appelée l'autophagosome, qui englobe les organelles à dégrader. Ce dernier va ensuite fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome, et entraîner la dégradation du contenu de la vésicule. Ce mécanisme est régi par les protéines Atg. Beclin 1 (ou Atg6) est la protéine principale de ce processus, car elle initie la formation de l'autophagosome (Figure 29) ²⁰⁵. En revanche, l'autophagie est régulée négativement par Atg4 et BCL2. Les ROS inactivent Atg4 en oxydant un résidu cystéine critique, ce qui permet la formation de l'autophagosome. En effet, l'utilisation d'antioxydants permet d'inhiber le processus d'autophagie ²⁰⁵. L'activation des JNK pourrait également être impliquée dans le phénomène d'autophagie ²⁰⁶.

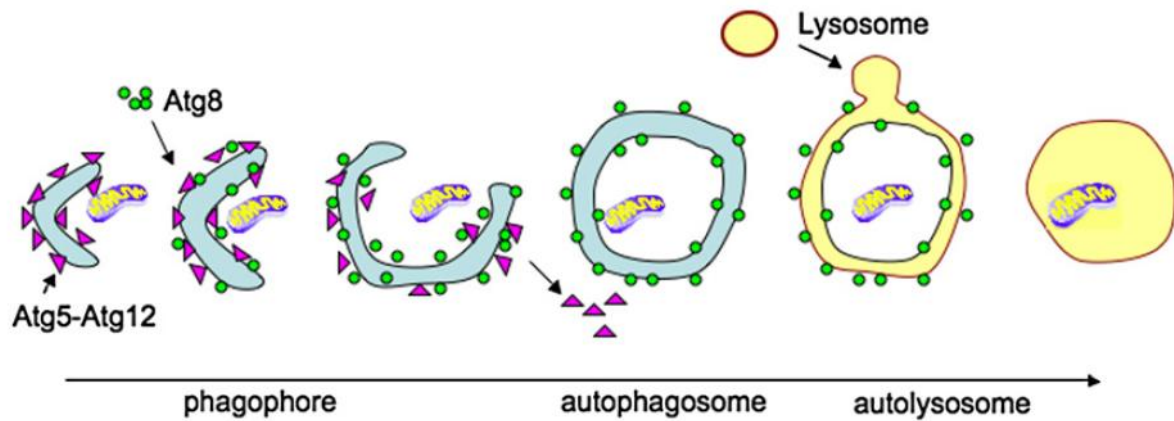


Figure 29 : Mécanisme de l'autophagie²⁰⁵

5. Rôle des ROS dans la réponse UPR

L'accumulation de protéines déstructurées dans le réticulum endoplasmique, suite au stress oxydant, entraîne la réponse UPR (pour *unfolded protein response*). Cette réponse favorise la survie cellulaire et améliore la capacité de repliement des protéines dans l'urgence. Cette réponse se caractérise par l'activation de PERK (pour *protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*), une protéine kinase transmembranaire. L'activation de cette dernière permet l'expression de molécules chaperonnes dans le réticulum endoplasmique, notamment la protéine de choc thermique Hsp27 (pour *Heat Shock Protein 27*). PERK est également capable de phosphoryler le facteur de transcription Nrf2 (pour *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), dont l'activation entraîne l'expression de protéines antioxydantes²⁰⁷. L'activation la voie Nrf2 est décrite plus précisément dans le paragraphe suivant.

C. La voie de signalisation antioxydante Nrf2/Keap1

1. Activation de la voie Nrf2/Keap1 en réponse à un stress oxydant

Nrf2 est un facteur de transcription, à domaine leucine zipper basique (bZIP), sensible au statut redox. La protéine Keap1 (pour *Kelch-like ECH-associated protein 1*) inhibe Nrf2 en la séquestrant dans le cytoplasme. Le couple Nrf2/Keap1 est exprimé dans tous les tissus, et plus fortement dans les reins, les poumons et les muscles.

En conditions physiologiques normales, l'homodimère Keap1 se lie à Nrf2 en deux points. Cette double liaison permet le bon positionnement de Nrf2 au sein du complexe et le recrutement d'une sous unité de l'ubiquitine ligase E3, Cul3 (pour *Cullin 3*). Associée à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2, Cul 3 permet l'ubiquitinylation de lysines spécifiques et donc la dégradation de Nrf2 par le protéasome (Figure 30)²⁰⁸.

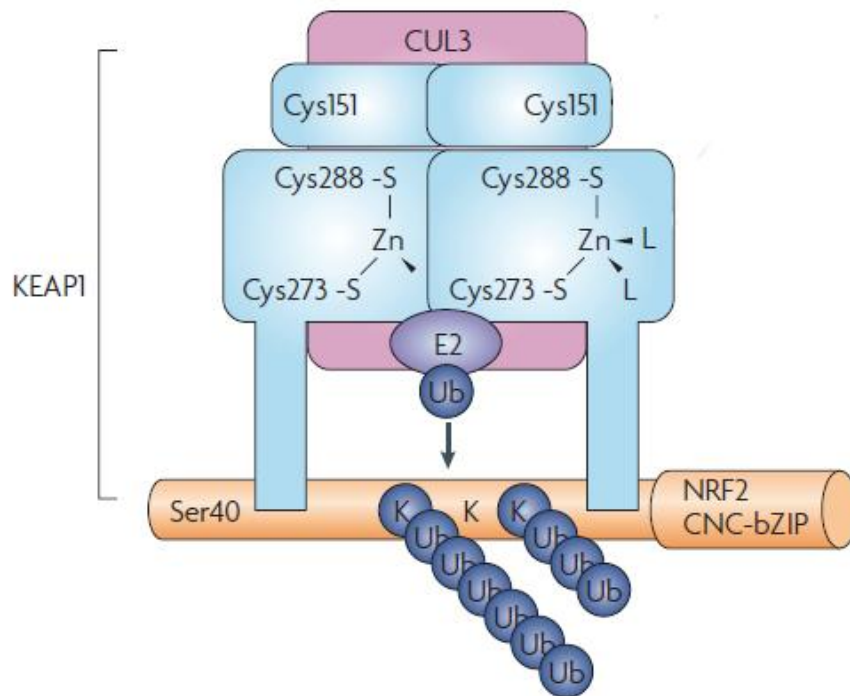


Figure 30 : Complexe Nrf2/ Keap1/ Cul3²⁰¹

Keap1, qui est également relié à l'actine, permet la séquestration cytoplasmique de Nrf2 et facilite sa dégradation par son transport vers le protéasome, *via* le cytosquelette d'actine²⁰⁹. C'est pourquoi, un dysfonctionnement du cytosquelette de l'actine peut aboutir à l'activation de la voie Nrf2²¹⁰. Keap1 peut également s'associer avec PGAM5 (pour *phosphoglycerate mutase family member 5*) afin de permettre la liaison du complexe Nrf2/Keap1 à la membrane externe des mitochondries. Cette localisation est idéale pour détecter un stress oxydant²¹¹. En conditions de stress oxydant, la cystéine 151 de Keap1 peut être oxydée et entraîner un dysfonctionnement de l'ubiquitinylation de Nrf2 par Cul3. Les résidus cystéine 273 et 288 de Keap1 peuvent aussi être oxydés, ce qui entraîne une modification de la structure de la protéine et une déstabilisation du complexe Nrf2/Keap1. Néanmoins, la libération de Nrf2 nécessite une étape supplémentaire, qui consiste à la phosphorylation de la Serine 40 de Nrf2 par PKC δ (pour *protein kinase C \delta*)²¹². Les RNS peuvent provoquer une S-nitrosation de Keap1, qui permet également la séparation du complexe Keap1/Nrf2²¹³. Une fois libérée, Nrf2 peut toujours subir une dégradation protéasomique indépendante de Keap1, mais qui est plus lente²¹⁴.

En absence d'une dégradation rapide de Nrf2, cette dernière s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau, où elle s'associe à son coactivateur Maf, avant de se fixer sur une séquence spécifique de l'ADN, appelée ARE (pour *Antioxydant Response Element*). Cette séquence est présente au sein des promoteurs de gènes spécifiques, notamment les enzymes

Introduction

de détoxification de phase II : HO-1 (pour *Heme Oxygenase 1*), GCL, NQO1 (pour *NAD(P)H dehydrogenase quinone 1*), et les GSTs²¹⁵. Enfin, Nrf2 est capable d'induire l'expression de MPR1, protéine impliquée dans l'efflux des espèces chimiques toxiques (Figure 31)²⁰⁹.

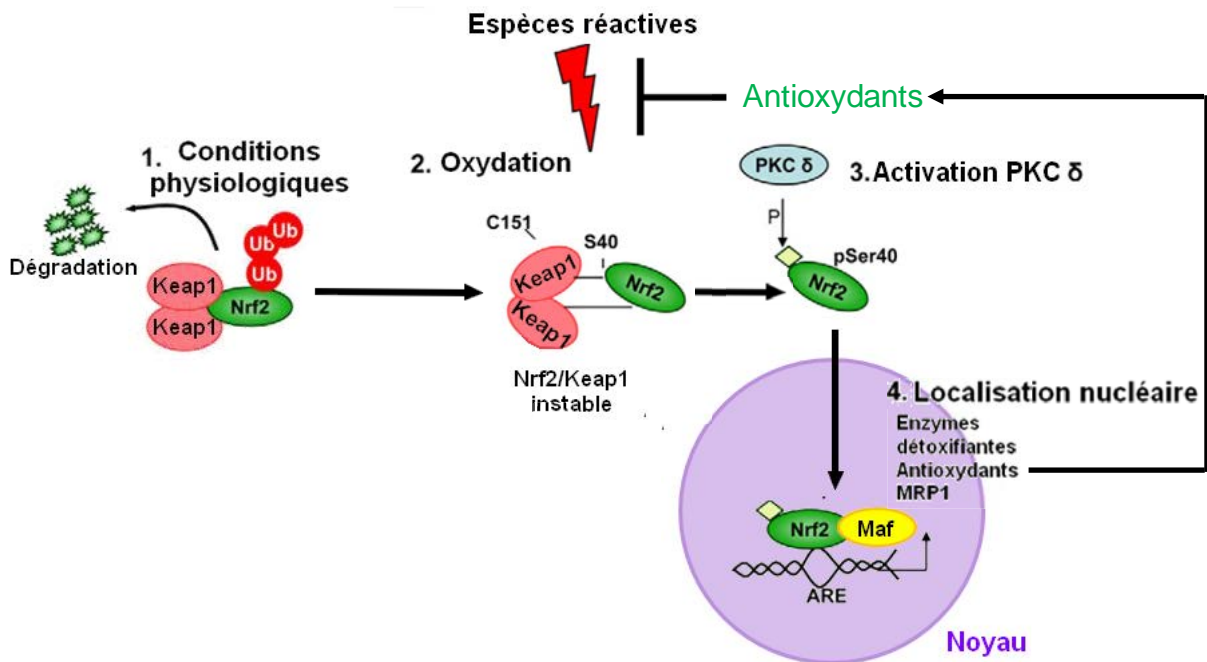


Figure 31 : Activation de la voie Nrf2/ Keap1 par un stress oxydant (Adaptée de²¹⁶)

Cependant, Nguyen T. et *al.* ont avancé l'hypothèse que Nrf2 serait une protéine nucléaire. Ils s'appuient sur la présence de Nrf2 dans le noyau des cellules HepG2 et H4IIEC3 en absence de stress. L'ARNm de Nrf2 serait dirigé du noyau vers le cytoplasme où la synthèse de la protéine serait effectuée par les ribosomes (Figure 32)²¹⁷.

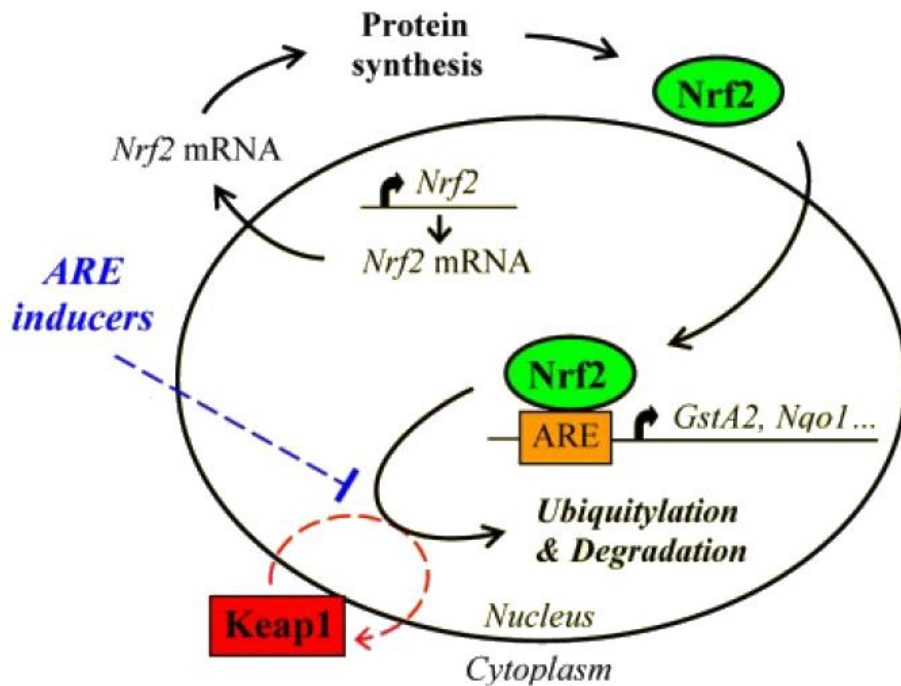


Figure 32 : Voie de signalisation Nrf2/Keap1 proposée par Nguyen et *al.*²¹⁷

La protéine Nrf2 serait alors transloquée immédiatement vers le noyau, afin de permettre la transcription des gènes-cibles. Keap1 entrerait dans le noyau pour former un complexe avec Nrf2. Ce complexe serait exporté hors du noyau pour permettre la dégradation de Nrf2 par le protéasome. En présence d'un stress oxydant, Keap1 ne serait plus capable de se lier à Nrf2. Cette dernière ne serait donc pas exportée vers le cytoplasme pour être dégradée. C'est pourquoi, dans ces conditions, Nrf2 s'accumulerait dans le noyau (Figure 32) ²¹⁷.

2. Régulation de la voie Nrf2/Keap1

Comme toutes les voies de signalisation, la voie Nrf2/Keap1 est finement régulée. Par exemple, l'activation de Nrf2 dépend des MAPK, pour favoriser la survie cellulaire (Figure 33). Une autre voie de survie cellulaire intervient dans l'activation de Nrf2, il s'agit de la voie permettant un réarrangement de l'actine. En réponse au stress oxydant, elle favorise la translocation de Nrf2 dans le noyau. Une réponse tardive au stress oxydant consiste à l'activation de GSK3 β , qui favorise la translocation nucléaire de la protéine Fyn. Au sein du noyau, Fyn phosphoryle Nrf2 au niveau de la Tyrosine 568, ce qui favorise son export nucléaire et sa dégradation. La voie de signalisation Nrf2 est alors désactivée (Figure 33) ²¹⁵.

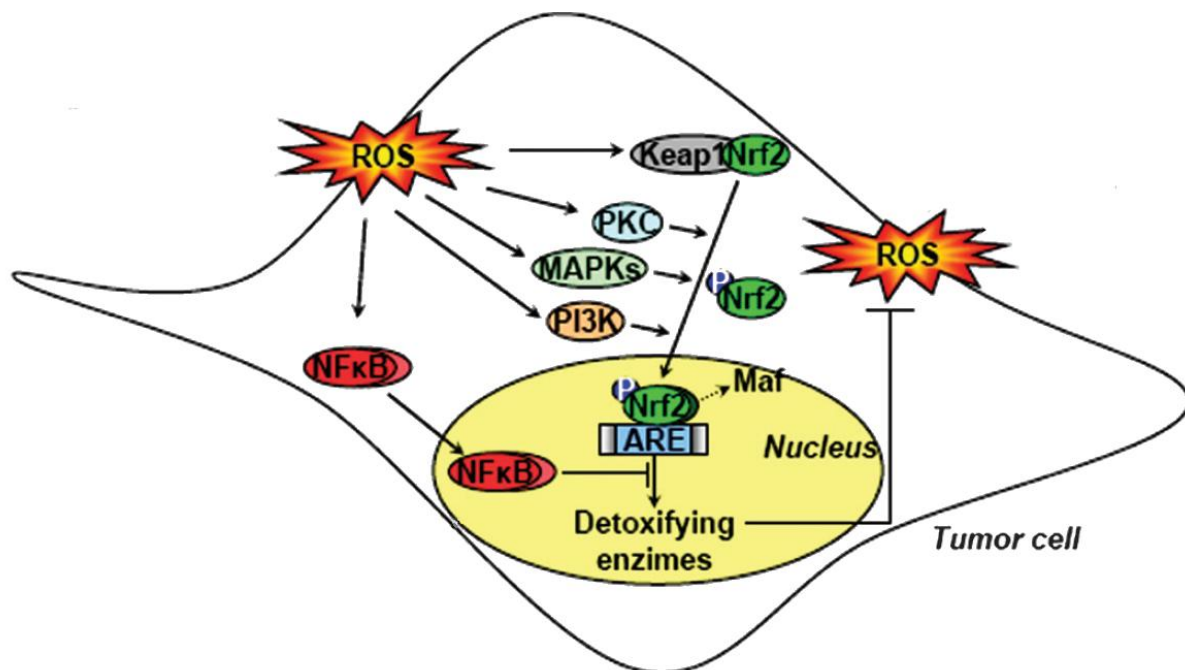


Figure 33 : Régulation de la voie Nrf2/Keap1 (Adapté de ²¹⁵)

En condition de stress oxydant, l'expression de Hsp90 et CK2 (pour *caseine kinase 2*) augmente fortement. CK2 phosphoryle la thréonine 55 de Keap1, permettant ainsi sa liaison avec Hsp90. La liaison Keap1/Hsp90 empêche la formation du complexe Keap1/Nrf2 et donc la dégradation de Nrf2. Si le stress oxydant persiste, on observe une dissociation du complexe

Introduction

Keap1/Hsp90²¹⁶. Keap1 peut ainsi être transloqué dans le noyau où il se lie à Nrf2. Le complexe est exporté hors du noyau, grâce à la séquence NES (pour *nuclear export sequence*) de Keap1, afin de permettre la dégradation de Nrf2²¹⁸. Les ROS peuvent également activer la voie anti-inflammatoire NFκB, qui inhibe la transcription des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1²¹⁵. Enfin, les microARNs (miR) jouent un rôle important dans la régulation de la voie Nrf2/Keap1. En effet, il a été montré que plusieurs miR sont capables de diminuer l'expression de l'ARNm de Nrf2, notamment en haussant sa dégradation. Au contraire, d'autres miRs augmentent la transcription dépendante de Nrf2, en réduisant l'expression de Keap1 ou de Bach1, protéine qui bloque la formation du dimère Nrf2/Maf²¹⁹.

3. La voie de signalisation Nrf2/Keap1 et la cancérogénèse

a. La voie Nrf2/Keap1 lutte contre la cancérogénèse

L'utilisation de substances inductrices de Nrf2, comme le sulforaphane, l'EGCG (pour *epigallocatechin-3-gallate*) ou encore l'oltipraz, permet de protéger les cellules de la tumorigénèse en induisant la réponse anti-oxydante^{220,221}. Les drogues donneuses de NO, notamment la NO-aspirine, sont également capables d'activer la voie Nrf2 en effectuant une S-nitrosylation de Keap1. Après des essais précliniques concluants, ces drogues sont testées en clinique pour la prévention des cancers coliques²¹³. De plus, l'inflammation chronique d'un tissu peut augmenter les risques néoplasiques. C'est pourquoi, les capacités anti-inflammatoires de Nrf2 lui confèrent un pouvoir de prévention vis-à-vis du développement tumoral²²². D'autre part, l'inhibition du promoteur de Nrf2 par la méthylation de sites CpG spécifiques, est retrouvée dans certains types de cancer de la prostate²²³. Enfin, l'inactivation du gène *BRCAl*, par diverses mutations retrouvées fréquemment dans les cancers mammaires, serait responsable d'une diminution de l'activation de Nrf2. Par conséquent, l'initiation de la cancérogénèse serait induite par un défaut de protection contre le stress oxydant²⁰⁹.

b. La voie Nrf2/Keap1 impliquée dans la cancérogénèse

Le stress oxydant peut aboutir à la peroxydation lipidique, qui entraîne la production de HNE (pour *4-hydroxynonéal*). Ce dernier est capable d'induire l'activation de Nrf2. Dans ce cas, Nrf2 permet la protection des cellules cancéreuses contre un stress oxydant trop important, qui serait responsable du déclenchement de leur mort cellulaire. C'est ainsi que Nrf2 peut être impliquée dans la promotion tumorale. De la même manière, Nrf2 protège les cellules cancéreuses du stress oxydant généré par les granulocytes en phase précoce. Normalement, par ce mécanisme, les granulocytes peuvent déclencher la mort des cellules cancéreuses²¹⁵. De plus, la voie Nrf2, par le biais de l'induction de l'enzyme NQO1, peut limiter l'induction

de l'autophagie. Ce processus permet l'élimination des composants cellulaires oxydés. Cependant, elle peut aussi aboutir à une mort cellulaire si cette digestion des composants cellulaires est trop importante. L'inhibition de l'autophagie, par NQO1, pourrait donc favoriser la survie cellulaire ²²⁴. C'est pourquoi, l'activation constitutive de Nrf2 (par des mutations inhibitrices de Keap1 ou des mutations activatrices de Nrf2) ou sa surexpression à des stades tardifs sont rapportés dans de nombreux cancers (cancers pulmonaires, mammaires, hépatiques et de la vessie) ^{215,221}. L'augmentation de l'expression de HO-1, gène-cible de Nrf2, sous l'induction de la Δ PGJ2 dans les cancers mammaires, permet une libération plus importante de fer à partir du radical hème. Ce fer labile peut être utilisé pour induire l'expression de la métalloprotéase MMP1, responsable de la capacité invasive de ces cellules cancéreuses mammaires ²²⁵. De même, l'activation de Nrf2 est observée lors du traitement de cellules cancéreuses coliques par le 5-Fluorouracile (5-FU), ce qui limite sa cytotoxicité ²²⁶. Enfin, Nrf2 est impliquée dans l'expression de protéines permettant l'efflux des xénobiotiques. Ainsi, l'activation de cette voie peut provoquer un potentiel de résistance aux drogues thérapeutiques. Cette résistance est accentuée par la capacité de la voie Nrf2 à lutter contre le stress oxydant, souvent généré par ce type de composé ²⁰⁹.

4. Implication de la voie Nrf2/Keap1 dans la biogénèse mitochondriale et la régulation du métabolisme énergétique

L'activation de la voie Nrf2 augmente l'expression de HO-1. L'activité de cette enzyme génère de l'oxyde de carbone (CO), responsable de l'augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondrial. Cette production de CO accroît également la production de H₂O₂ par les mitochondries, ce qui active la voie Akt. Cette dernière inhibe GS3K β , protéine impliquée dans l'inhibition de la translocation nucléaire de Nrf2 ^{227,228}. L'activation de cette voie induit également l'expression du gène NRF1 (pour *Nuclear Respiratory Factor-1*), dont le promoteur contient 4 séquences ARE. La phosphorylation de NRF1 par Akt permet son accumulation dans le noyau et la transcription de gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale, tels que Tfam (pour *mitochondrial transcription factor A*) (Figure 34) ²²⁸⁻²³⁰. De plus, l'activation de la voie Nrf2 induit l'expression de PGC1 α , notamment grâce à l'inhibition de sa dégradation par NQO1 ²³¹. D'une part, l'accumulation nucléaire de PGC1 α induit l'expression de Tfam et donc la biogénèse mitochondriale (Figure 34) ^{228,232}. D'autre part, PGC1 α induit la transcription de NRF1, qui induit à son tour la transcription de Tfam ^{233,234}.

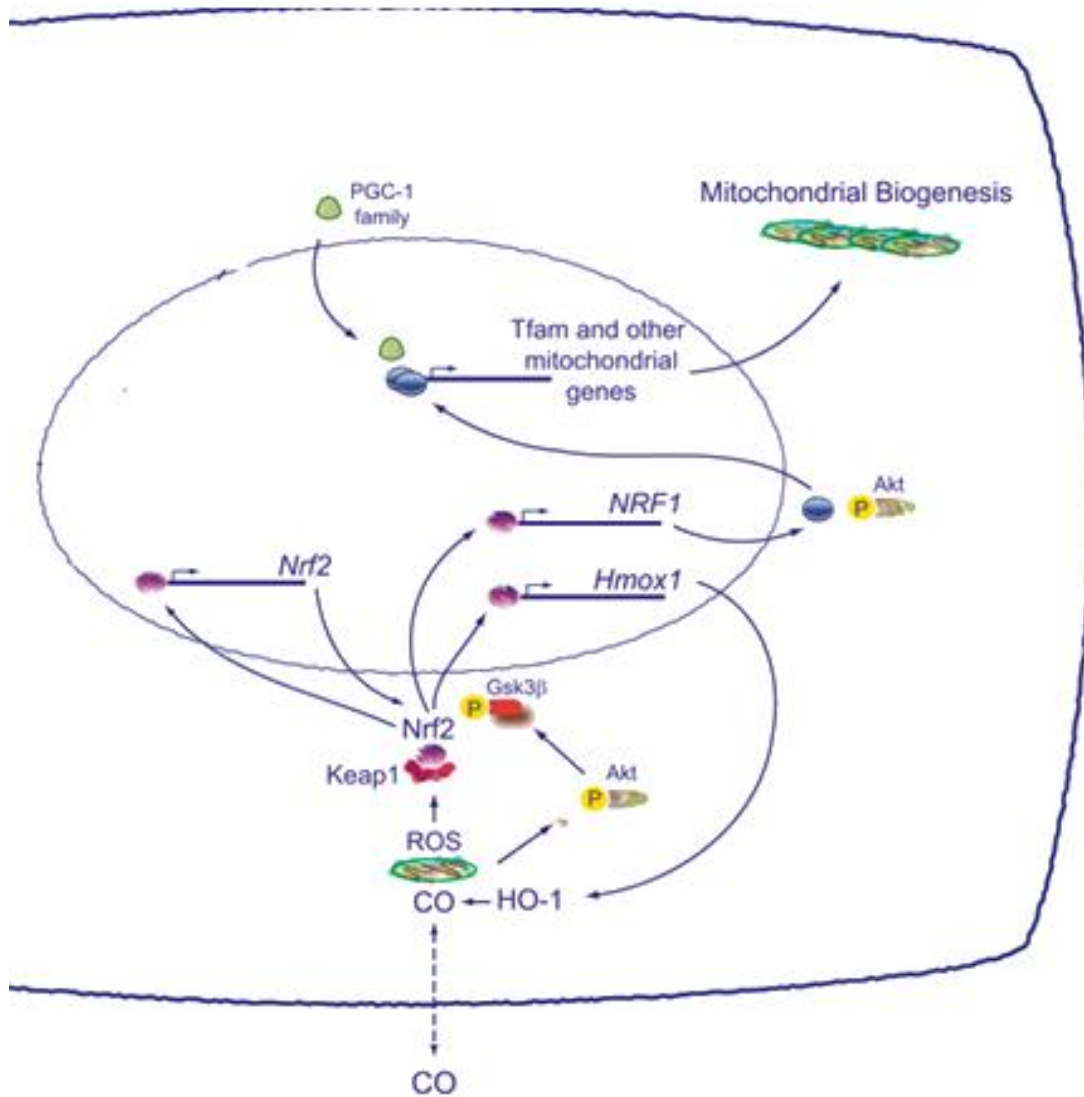


Figure 34 : Activation de la biogénèse mitochondriale par Nrf2 (adaptée de ²²⁸)

Nrf2 inhibe la lipogénèse en inhibant l'ATP citrate synthase, la FAS (pour *fatty acid synthase*) et l'ACC (pour AcetylcoA Carboxylase), enzymes intervenant dans la voie de synthèse des lipides. De plus, l'activation de cette voie diminue l'expression de la pyruvate kinase et donc la synthèse des pyruvates. Les acides gras sont alors utilisés de manière préférentielle pour fournir de l'énergie. C'est pourquoi, Nrf2 pourrait prévenir la prise de poids lors d'une alimentation grasse. Cependant, une autre étude a montré une baisse de l'expression de la pyruvate kinase chez des souris KO Nrf2^{-/-} ²²⁷.

5. Autres implications de la voie de signalisation Nrf2/Keap1

L'activation de la voie Nrf2/Keap1 permet d'inhiber la différenciation des myotubes. Cette dernière est impliquée dans l'atrophie musculaire survenant à la suite de maladies chroniques (cancer, diabète,...) ²³⁵. De plus, Keap1 est capable de se lier à IKK, ce qui permet l'inactivation de la voie pro-inflammatoire NFκB ²¹¹. Nrf2 peut, quant à elle, interférer

directement sur l'activité de JNK2 et inhiber ainsi l'activation de la voie pro-inflammatoire AP-1. Il a également été montré que Nrf2 pouvait réguler négativement l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL6 et TNF- α) et de médiateurs pro-inflammatoires (issues de l'activité de COX2 et iNOS) ²²². Nrf2 a un rôle protecteur sur les neurones dopaminergiques de la substance noire, ce qui prévient la survenue de la maladie de Parkinson ²³⁶. Nrf2 est aussi capable d'inhiber l'activité du promoteur de TGF1 β et l'expression de la fibronectine, ce qui engendre une protection vis à vis de la néphropathie diabétique ²³⁷. Enfin, l'activation de la voie Nrf2 induit l'expression de la protéine Dicer, protéine impliquée dans la biosynthèse des microARNs ²¹⁹.

D. PPAR et stress oxydant

1. PPAR α et stress oxydant

Les fibrates sont capables d'inhiber le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale de manière indépendante de PPAR α , ce qui a pour conséquence d'induire un stress du réticulum endoplasmique et la production d'un stress oxydant. Ce dernier peut être à l'origine de la différenciation des cellules cancéreuses ^{33,238,239}. De plus, le Féno induit un stress oxydant, dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2, responsable d'une déplétion du GSH. Ces événements entraînent un dysfonctionnement mitochondrial et une perturbation de l'homéostasie du Ca²⁺ intracellulaire, responsables de l'induction de la mort cellulaire ²⁴⁰. En revanche, l'agoniste de PPAR α , Wy-14643, induit un stress oxydant important, d'origine mitochondriale, dans les cellules leucémiques ou de cancer pulmonaire. En revanche, il n'induit aucune perturbation du potentiel mitochondrial ou de la viabilité. Cette production d'espèces réactives est indépendante de l'activation du récepteur PPAR α ²³⁹. De plus, les agonistes de PPAR α sont capables d'induire la production de H₂O₂ *via* l'induction de l'acylCoA oxydase ou du cytochrome P450A4 dans le foie de rat ^{69,241}. Le Clofibrate est, quant à lui, capable d'induire la production d'anions superoxydes dans les cellules HepG2 ²⁴². Enfin, Wy-14643 et le Clofibrate, contrairement au Féno, induisent une augmentation de la transcription d'iNOS dans diverses cellules, de manière indépendante de PPAR α ²⁴³. Ce stress oxydant s'accompagne d'une induction de protéines antioxydantes comme la catalase, la SOD et la GPx ^{69,242}.

2. PPAR γ et stress oxydant

a. PPAR γ impliqué dans le système antioxydant

Plusieurs études ont montré que l'activation du récepteur PPAR γ induisait la transcription de Nrf2. En effet, il existe une séquence PPRE au sein du promoteur du gène Nrf2 ²⁴⁴⁻²⁴⁶. Ainsi,

Introduction

différentes TZD induisent l'expression de GSTA2 ou de HO-1, suite à la fixation de PPAR γ sur les séquence PPRE, présentes au sein de leur promoteur respectif, mais également suite à l'induction de Nrf2 (Figure 35)^{245,247}.

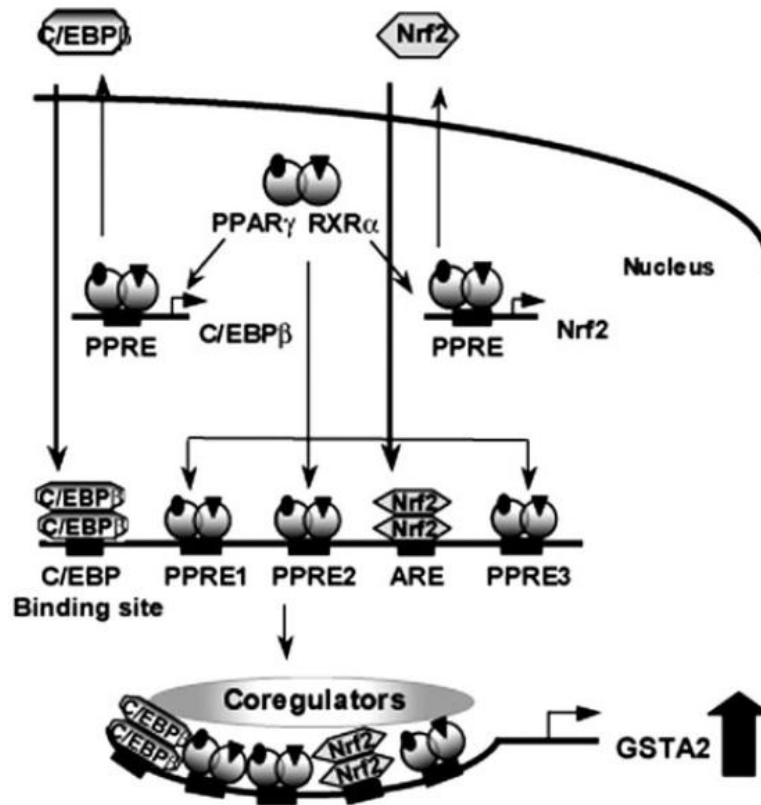


Figure 35 : Induction de l'expression de GSTA2 par PPAR γ

Si PPAR γ induit l'expression de Nrf2, un mécanisme inverse est également observé²⁴⁸⁻²⁵⁰. Ainsi, il a été montré que PPAR γ était moins exprimé chez les souris KO Nrf2^{-/-} comparé à son expression chez les souris WT Nrf2^{+/+}²⁴⁸. En effet, il existe une séquence ARE (-784/-764) dans le promoteur de PPAR γ , critique pour la régulation de PPAR γ par Nrf2²⁴⁹.

La SOD est également un gène cible de PPAR γ . Effectivement, une diminution de son expression est observée dans le cœur de souris n'exprimant pas PPAR γ dans cet organe, provoquant une hypertrophie cardiaque²⁵¹. Les TZD sont également capables d'induire la GPx3 dans le muscle squelettique humain, de manière dépendante de PPAR γ . L'induction de cette enzyme provoque une réduction du niveau extracellulaire de H₂O₂²⁵². Il a été montré que les agonistes de PPAR γ entraînaient une baisse de l'expression de l'enzyme pro-oxydante iNOS²⁵³⁻²⁵⁶, ainsi qu'une hausse de UCP2 (pour *Mitochondrial uncoupling protein 2*), protéine qui prévient l'accumulation de O₂⁻ dans la mitochondrie^{253,257}. Il existe également une régulation de COX2 par PPAR γ . Néanmoins, l'influence de PPAR γ sur l'expression de COX2 varie en fonction des types cellulaires^{246,258-260}. Les diminutions d'expression de

COX2 et d'iNOS pourraient être expliquées par l'inhibition de NFκB par PPARγ, puisque NFκB est impliqué dans l'expression de ces deux enzymes. De même, la ΔPGJ2 augmente l'expression de COX2 dans les cellules MCF7 *via* l'activation des voies Akt et AP-1, selon un mécanisme dépendant des ROS ²⁶¹. Enfin, PPARγ peut également provoquer un accroissement de l'expression de la catalase, suite à la fixation du récepteur sur une séquence PPRE présente au sein de son promoteur ²⁶².

En fonction du type cellulaire et de la dose, la ΔPGJ2 est capable d'activer la voie antioxydante Nrf2/Keap1 en se liant de manière covalente à Keap1 (Cys 151, 273 et 288 ; Figure 36). L'implication de la ΔPGJ2, dans cette voie, est donc indépendante du récepteur PPARγ.

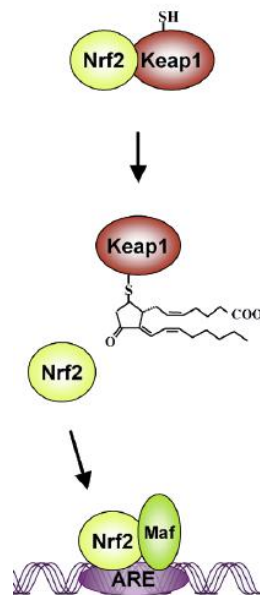


Figure 36 : Implication de la ΔPGJ2 dans la voie de signalisation anti-oxydante Nrf2 ³⁹

L'activation de cette voie par la ΔPGJ2 entraîne une augmentation de l'expression de la GCL et de la GR, permettant une hausse du contenu en glutathion. La ΔPGJ2 induit également l'expression de la protéine antioxydante HO-1 ^{263–265}.

b. Les agonistes de PPARγ inducteurs d'espèces réactives

Les prostaglandines J2 représentent d'importants inducteurs de production de ROS, et donc de cytotoxicité, dans certains types cellulaires ²⁶⁶. Le stress oxydant induit par cette molécule est associé à une accumulation de protéines oxydées, impliquées dans diverses fonctions biologiques. Ainsi, la ΔPGJ2 peut altérer le statut redox des cellules en modifiant des protéines antioxydantes, comme les thioredoxines, la thioredoxine réductase ou la glutathion peroxydase ³⁹. Le traitement par les TZD entraîne également un dysfonctionnement mitochondrial, après liaison avec la protéine membranaire mitochondriale Mitoneet, qui

Introduction

bloque la respiration. Cet effet s'accompagne de la production de ROS, de l'augmentation de la glycolyse anaérobie et d'une diminution de la production d'ATP (Figure 37)^{55,267}. Selon un mécanisme indépendant de PPAR γ impliquant les ROS, les TZD et la Δ PGJ2 induisent l'activation de la cascade MAPK (Erk, JNK, p38MAPK) pouvant entraîner un arrêt du cycle cellulaire ou une apoptose²⁶⁸.

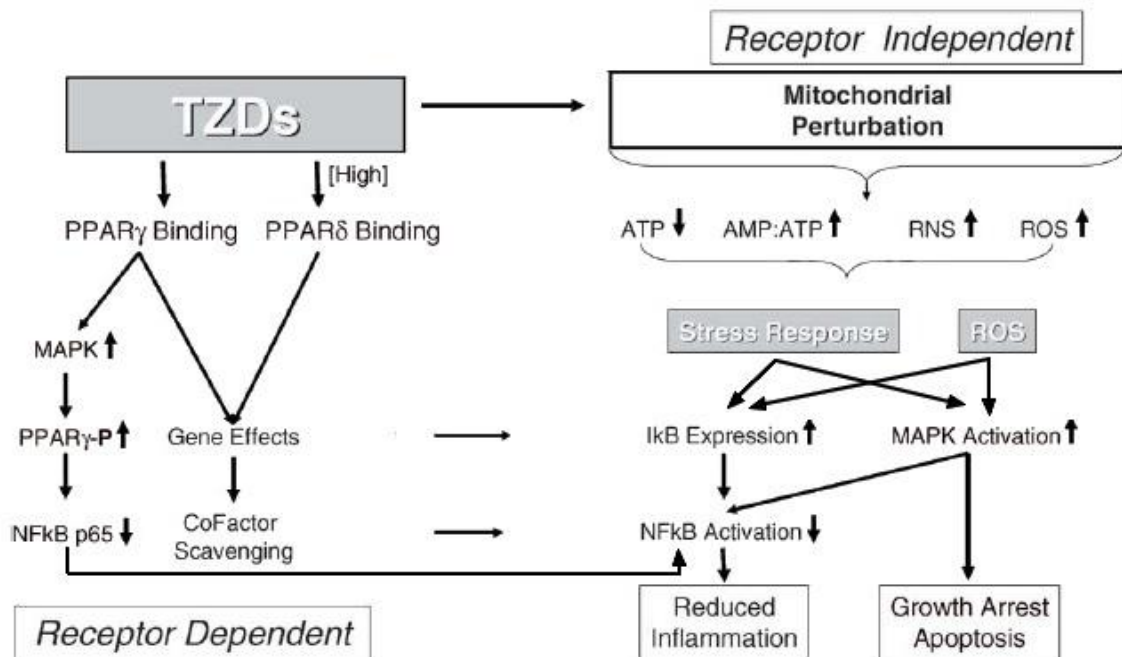


Figure 37 : Actions des TZD, dépendantes ou indépendantes des récepteurs PPAR⁵⁵

Les TZD diminuent l'expression de p65, selon un mécanisme dépendant du PPAR γ (Receptor Dependent), ce qui entraîne une baisse de l'activation de NF κ B (NF κ B Activation) et donc une réduction de l'inflammation (Reduced Inflammation). L'inhibition de cette voie peut également être due à une augmentation de l'expression d'I κ B ou à une séquestration des co-facteurs de NF κ B (CoFactor Scavenging), suite à l'activation de certains gènes, en réponse à la liaison (Binding) des TZD avec PPAR γ , ou avec PPAR δ , si une forte concentration en TZD. Ces dernières peuvent également provoquer un dysfonctionnement mitochondrial (Mitochondrial Perturbation), selon un processus indépendant du récepteur (Receptor Independent). Il en résulte une diminution de production d'ATP et une hausse de la production d'espèces réactives (ROS et RNS). La réponse au stress (Stress Response) et les ROS qui en découlent vont provoquer un arrêt de la croissance cellulaire (Growth Arrest) et une apoptose (Apoptosis), mais également une réduction de l'inflammation (Reduced inflammation).

Les traitements par les TZD peuvent également induire l'apoptose des cellules cancéreuses *via* une production de ROS. Cette dernière peut notamment s'effectuer par l'intermédiaire de l'activation de POX. L'induction de cette dernière peut être dépendante du récepteur PPAR γ , puisque son promoteur contient une séquence PPRE, mais également indépendante du récepteur par l'intermédiaire de p53^{129,269,270}.

De plus, il a été montré que la Δ PGJ2 était capable de se lier au GSH selon une réaction d'addition de Michael. C'est pourquoi, le niveau de conjugaison non enzymatique est important. Δ PGJ2 induit parallèlement l'expression de GST π , qui augmente le niveau de cette conjugaison. Cette dernière s'effectue uniquement au niveau du carbone 9 électrophile. Cet

adduit est ensuite exporté dans le milieu extracellulaire grâce aux protéines MRP1. Il s'en suit une diminution du GSH intracellulaire, qui entraîne un stress oxydant et un rétrocontrôle positif pour accroître sa synthèse. Une fois dans le milieu extracellulaire, le conjugué est dissocié et la Δ PGJ2 lipophile traverse à nouveau la membrane cellulaire (Figure 38)²⁷¹. Dans tous les cas, la liaison de Δ PGJ2 avec le GSH ou les GSTs provoque une séquestration de la prostaglandine dans le cytoplasme empêchant l'activation de PPAR γ ²⁷².

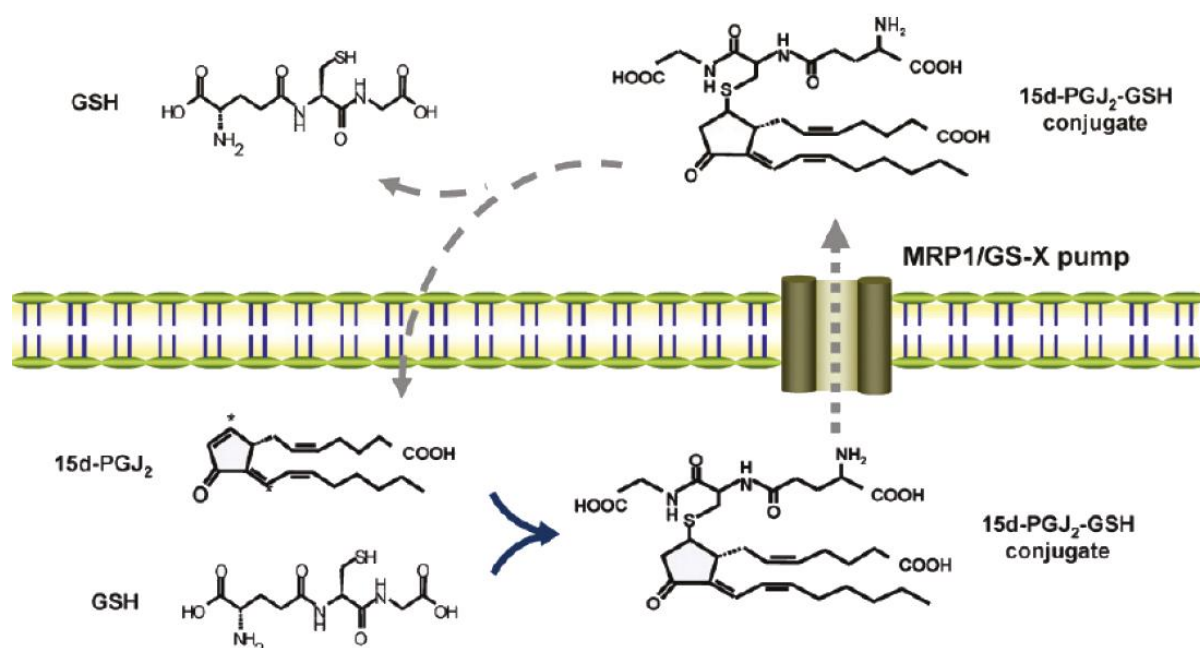


Figure 38 : Conjugaison de la Δ PGJ2 avec le GSH et efflux de l'adduit par MRP1²⁷¹

Enfin, les TZD seraient capables de réduire le taux de GSH *via* la formation d'un adduit avec ce dernier. Ces adduits ont été observés dans les microsomes hépatiques chez le chien, chez le rat et chez l'Homme. Mais leurs formations nécessitent une métabolisation des TZD, c'est à dire l'ouverture du cycle thiazolidine (Figure 39).

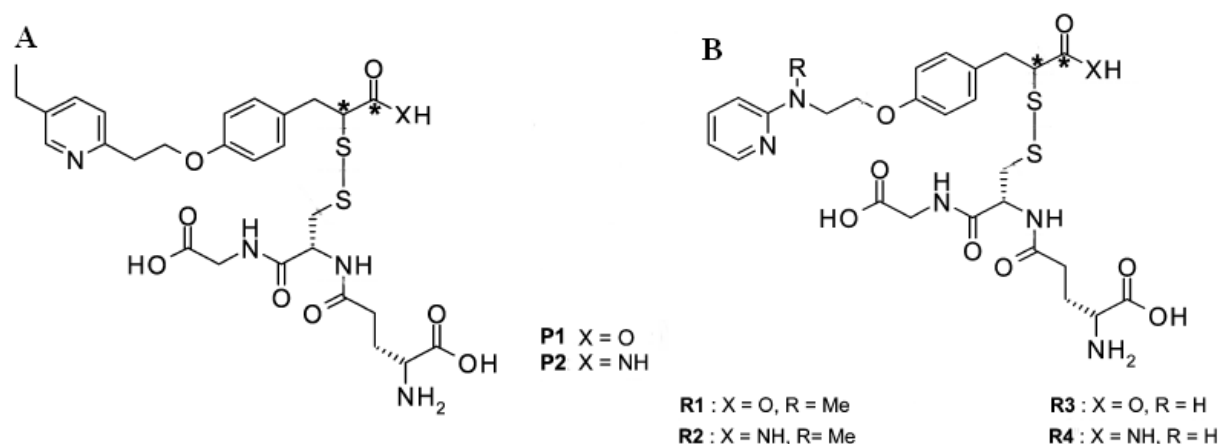


Figure 39 : Adduits Pioglitazone-GSH (A) et Rosiglitazone-GSH (B)²⁷³

Introduction

En revanche, l'adduit prédominant formé entre la Troglitazone et le GSH ne nécessite pas l'ouverture du cycle thiazolidine²⁷³. C'est peut-être pourquoi cet adduit est le seul retrouvé dans les hépatocytes humains²⁷⁴.

V. Les 4-thiazolidinones, des dérivés de TZD, non agonistes de PPAR γ

Les 4-thiazolidinones sont caractérisées par la présence d'un cycle dont la structure est présentée à la Figure 40. Précédemment, il a été montré que l'activation des récepteurs PPAR γ par les TZD nécessitait la présence des deux fonctions cétones au niveau du cycle thiazolidine⁴⁴. La présence d'une seule fonction cétone au niveau de ce cycle laisse penser que les thiazolidinones sont incapables d'activer les récepteurs PPAR γ . Cette hypothèse repose, néanmoins, sur l'absence de pharmacophore spécifique de l'activation de PPAR γ . Cependant, ces composés possèdent, tout de même, des activités anti-cancéreuses.

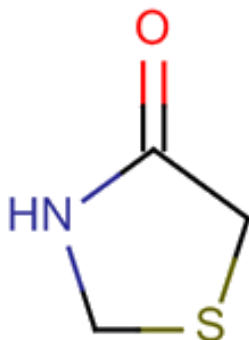


Figure 40 : Structure du cycle 4-thiazolidinone

A. Activité anti-cancéreuse des 4-thiazolidinones

Un dérivé 5-benzylidene-thiazolidinone (Figure 41A) a montré une activité anti-cancéreuse contre les cellules HCT116, MCF7 et MDA-MB435²⁷⁵, tandis qu'un autre (Figure 41B) était efficace à la fois sur les cellules HCT116, MCF7 et HepG2²⁷⁶.

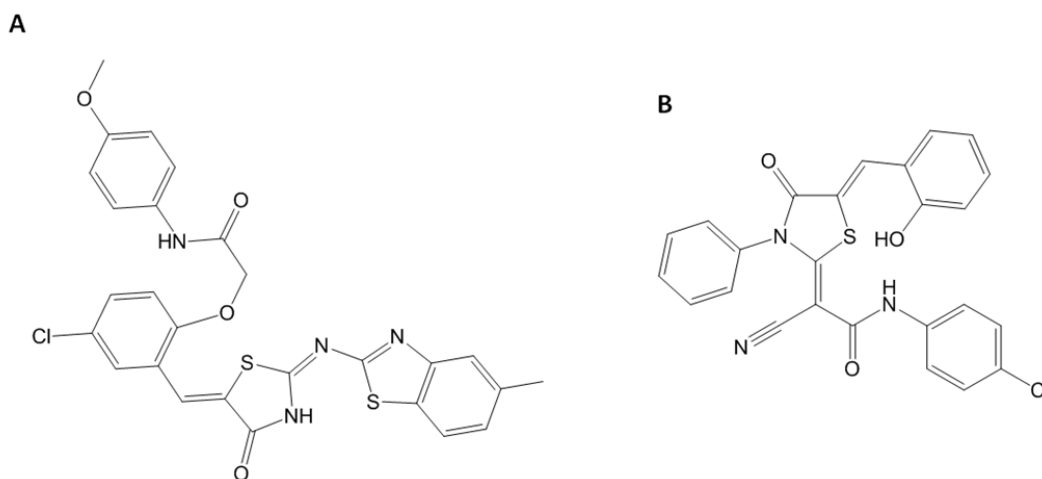


Figure 41 : Structure de dérivés 5-benzylidene-thiazolidinone anti-cancéreux

D'autres dérivés 5-benzylidene-thiazolidinones, analogues du sunitinib (Figure 42), un inhibiteur des récepteurs Tyrosine Kinase (RTK) utilisé en thérapeutique, ont montré leur efficacité sur les cellules cancéreuses HT29, H460 et MDA-MB231 ^{277,278}.

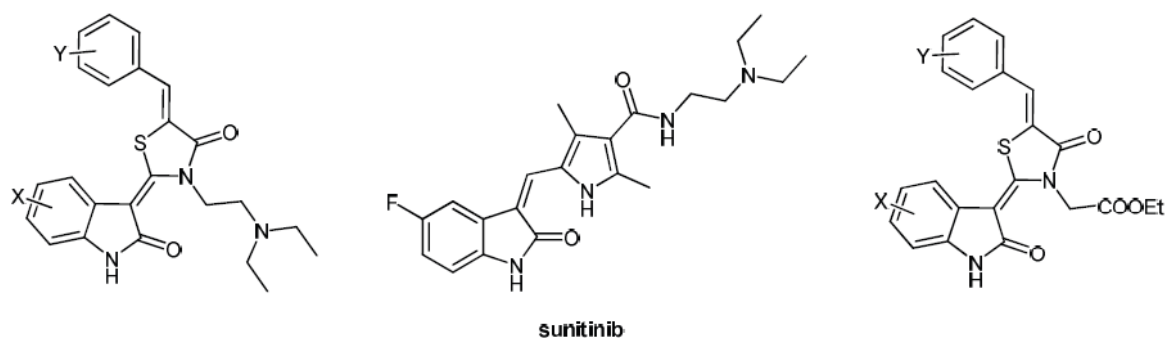


Figure 42 : Sunitinib et analogues en série 4-thiazolidinone

D'autres dérivés 5-benzylidene-thiazolidinones, analogues du sorafenib (Figure 43), un autre inhibiteur de kinases utilisé en thérapeutique, ont également montré leur efficacité anticancéreuse sur plusieurs lignées cellulaires (A540, H460 et HT29) ²⁷⁹.

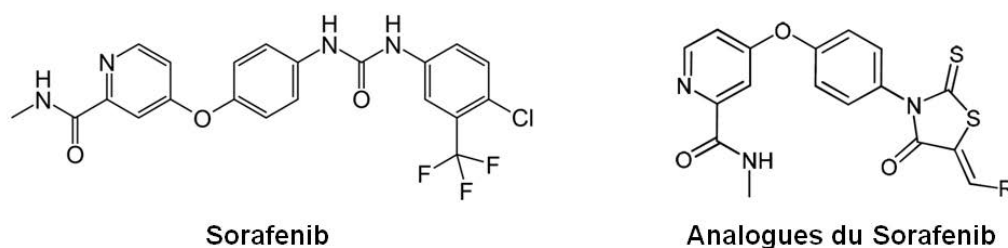


Figure 43 : Sorafenib et analogues en série 4-thiazolidinone

Enfin, il a été montré qu'un dérivé de 4-thiazolidinone (Figure 44) était capable d'inhiber l'arylamine N-acétyl-transférase 1 (NAT1), une enzyme impliquée dans la métabolisation des xénobiotiques. Elle est souvent surexprimée dans les cancers mammaires, c'est pourquoi son inhibition pourrait constituer un traitement pour ce type de cancer ²⁸⁰.

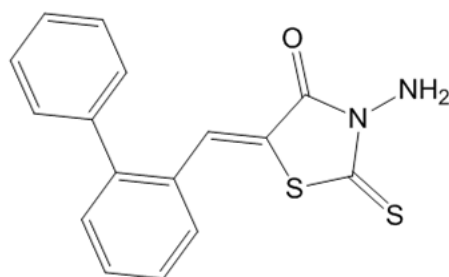


Figure 44 : Dérivé thiazolidinone inhibiteur de NAT1

Mais, d'autres cibles sont impliquées dans l'activité anticancéreuse des thiazolidinones.

1. Inhibition des phosphatases et kinases

La surexpression de PTP1B (pour *protein-tyrosine phosphatase 1B*), phosphatase impliquée dans la déphosphorylation d'une tyrosine spécifique du récepteur à l'insuline, est retrouvée dans certains types de cancers. Son inhibition pourrait donc jouer un rôle anti-tumoral mais pourrait aussi augmenter la sensibilité à l'insuline et la résistance à l'obésité. Une étude a montré qu'un dérivé 5-benzylidene-thiazolidinone (Figure 45A) inhibait fortement PTP1B ($IC_{50} = 1,1 \mu\text{M}$)²⁸¹, inhibition nettement plus importante que celle observée avec la Troglitazone ($IC_{50} \approx 55\mu\text{M}$)²⁸². Ce dérivé est également capable d'inhiber les deux isoformes de la phosphatase LMW-PTP (pour *low molecular weight protein tyrosine phosphatase*), également impliquée dans la régulation négative de la signalisation de l'insuline et dans la carcinogénèse²⁸¹. De plus, un autre dérivé 5-benzylidene-thiazolidinone (Figure 45B) est capable d'inhiber la phosphatase SHP2, dont la surexpression est observée dans différents types de cancers, notamment les leucémies. Enfin, un dérivé 2-indolyl-thiazolidinone (Figure 45C) diminue la croissance des cellules cancéreuses MCF7 et Hela vraisemblablement *via* une inhibition des PTK (pour *protein tyrosine kinase*)²⁸³.

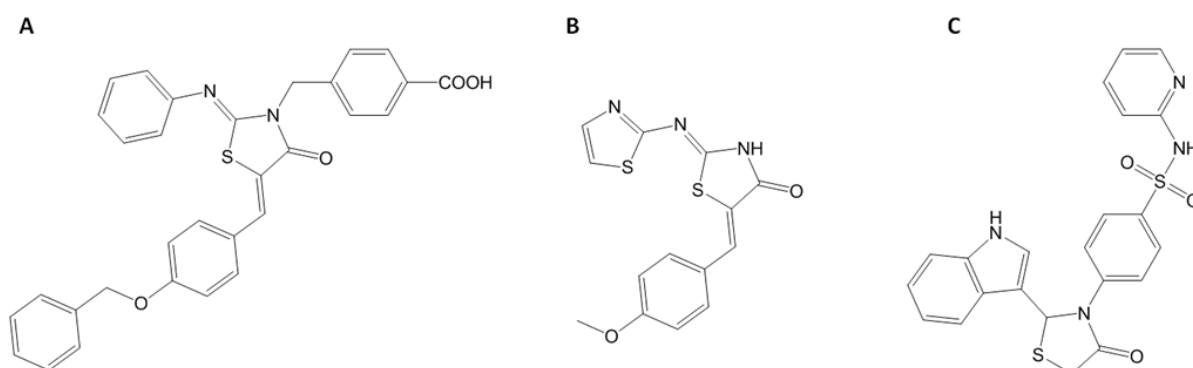


Figure 45 : Dérivés 4-thiazolidinones antagonistes des tyrosine phosphatases et kinases

Enfin, d'autres dérivés 5-benzylidene-thiazolidinone (Figure 46) ont montré une capacité à induire l'apoptose de cellules cancéreuses pulmonaires en activant spécifiquement les protéines JNK²⁸⁴.

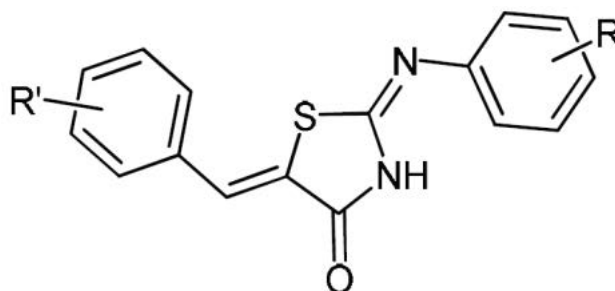


Figure 46 : Dérivés 4-thiazolidinones activateurs des JNK

2. Inhibition des MMPs

Les dérivés de thiazolidinones sont capables d'inhiber les MMPs, protéines souvent impliquées dans l'invasion métastatique. Un de ces dérivés (Figure 47A) inhibe fortement la MMP13 ($IC_{50} = 36nM$)²⁸⁵, tandis qu'un autre de ces dérivés (Figure 47B) inhibe quant à lui la sécrétion de MMP3 dans les chondrocytes²⁸⁶.

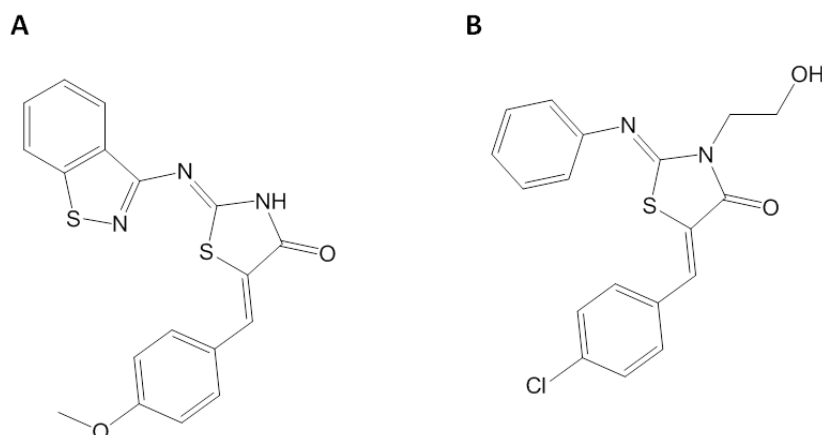


Figure 47 : Dérivés 4-thiazolidinones antagonistes des MMPs

3. Inhibition de COX2

La surexpression de COX2 joue un rôle important dans les phénomènes inflammatoires et la cancérogénèse. Les inhibiteurs de COX2 sont des molécules potentielles pour la prévention et le traitement des cancers, notamment le cancer du colon. Une étude a montré qu'un dérivé de thiazolidinone (Figure 48A) était capable de diminuer fortement la croissance des cellules HT29, exprimant fortement COX2. Cette inhibition de COX2 a également été montrée pour d'autres dérivés de thiazolidinones. En effet, un de ces dérivés (Figure 48B) est capable d'inhiber COX2 avec une IC_{50} proche du micromolaire tout en étant également capable d'inhiber COX1 et LOX, mais d'une manière beaucoup plus limitée²⁸⁷. Un autre dérivé (Figure 48C) inhibe aussi COX2 ($IC_{50} = 14,4\mu M$), tout en inhibant COX1 de manière moins importante ($IC_{50} = 104,7\mu M$). Néanmoins, cette capacité d'inhibition de COX2, et la sélectivité vis-à-vis de COX1, reste moins efficace que l'inhibiteur de référence NS398²⁸⁸.

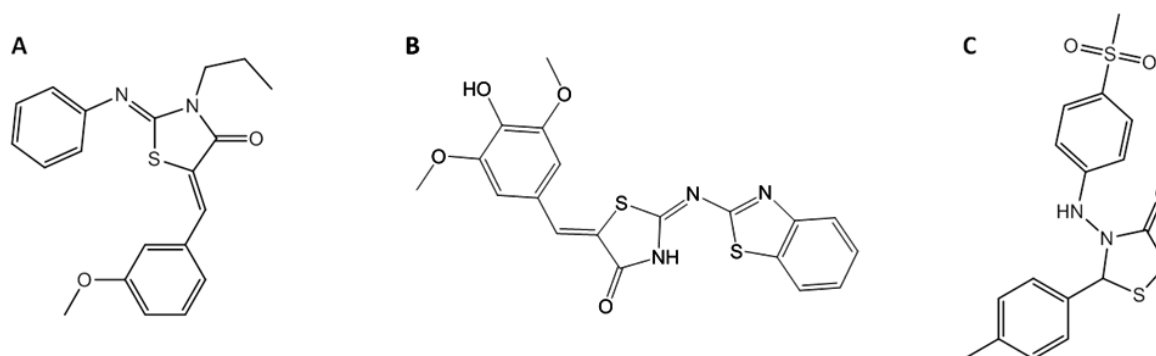


Figure 48 : Dérivés des 4-thiazolidinones antagonistes des COX et LOX

4. Inhibition de l'aldose réductase

ALR2 permet la réduction du glucose en sorbitol en présence de NADPH. La diminution de ce dernier entraîne un dysfonctionnement des enzymes, dont l'activité est dépendante de ce cofacteur, comme les NOS ou la GR. Le dysfonctionnement de ces enzymes engendre un stress oxydant, pouvant être à l'origine de la cancérogénèse. Un dérivé de thiazolidinone (Figure 49A) inhibe ALR2 de manière plus efficace que la molécule de référence utilisée actuellement en thérapeutique, l'épalrestat (Figure 49B)²⁸⁹.

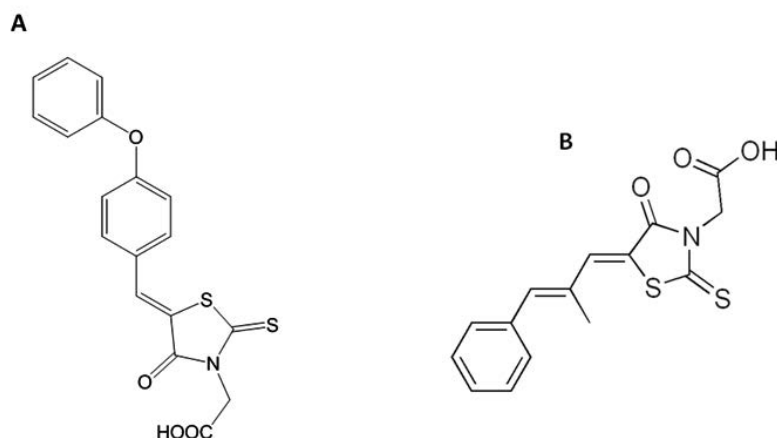


Figure 49 : Dérivés 4-thiazolidinones antagonistes d'ALR2

5. Inhibition de l'angiogénèse

Un brevet a été déposé pour des dérivés thiazolidinones (Figure 50A) capables d'inhiber la production de VEGF. La diminution d'expression de cette protéine, impliquée dans l'angiogénèse, est due à une baisse de sa transcription par HIF1 α (pour *Hypoxia-Inducible Factor*). En effet, ces composés sont responsables de l'inhibition de l'interaction de HIF1 α avec son cofacteur p300²⁹⁰. D'autre part, certains composés (Figure 50B) se sont avérés être des antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, ce qui entraîne un blocage du mécanisme angiogénique²⁹¹.

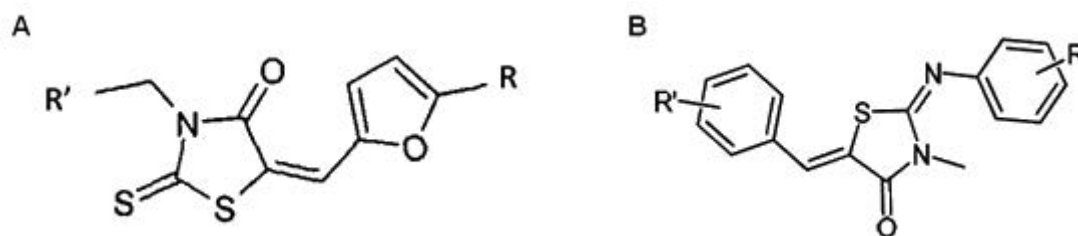


Figure 50 : Dérivés 4-thiazolidinones inhibiteurs d'angiogénèse

B. Autres activités des 4-thiazolidinones

D'autres utilisations des 4-thiazolidinones sont possibles (Tableau 3).

.Activité	Cible	Références
Anti-bactérienne	<i>Staphylococcus aureus</i>	292 293
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	292
	<i>Escherichia coli</i>	293
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	293
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	293 294
Anti-fongique	<i>Rhizopus sp</i>	293
	Large spectre	294 295
Anti-virale	HIV-1	296
Anti-parasite	Strongyloid du cheval	297
Anti-convulsante	Non décrite	297 298
Anti-inflammatoire	TAK1	299
Hypnotique	Non décrite	297
Protection cardiovasculaire	Non décrite	297 300
Activation de récepteur	Récepteur Muscarinique (M1)	301
	Récepteur FSH	297
Inhibition de récepteur	Récepteur Histamine (H1)	297
Inhibition enzymatique	Cathepsine D	302
	PIM	303

Tableau 3 : Autres activités des 4-thiazolidinones

HIV-1: *Human Immunodeficiency Virus*

TAK 1: *Transforming growth factor- β -Activating Kinase 1*, protéine impliquée dans l'inhibition de NF κ B.

FSH: *Follicle Stimulating Hormone* ; PIM: *Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

La cathepsine D est une protéine impliquée dans la synthèse de β -amyloïde. Son inhibition pourrait donc constituer une possibilité de traitement de la maladie d'Alzheimer.

VI. Métabolique et Cancer

A. Les principales voies métaboliques

Uniquement les voies métaboliques intéressantes dans le cadre de ce travail seront détaillées. Les cellules cancéreuses sont en prolifération constante et utilisent principalement le glucose, *via* la glycolyse, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, pour apporter l'énergie nécessaire à la synthèse de leurs composants cellulaires (lipides, acides aminés et nucléotides). Contrairement à la plupart des cellules normales, la majorité des lipides tumoraux sont synthétisés *de novo*. La néoglucogénèse, tout comme la dégradation des lipides et des acides aminés pour un apport énergétique, est minoritaire, voire inexistante, dans les cellules cancéreuses.

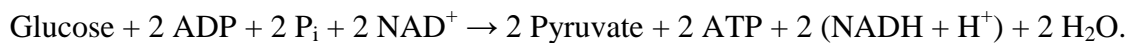
Le point commun de toutes les voies métaboliques est leur dépendance vis-à-vis des transporteurs d'électrons et des coenzymes, notamment le Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD⁺) et le coenzyme A (CoA). Le NAD⁺ est synthétisé à partir du nicotinate et sa phosphorylation aboutit à la formation de NADP⁺, également très important pour le

Introduction

métabolisme cellulaire. Ces derniers pourront être réduits en NADH ou NADPH. Le CoA est, quant à lui, synthétisé à partir de la vitamine B5 (ou acide panthothénique), et il assure le transport des groupements acyles³⁰⁴.

1. La glycolyse

La glycolyse s'effectue dans le cytoplasme et correspond à l'oxydation du glucose en pyruvate. Cette oxydation s'accompagne d'une synthèse d'ATP, qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire. Pour cela, le glucose est importé dans la cellule par le transporteur membranaire GLUT1 (pour *Glucose Transporter 1*). Au sein du cytoplasme, il va subir plusieurs réactions enzymatiques, afin d'aboutir à la formation de pyruvate (Figure 51). Le bilan de la glycolyse se résume par la réaction suivante :



En absence d'oxygène, le pyruvate est transformé en lactate par la LDH (pour *Lactate Déshydrogenase*). On parle alors de glycolyse anaérobie³⁰⁵.

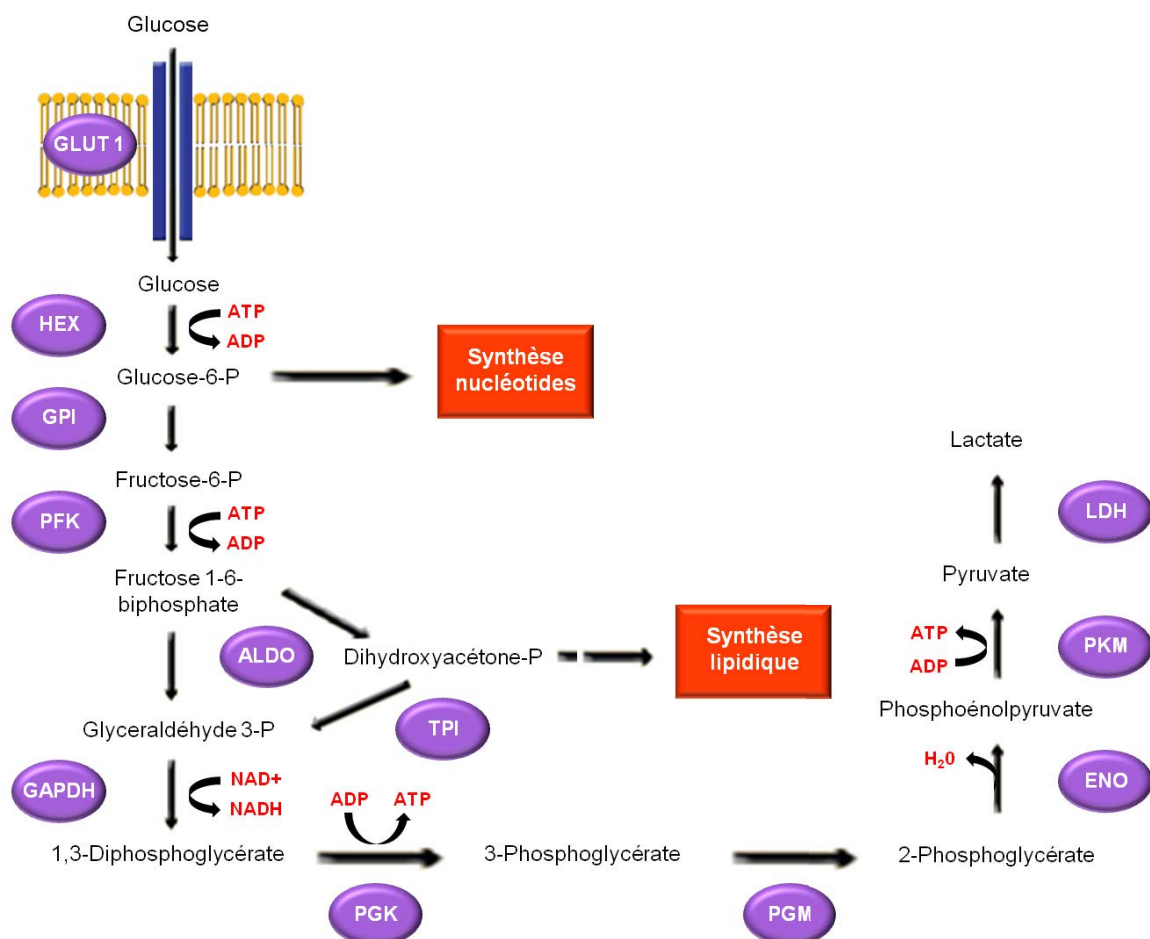


Figure 51 : La glycolyse anaérobie (Adaptée de³⁰⁵)

GLUT1 : Glucose Transporter 1 ; HEX : Hexokinase ; GPI : Glucose-6- Phosphate Isomérase ; PFK : PhosphoFructoKinase ; ALDO : Aldolase ; TPI : TriosePhosphate Isomérase ; GAPDH : Glyceraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase ; PGK : PhosphoGlycerate Kinase ; PGM : PhosphoGlucoMutase ; ENO : Enolase ; PKM : Pyruvate Kinase ; LDH : Lactate Déshydrogénase.

La glycolyse est reliée à d'autres voies métaboliques. En effet, le Glucose-6-P peut approvisionner la voie des pentoses phosphates, qui sera décrite ultérieurement, pour induire la synthèse des nucléotides. De plus, le Dihydroxyacétone-P peut être transformé en Glycerol-3-P, puis en Glycérol suite à l'action successive de la GPD (pour *Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase*) et de la GK (pour *Glycerol Kinase*). Le glycérol sera ensuite utilisé pour synthétiser des lipides.

2. Le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative

En présence d'oxygène, le pyruvate est transporté dans la mitochondrie où il est métabolisé en oxaloacétate par la Pyruvate Carboxylase (PC) ou en Acétyl-CoA par la PDH (pour *Pyruvate DeHydrogenase*). La PDH peut être inhibée par la PDK (pour *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*). L'Acétyl-CoA peut servir de précurseur à la synthèse des acides gras, mais il peut aussi alimenter le cycle de Krebs, également appelé cycle des acides tricarboxyliques (TCA ; Figure 52). Après diverses métabolisations, l'oxaloacétate est régénéré en ayant permis la production de cofacteurs (NADH, H⁺ et CoQH₂). Néanmoins, si la malate déshydrogénase (MDH) est inhibée, en raison d'un taux de NADH ou d'oxaloacétate trop élevé, l'enzyme malique mitochondriale (ME) produit du pyruvate à partir du malate afin de relancer le cycle de Krebs ³⁰⁵.

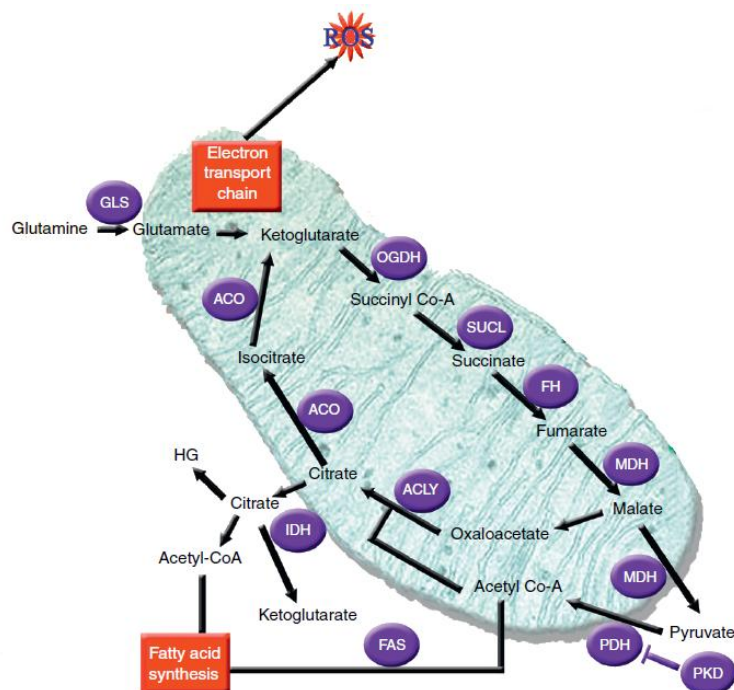


Figure 52 : Le cycle de Krebs ³⁰⁵

PC : Pyruvate Carboxylase ; PDH : Pyruvate DésHydrogenase ; PDK : Pyruvate Déshydrogenase Kinase
 ACLY : ATP-citrate synthase ; ACO : Aconitase ; IDH : Isocitrate DésHydrogenase ; GLS : Glutaminase ;
 OGDH : 2-OxoGlutarate DeHydrogenase ; SUCL : succinyl-CoA synthase ; SDH : Succinate DeHydrogenase ;
 FH : fumarate hydratase ; MDH : Malate DésHydrogenase ; ME : Enzyme malique ; *Electron transport chain* :
 chaîne de transport des électrons ; *Fatty acid synthesis* : Synthèse des acides gras.

Introduction

Le cycle de Krebs peut aussi être alimenté au niveau de l' α -cétoglutarate. En effet, ce dernier peut être synthétisé grâce à la métabolisation de la glutamine en glutamate, par la Glutaminase (GLS) ³⁰⁵.

Au final, le cycle de Krebs ne produit qu'un seul équivalent ATP (une molécule de GTP), lors de l'étape de transformation du Succinyl-CoA en Succinate. L'essentiel de l'énergie chimique potentielle produite existe sous forme de pouvoir réducteur : 3 NADH, H⁺ et 1 CoQH₂ (Ubiquinone réduite). Ce pouvoir réducteur est ultérieurement utilisé pour produire de l'ATP, dans la chaîne respiratoire mitochondriale ³⁰⁴. Cette dernière est constituée de plusieurs complexes de protéines membranaires de la mitochondrie (Complexe I, II, III et IV), qui servent à réoxyder les coenzymes NADH et ubiquinone (CoQ). Cette oxydation s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons. Ce dernier va être utilisé par l'ATP synthase afin de synthétiser de l'ATP (Figure 53) ³⁰⁴.

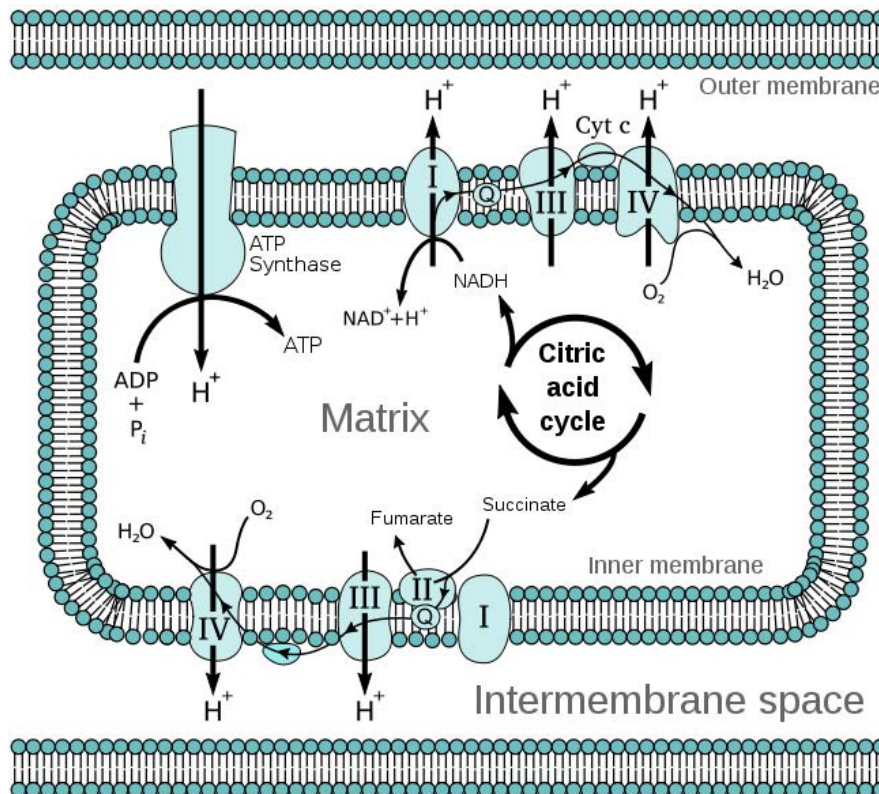
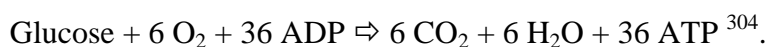


Figure 53 : La chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie

La chaîne respiratoire va également être à l'origine d'une production d' O_2^- . L'oxydation du glucose en présence d'oxygène est appelée glycolyse aérobie. Son bilan est :



La β -oxydation des acides gras fournit également de l'AcétylCoA, qui peut alimenter le cycle de Krebs pour fournir de l'ATP ³⁰⁴.

3. La voie des pentoses phosphates

Toutes les réactions de la voie des pentoses phosphate se déroulent dans le cytosol. La première phase est oxydative. Le Glucose-6-phosphate, issu des premières étapes de la glycolyse, est métabolisé en Ribulose-5-phosphate. Cette métabolisation nécessite plusieurs étapes enzymatiques, qui permettent la synthèse de NADPH. Ce dernier est nécessaire à la réduction du GSSG et à certaines biosynthèses réductives, comme la synthèse des acides gras. L'enzyme clé de cette phase est la Glucose-6-phosphate-déshydrogénase (G6PDH), dont l'activité varie en fonction de la disponibilité en NADPH (Figure 54) ³⁰⁴.

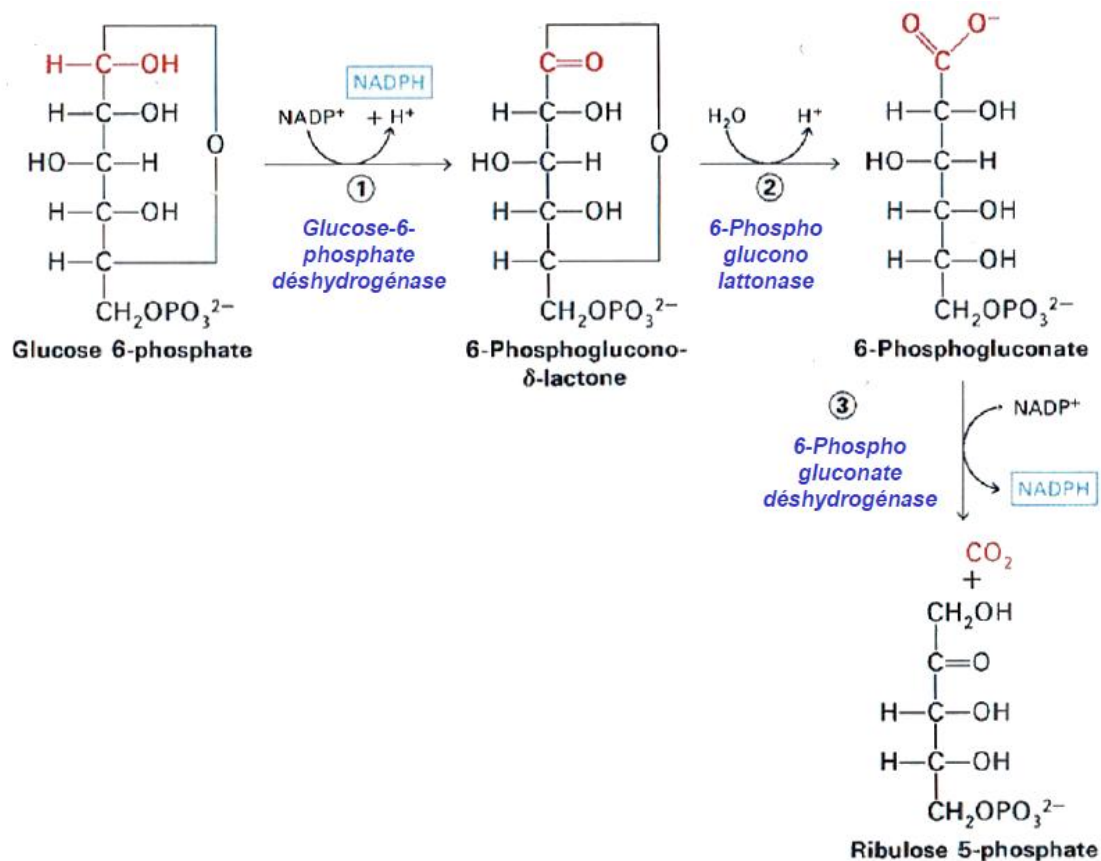


Figure 54 : Etapes de la phase oxydative de la voie des pentoses phosphates

Le Ribulose-5-phosphate est isomérisé par la pentose-5-phosphate isomérase en Ribose-5-phosphate. Ce dernier permettra la synthèse d'ARN, d'ADN et de cofacteurs contenant des nucléotides.

La deuxième phase de la voie des pentoses phosphate est non oxydative. Elle permet la production de Glyceraldéhyde-3-phosphate et de Fructose-6-phosphate à partir du Xylulose-5-phosphate et du Ribose-5-phosphate (Figure 55). Toutes ces réactions sont réversibles. De ce fait, dans les cellules en prolifération qui ont de grands besoins en nucléotides, le Glyceraldéhyde-3-phosphate et le Fructose-6-phosphate peuvent permettre la synthèse de Ribose-5-phosphate. En revanche, ce mode de synthèse ne fournira aucun NADPH.

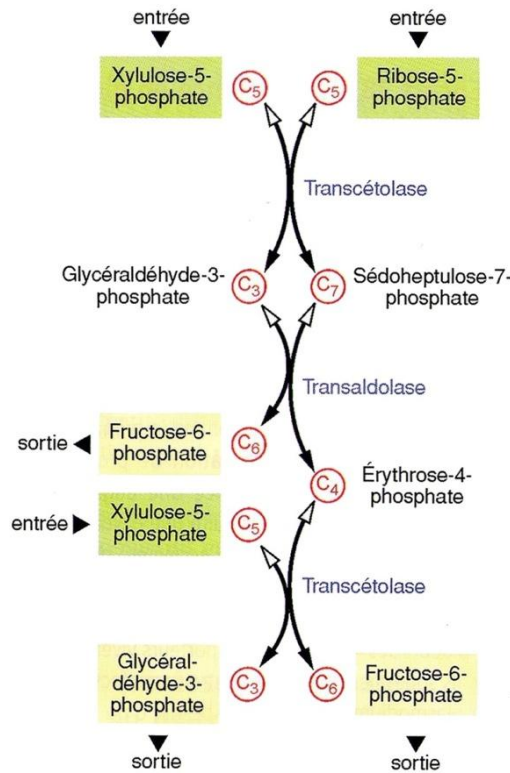


Figure 55 : Etapes de la phase non oxydative de la voie des pentoses phosphates ³⁰⁴

4. La lipolyse

Les triglycérides sont transformés en acides gras suite à l'action de la lipase. La première étape de la β -oxydation des acides gras s'effectue dans le cytoplasme, au niveau de la membrane externe mitochondriale, où se situe l'AcylCoA synthétase. Les acides gras saturés (à n carbones) sont ainsi transformés en AcylCoA (à n carbones). L'AcylCoA est transféré dans la mitochondrie grâce à l'acylcarnitine transférase et à l'acylcarnitine translocase (Figure 56), où il sera déshydrogéné en Trans-déhydroacylCoA (à n carbones ; ou Trans- Δ^2 -EnoylCoA), par l'AcylCoA oxydase ³⁰⁴.

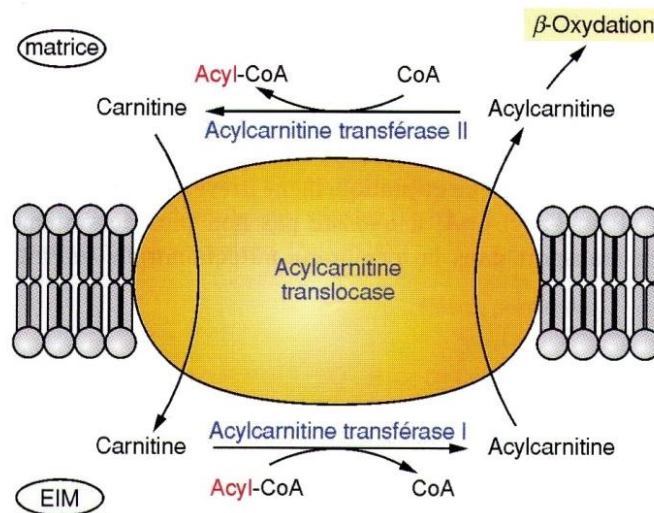


Figure 56 : Transfert de l'AcylCoA dans la mitochondrie ³⁰⁴

L'Acyl-CoA (à n carbones) va alors subir diverses transformations enzymatiques, afin d'aboutir à la production d'un Acétyl-CoA et d'un Acyl-CoA (à $n-2$ carbones). Ce dernier subira à nouveau les mêmes métabolisations, appelées hélice de Lynen. Ainsi, un acide gras à 18 carbones va fournir 9 Acétyl-CoA, qui vont alimenter le cycle de Krebs pour fournir de l'ATP (Figure 57) ³⁰⁴.

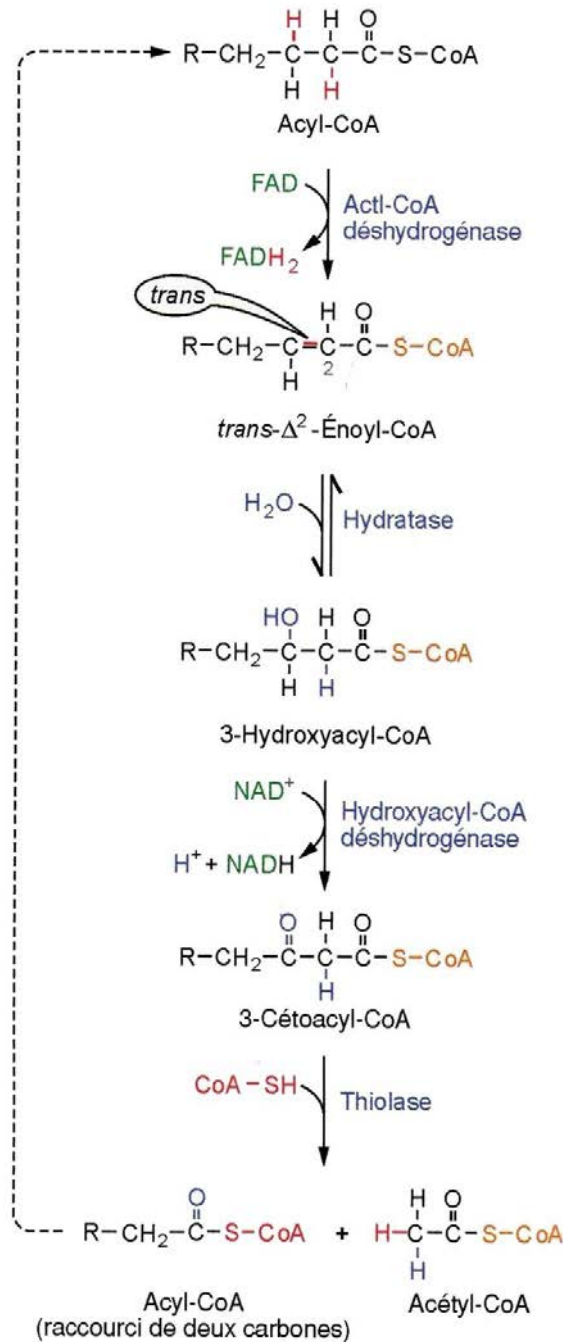


Figure 57 : L'hélice de Lynen ³⁰⁴

La dégradation des acides gras insaturés ou à nombre impair de carbones utilisent des variantes de la β-oxydation. Deux enzymes supplémentaires sont nécessaires pour la β-oxydation des acides gras insaturés : la cis-Δ³-énoylCoA isomérase et la 2,4-diénoyl-CoA

Introduction

réductase. En revanche, la β -oxydation des acides gras à nombre impair de carbones est identique à celle des acides gras à nombre pair, hormis au moment de la dernière étape où il y a formation d'Acétyl-CoA et de Propionyl-CoA. Ce dernier peut être converti en SuccinylCoA, par carboxylation et isomérisation, qui sera utilisé dans le cycle de Krebs.

B. Le métabolisme, pilote du devenir cellulaire

1. Métabolisme et cycle cellulaire

Avant de se diviser, la cellule doit s'assurer qu'elle possède l'énergie nécessaire pour répliquer l'ADN. Le statut métabolique joue donc un rôle considérable dans le processus de division. Ainsi, un haut niveau de Fructose-2,6-Biphosphate, reflet du niveau de glucose, permet la progression du cycle cellulaire en mitose. Par ailleurs, une surexpression de la 6-phospho-fructo-2-kinase augmente la prolifération cellulaire grâce à la surexpression de la cycline D3.

Les cyclines D régulent le passage en phase S du cycle cellulaire. La cycline D1 inhibe de nombreux gènes-cibles impliqués dans la glycolyse (PK, Hexokinase 2), la lipogénèse (FAS et ACC) ou l'activité mitochondriale. En réduisant ainsi l'activité métabolique, elle évite une réinitiation de la phase G1 avant le passage en phase S. Par la suite, l'expression de la cycline D1 diminue en phase S, afin d'augmenter la disponibilité des intermédiaires métaboliques, qui apportent l'énergie nécessaire à la réplication de l'ADN.

Une baisse de la production d'ATP mitochondrial engendre une diminution de l'expression de la cycline E. Il s'en suit un arrêt entre la phase G1 et la phase S, jusqu'à la restauration du niveau d'ATP. L'Acetyl-CoA cytosolique influence l'activité de l'histone acyl transférase, qui permet l'acétylation de l'ADN et donc une modification de sa structure. La réplication de l'ADN est alors possible, le cycle cellulaire progresse vers la phase S³⁰⁶.

2. Métabolisme et mort cellulaire

Les cellules avec une forte activité métabolique sont plus résistantes aux stimuli apoptotiques. En effet, un haut niveau de glucose inhibe l'expression de PUMA (pour *p53 upregulated modulator of apoptosis*) médiée par p53, ce qui contribue à inhiber l'apoptose. De plus, le glucose est capable d'inhiber la protéine pro-apoptotique Bad *via* la voie Akt. En revanche, suite à une diminution du niveau de glucose, p53 est phosphorylé par AMPK, ce qui induit un arrêt en phase G1/S. Si le niveau bas de glucose persiste pendant une période prolongée, la cellule s'orientera vers la sénescence non répliquative, caractérisée par l'expression de la β -galactosidase³⁰⁶.

Une réduction du glucose entraîne également une baisse de la production de NADPH par la

voie des pentoses phosphates, ce qui active la caspase 2, une protéine effectrice de l'apoptose. De plus, l'interaction de l'hexokinase 2 avec la protéine mitochondriale VDAC (pour *voltage-dependent anion channel*) est importante pour la fonction mitochondriale et la survie cellulaire. Le détachement mitochondrial de l'hexokinase 2 permet également l'activation de la caspase 2³⁰⁶.

3. Métabolisme et autophagie

Une déplétion en nutriments peut entraîner une autophagie non sélective grâce à une activation d'Akt. La dégradation des organelles permet d'apporter des acides aminés, des lipides, des nucléosides et des carbohydrates, nécessaires au métabolisme en absence de nutriments³⁰⁷.

4. Métabolisme et stress oxydant

En présence d'un stress oxydant, le métabolisme des carbohydrates est réorienté de la glycolyse vers la voie des pentoses phosphates, notamment par l'inhibition de la GAPDH. La protéine ATM (pour *Ataxia Telangiectasia Mutated*) régule ce *shift* métabolique. En effet, la présence de ROS active le composé redox sensible ATM, qui permet le recrutement de Hsp27 au niveau de la G6PDH. La formation de ce complexe accroît l'activité de la G6PDH, l'enzyme clé de la voie des pentoses phosphates. Cette voie permet la synthèse de NADPH, impliqué dans la réduction du GSH, et la synthèse de Ribose-5-Phosphate, impliqué dans la synthèse des nucléotides. Ainsi, ATM permet de lutter contre le stress oxydant en réduisant le GSSG en GSH, et de prévenir les dommages à l'ADN en synthétisant des nucléotides. ATM joue également un rôle dans la réparation de l'ADN et dans le cycle cellulaire³⁰⁸.

C. Altération du métabolisme dans les cellules cancéreuses : l'effet Warburg

1. Définition de l'effet Warburg

Les cellules tumorales sont des cellules parasites dont la seule fonction est de proliférer au dépend de son hôte. Le rôle du glucose est très important dans la lipogenèse et la synthèse protéique. Les cellules tumorales favorisent la transformation du glucose en lactate, même en présence d'oxygène. Ce phénomène est appelé glycolyse anoxique ou effet Warburg. La production d'ATP glycolytique augmente considérablement la consommation de glucose, puisqu'elle ne produit que 2 ATP par molécule de glucose. Mais cette voie a l'avantage de produire de l'ATP nettement plus rapidement que la phosphorylation oxydative³⁰⁹.

Les cellules tumorales utilisent aussi fréquemment la Glutamine comme source de carbone secondaire. En effet, la Glutamine est métabolisée en Glutamate, puis en α -Cétoglutarate. Ce dernier peut être utilisé pour réapprovisionner les intermédiaires du cycle de Krebs,

Introduction

notamment l'Oxaloacétate ou le Malate, pour régénérer le Pyruvate *via* l'enzyme malique^{310,311}. Enfin, les tumeurs invasives coliques et urothéliales sont corrélées à une surexpression de TKTL1 (pour *Transketolase-like protein 1*). Cette protéine régule la partie non oxydative de la voie des pentoses phosphates, et relie cette dernière à la glycolyse. Sa surexpression entraîne donc une hausse de la glycolyse et contribue à l'effet Warburg³¹².

Les particularités métaboliques des cellules cancéreuses pourraient fournir des cibles thérapeutiques potentielles. Il a déjà été montré que le passage forcé des cellules cancéreuses vers un métabolisme aérobie permettait de diminuer leur croissance³⁰⁵.

2. Implication des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs

a. HIF-1

Les tumeurs, surtout les tumeurs solides, se caractérisent par un phénomène d'hypoxie, en raison d'une mauvaise angiogenèse. Les événements induits par l'hypoxie dépendent largement de l'activité du régulateur transcriptionnel HIF-1, stabilisé en conditions hypoxiques. La perte de fonction des gènes p53, PTEN ou VHL (pour *Von Hippel-Lindau tumor suppressor*), l'inhibiteur de HIF-1 α , ou l'activation de Ras, Src ou PI3K, très fréquentes dans les cellules cancéreuses, entraînent une accumulation de HIF-1 α indépendante du statut en O₂³¹³. Cette accumulation de HIF-1 α peut également être due à une altération du gène de la succinate déshydrogénase ou de la fumarase. En effet, l'altération de ces enzymes provoque une accumulation du succinate ou de fumarate qui interfère avec les étapes d'hydroxylation de HIF-1 α par HPH (pour *HIF prolyl hydroxylases*). Ces hydroxylations sont nécessaires à l'inhibition de HIF^{309,314}.

Ainsi, le chlorure de cobalt, qui réduit le contenu en ascorbate, cofacteur nécessaire à l'activité de HPH, permet la stabilisation de HIF-1 α ³¹⁵. De même, le DFO (desferrioxamine) permet la chélation des ions Fe²⁺, qui sont également nécessaires à l'activité de l'enzyme HPH³¹⁶. Ces deux composés permettent donc de mimer des conditions hypoxiques.

L'expression de HIF-1 α est également corrélée au statut redox de la cellule. Une hausse du stress oxydant régule positivement HIF-1 α , et inversement³¹⁷. HIF-1 α va être responsable de l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse, l'expression des facteurs de croissance ou l'invasion cellulaire. En effet, HIF-1 α est responsable de l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de ligand pour l'E-sélectine. Ainsi, l'extravasation des cellules tumorales est favorisée par leur adhésion à l'E-sélectine exprimée par les cellules endothéliales. HIF-1 α augmente la capture du glucose, *via* la synthèse des transporteurs du glucose (GLUT), et accentue la glycolyse par l'augmentation de l'expression

des enzymes glycolytiques (HEX, GPI, ALDO, PGK, PGM, ENO). HIF-1 α favorise aussi la transformation du pyruvate en lactate plutôt qu'en acétylCoA, par une hausse de l'expression de la LDH (Figure 58) ³⁰⁵.

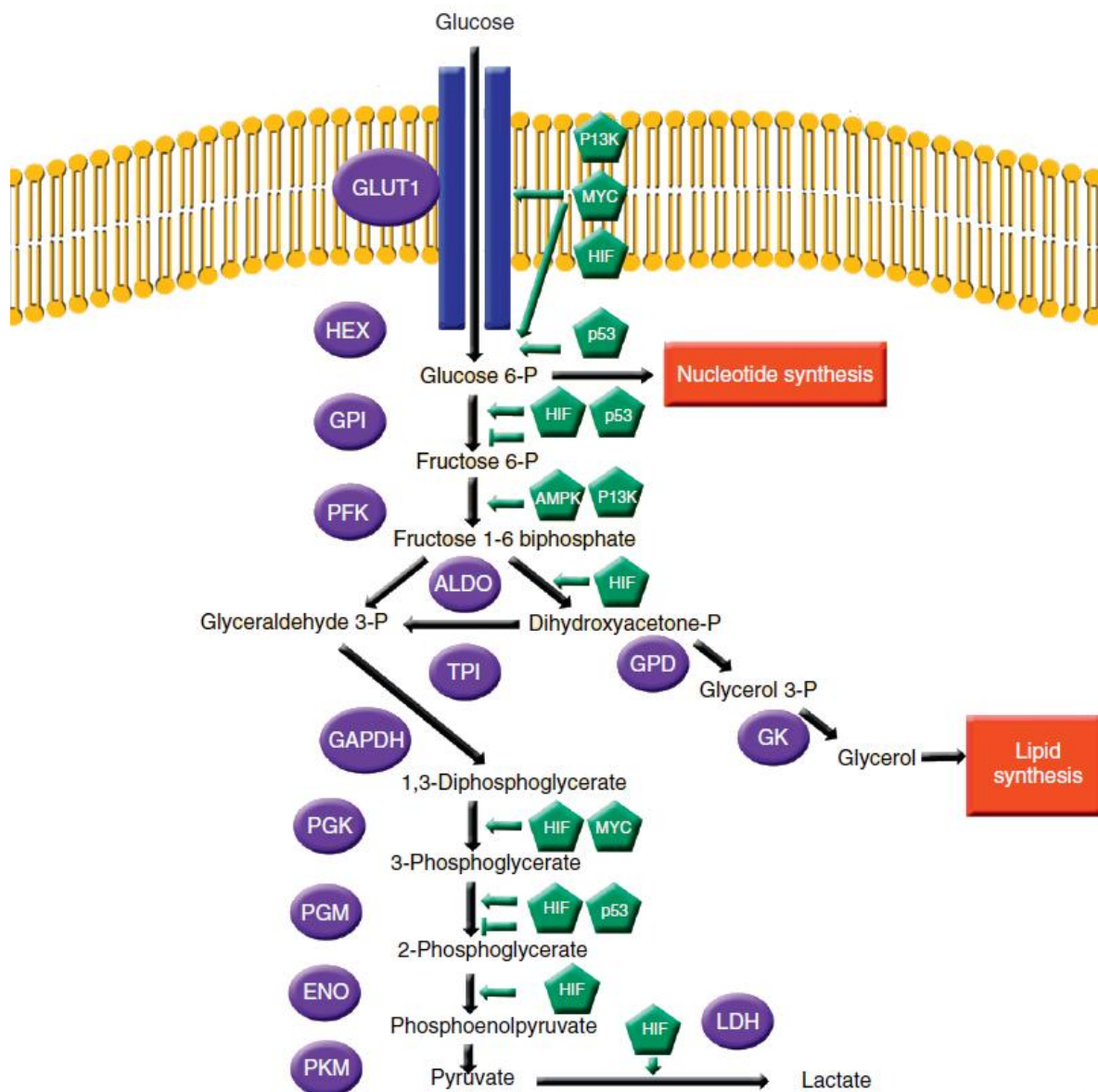


Figure 58 : Implication des oncogène et des gènes suppresseurs de tumeur dans l'effet Warburg ³⁰⁵

GLUT1 : Glucose Transporter 1 ; HEX : Hékokinase ; GPI : Glucose-6- Phosphate Isomérase ; PFK : PhosphoFructoKinase ; ALDO : Aldolase ; GPD : Glycerol-3-Phosphate Déshydrogenase ; GK : Glycerol Kinase ; TPI : TriosePhosphate Isomérase ; GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Déshydrogenase ; PGK : PhosphoGlycerate Kinase ; PGM : PhosphoGlucoMutase ; ENO : Enolase ; PKM : Pyruvate Kinase ; LDH : Lactate Déshydrogénase.

La surproduction de lactate entraîne une acidification du milieu péri-tumoral, qui empêche l'action des cellules immunitaires. HIF-1 α favorise également la production de lactate à partir du pyruvate, en augmentant l'expression de la PDK, qui est l'inhibiteur de la PDH, enzyme catalysant la transformation du pyruvate en Acétyl-CoA. Il en résulte une baisse du cycle de Krebs ³¹³. De plus, l'hypoxie, *via* HIF1 α , génère des ROS qui diminuent l'expression des

Introduction

sous-unités de la chaîne respiratoire, et réduisent donc la phosphorylation oxydative ³¹⁶. Néanmoins, il a été montré que l'expression de HIF-1 α , induite suite à un stress hypoxique dans les cellules musculaires de rat, augmentait l'expression des enzymes du cycle de Krebs, telles que la citrate synthase ou la succinate déshydrogénase. Cet effet permet une hausse de la production d'ATP ³¹⁸.

Enfin, la liaison de HIF-1 α sur une région promotrice de la choline kinase, accroît l'expression de cette enzyme. Il en résulte une augmentation de la synthèse de phosphocholine et des cholines totales, qui ont un rôle vital pour la croissance cellulaire ³¹³.

b. Sirt1, p53 et c-myc

La capacité de Sirt1 à inhiber HIF-1 α par déacétylation lui permet de jouer un rôle dans la diminution de la glycolyse et donc de l'effet Warburg ^{162,319}. Ainsi, Sirt1 privilégie la voie des lipides, au détriment du glucose et des acides aminés, pour produire de l'énergie ³²⁰.

Le gène suppresseur de tumeur p53 joue un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique. Il permet l'alimentation du cycle de Krebs en augmentant l'expression de la glutaminase 2 (GLS2), enzyme responsable de l'hydrolyse de la glutamine en glutamate ³²¹. p53 réduit aussi la glycolyse en inhibant l'expression des transporteurs du glucose (GLUT1 et 4) et de la phosphoglycérate mutase (Figure 58). La mutation du gène p53 permet une rupture du complexe mitochondrial cytochrome c oxydase, ainsi qu'une absence de répression des transporteurs du glucose, responsables d'un *switch* vers la glycolyse. De plus, en absence de p53, on observe une hausse du métabolisme du glucose (glycolyse et voie des pentoses phosphates) dépendante de NF κ B. Enfin, il a été montré qu'une mutation de p53 accentue l'induction de l'expression de l'hexokinase 2 ^{322,323}.

L'oncogène c-myc peut induire l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et Ras/Raf, impliquées dans l'expression de protéines qui régulent la glycolyse et la glutaminolyse (GLUT, hexokinase 2 et glutaminase 2 ; Figure 58). C-myc diminue également l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs en induisant l'expression de PKD ³²⁴.

3. Interférence des agonistes de PPAR avec l'effet Warburg

a. Interférence des agonistes de PPAR α avec l'effet Warburg

L'activation de PPAR α par le Féno réduit l'activité et l'expression de HIF-1 α induites par l'hypoxie dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et ovariennes M2780. En effet, PPAR α permet une augmentation de la dégradation de HIF-1 α *via* une hausse de sa liaison avec la protéine VHL. Il s'en suit une baisse de l'induction de ses gènes-cibles GAPDH (pour glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et HO-1 ³²⁵. Inversement, il a été montré

qu'un stress hypoxique diminuait l'expression de PPAR α dans les cellules intestinales *in vitro* et *in vivo*, notamment grâce à la fixation de HIF-1 α sur le promoteur du gène codant pour PPAR α ³²⁶. Néanmoins, une autre étude a montré un accroissement de l'expression de PPAR α en conditions hypoxiques dans les glioblastomes ^{327,328}.

Il a également été montré que le Féno augmentait l'expression et l'activité d'AMPK. Cette dernière stimule la β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie, grâce à une inhibition de l'acétylcoA carboxylase par phosphorylation. De plus, AMPK inhibe l'activité de LXR α (pour *Liver X Receptors*), induisant une inhibition de la synthèse d'acides gras ³²⁹. L'activation de PPAR α stimule également la β -oxydation des acides gras par l'activation de l'acylcoA synthétase mitochondriale et de CPT1/2 (pour *Carnitine palmitoyltransferase 1/2* ; Figure 59). L'augmentation de la β -oxydation des acides gras génère une quantité plus importante de cofacteurs réduits (NADH et FADH₂ pour Flavine adénine dinucléotide réduite). Ces derniers vont accroître le flux électronique à travers la chaîne respiratoire mitochondriale non fonctionnelle. Il s'en suit une production de ROS qui peuvent induire l'apoptose. De plus, la chaîne respiratoire n'étant pas fonctionnelle, le NADH non utilisé est transféré dans le cytosol. Son accumulation empêche alors le processus glycolytique en inhibant la GAPDH. Néanmoins, les effets anticancéreux des agonistes de PPAR α concernent uniquement les cellules cancéreuses possédant des mitochondries dites « paresseuses » ³⁰⁹. L'activation de PPAR α semble donc inhiber la glycolyse au profit de la β -oxydation des acides gras.

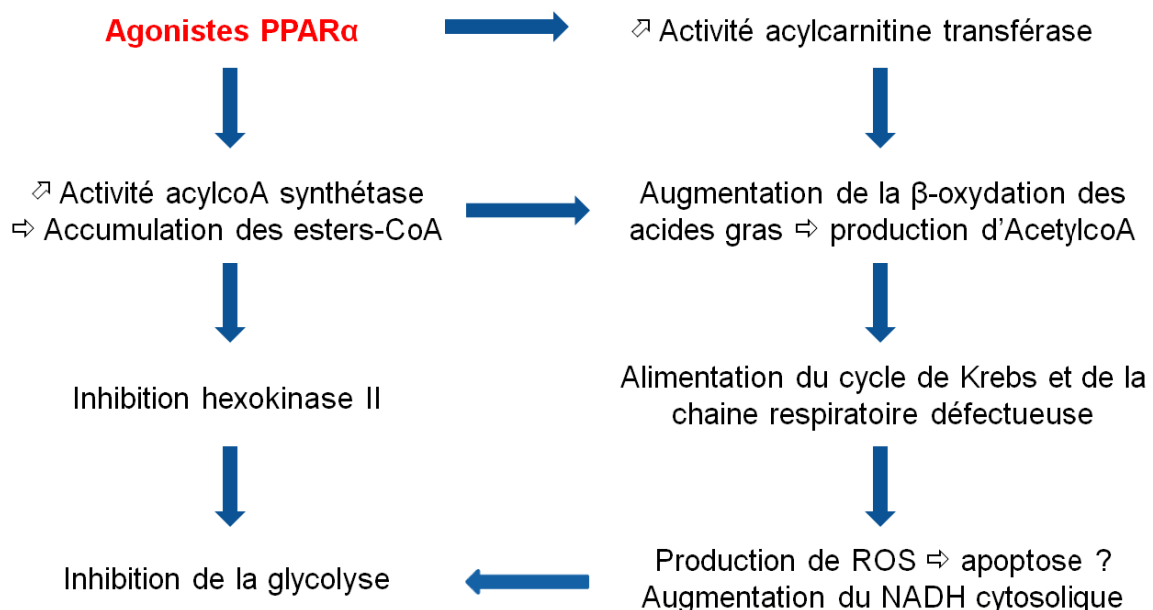


Figure 59 : Interférence des agonistes de PPAR α avec l'effet Warburg

b. Interférence des agonistes de PPAR β/δ avec l'effet Warburg

L'activation de PPAR β/δ présente, en partie, des effets identiques à ceux de PPAR α . En effet, les agonistes de PPAR β/δ accroît l'oxydation mitochondriale des acides gras par une augmentation de l'activité de CPT1, de l'acylcarnitine translocase et de l'acylCoA déshydrogénase à long terme. PPAR β/δ est donc capable de compenser PPAR α s'il est déficient³⁰⁹. Ainsi, une étude de flux de métabolites a permis de mettre en évidence l'action du récepteur PPAR δ activé par un agoniste sélectif dans les cellules adipocytaires 3T3L1. Ce traitement induit une hausse de la consommation d'oxygène cellulaire, une augmentation de l'oxydation des acides gras, de l'activité du cycle TCA et de l'oxydation des acides aminés ramifiés extracellulaire³³⁰.

Néanmoins, l'hypoxie accroît la transcription dépendante de PPAR β/δ , contrairement à PPAR α , ce qui permet l'induction de IL-8 et de VEGF dans les cellules HCT116³³¹. En revanche, un stress hypoxique dans les cellules cardiaques provoque l'expression des miR199a~214, responsables de la répression de l'expression de PPAR β/δ ³³².

c. Interférence des agonistes de PPAR γ avec l'effet Warburg

D'une part, l'activation de PPAR γ serait capable d'activer HIF-1 α , et l'induction de ses gènes-cibles, dans les cellules stromales et le tissu adipeux blanc^{333,334}. Néanmoins, il a été montré que l'activation de PPAR γ par la Rosiglitazone diminuait, *in vitro* et *in vivo*, l'induction de HIF-1 α dans des cellules endothéliales de l'artère pulmonaire en conditions hypoxiques. De plus, HIF-1 α augmente l'expression du récepteur PPAR γ dans les cellules HepG2, notamment grâce à la fixation de HIF-1 α sur son promoteur³³⁵. En revanche, il a été montré qu'un stress hypoxique réduisait l'expression et l'activité de PPAR γ dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires ou dans les cellules pulmonaires *in vitro* et *in vivo*^{336,337}.

D'autre part, l'activation de PPAR γ permet l'augmentation de la synthèse des acides gras dans les adipocytes, notamment grâce à l'induction de l'expression de la glycérol kinase, de SCD1 (pour Stearoyl-CoA désaturase) et de SREBP1 (pour *sterol regulatory element-binding protein 1*)³³⁸. Ce dernier est responsable de l'induction de l'expression de la FAS et d'ACC³³⁹. De plus, d'autres études ont montré l'augmentation de la synthèse des acides gras dans le foie suite au traitement de souris obèses par la Rosiglitazone³⁴⁰ et l'augmentation de l'expression de la FAS dans le tissu adipeux de rat obèses traités par la Pio³⁴¹.

Les TZD, qui inhibent fortement le complexe I de la chaîne respiratoire, provoquent un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, responsable de la diminution de la β -oxydation

des acides gras (Figure 60). Cela s'accompagne d'une production de ROS et d'une réduction de l'oxydation de NADH par une baisse de l'activité de la NADH déshydrogénase. Ce cofacteur peut donc être utilisé pour alimenter la voie glycolytique. Par ce biais, il a été montré que les TZD pouvaient présenter une activité de différenciation ³³. L'inhibition de la chaîne respiratoire augmente également la libération de lactate et d'acétate dans le milieu extracellulaire ^{342,343}. Cette inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par les TZD est trop importante pour permettre à la chaîne respiratoire de permuter vers l'oxydation du FADH2 au lieu du NADH. On observe alors une hausse de la glycolyse pour compenser le dysfonctionnement mitochondrial. En revanche, cette permutation est possible suite à l'inhibition partielle de ce complexe par les agonistes de PPAR α ³⁴⁴. Ces effets ont été observés principalement dans des cellules hépatiques et musculaires saines.

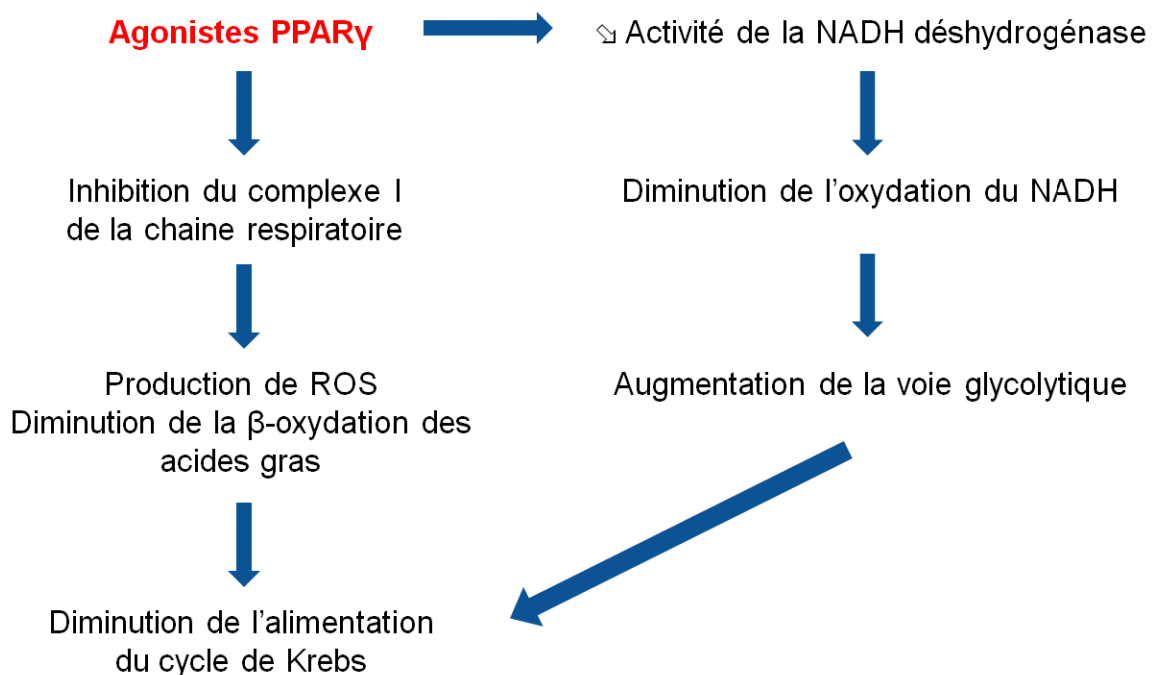


Figure 60 : Interférence des agonistes de PPAR γ avec l'effet Warburg

Mais, les TZD présentent aussi des effets indépendants de PPAR γ , qui peuvent être totalement différents des effets dépendants du récepteur. La Troglitazone et la Ciglitazone induisent une réponse similaire à une privation en glucose dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et mammaires MCF7. Cet effet serait indépendant de PPAR γ puisqu'il est également observé avec les dérivés de ces molécules, STG28 et OSU-CG12 (Figure 61), incapables d'activer le récepteur.

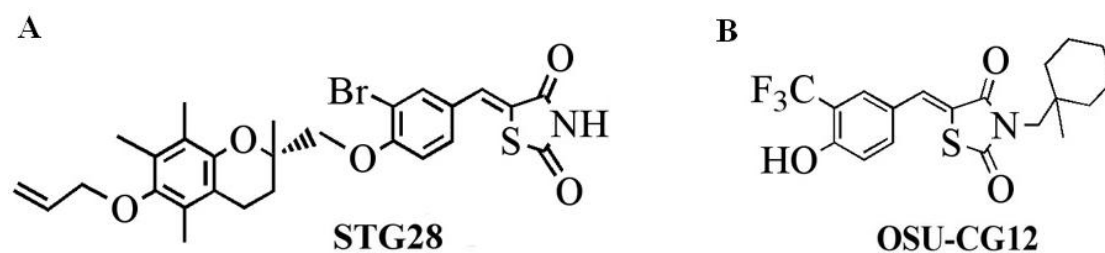


Figure 61 : Structure des dérivés STG28 (A) et OSU-CG12 (B)

Il est à noter que OSU-CG12 diminue le niveau glycolytique des cellules LNCaP *via* une réduction de l'ARNm de l'Hexokinase 2 et de la phosphofruktokinase 1. Il s'en suit une baisse du NADH et du lactate intracellulaire¹⁵⁶. Les TZD sont aussi capables d'activer AMPK par phosphorylation, de manière indépendante de PPAR γ , ce qui engendrerait l'inhibition d'ACC. Tout cela aurait pour effet d'augmenter la fonction mitochondriale et l'oxydation des acides gras^{329,345,346}. L'activation d'AMPK par les TZD pourrait être due à une diminution du taux d'ATP^{347,348}. Enfin, Pio augmente l'expression de PDK4 dans les cellules cancéreuses pulmonaires NCI-H2347 and NCI-H1993, ce qui induit une diminution de l'oxydation du glucose. Cette dernière est associée à une augmentation de la glycolyse et de l'oxydation des acides gras, à l'origine de la production d'un stress oxydant. Ce stress est accentué par la diminution de la synthèse du GSH. En effet, Pio inhibe l'activité de la glutaminase, ce qui diminue le contenu en glutamate, métabolite nécessaire à la synthèse du GSH. Ainsi, en modifiant le métabolisme en différents points, Pio inhibe la prolifération de ces cellules cancéreuses³⁴⁹.

Objectifs et Stratégies

Plusieurs études ont montré que les traitements de cellules cancéreuses par des ligands de PPAR α ou PPAR γ entraînaient un ralentissement de la croissance cellulaire, accompagné d'un processus apoptotique. Suite à une administration chez l'animal, ils provoquent une baisse du développement des tumeurs. Ces dernières peuvent être induites par un carcinogène ou par une greffe de cellules cancéreuses. Cependant, il est admis que ces ligands peuvent agir de manière indépendante de l'activation de l'isotype de PPAR.

Dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire, l'objectif principal de cette étude a consisté à étudier l'impact des traitements par des ligands de PPAR α et PPAR γ sur la survie de cellules cancéreuses coliques humaines. Les modifications du statut redox ont été particulièrement étudiées, notamment la relation entre la génération d'un stress oxydatif et la voie de signalisation anti-oxydante Nrf2/Keap1.

Au cours de ces travaux, les deux lignées cellulaires HT29 et HCT116, établies à partir d'adénocarcinome colique, ont été retenues. La Δ PJG2 et la Pioglitazone sont, respectivement, un ligand endogène et un agoniste synthétique de PPAR γ . Il a été montré que ces deux molécules pouvaient inhiber la croissance de cellules cancéreuses, indépendamment de PPAR γ . Afin de distinguer les effets dépendants et indépendants de l'activation de PPAR γ , un analogue de la Pio a été synthétisé. Appelé Δ Pio, il se caractérise par l'ajout d'une double liaison à l'extrémité du cycle thiazolidine. Il se lie à PPAR γ , mais empêche son activation. Les effets de ce composé n'ont pas encore été testés sur des modèles de cellules cancéreuses coliques humaines. Le Féno est un agoniste synthétique de PPAR α . Le traitement par cette molécule limite également la survie de cellules cancéreuses, notamment *via* la production d'espèces réactives. L'impact de ces composés (Féno, Pio, Δ Pio) sur la survie et le statut redox des cellules HT29 et HCT116 a donc été étudié. La Δ PGJ2 est alors utilisée en tant que témoin positif, car elle active la voie Nrf2/Keap1 de manière indépendante de PPAR γ . Enfin, l'impact de Pio, Δ Pio et Féno sur le statut glycolytique a été évalué, car la modification du métabolisme peut être à l'origine d'un arrêt de croissance cellulaire.

Parallèlement, les effets de dérivés 4-thiazolidinones, synthétisés au laboratoire, ont été étudiés. Ces molécules diffèrent des TZD par la présence d'une seule fonction cétone au niveau du cycle thiazolidine. Elles seraient donc incapables d'activer le récepteur PPAR γ , à la différence des TZD. En revanche, comme ces dernières, ces dérivés possèdent des capacités anti-cancéreuses. De fait, l'efficacité de ces molécules a été estimée, tout comme leur capacité à modifier le statut redox des cellules cancéreuses.

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

A. Entretien des cellules

Les cellules cancéreuses coliques HT29 (APC^{mut} , $p53^{mut}$, $K-RAS^{wt}$) et HCT116 (APC^{wt} , $p53^{wt}$, $K-RAS^{mut}$) sont cultivées dans du Milieu Essentiel Minimum, modifié par Dulbecco (DMEM, Eurobio, Les Ulis, France) contenant 10% (v/v) de sérum de vœu fœtal décomplémenté (chauffé à 56°C pendant 30 min, Eurobio), 2 mM de L-Glutamine (Eurobio), 104 UI/mL de Pénicilline-G (Eurobio) et 10 mg/mL de Streptomycine (Eurobio). En revanche, les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231 sont cultivées dans le milieu RPMI-1640, qui contient 10% (v/v) de sérum de vœu fœtal décomplémenté, 104 UI/mL de Pénicilline-G et 10 mg/mL de Streptomycine. Elles sont placées dans une atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C (incubateur Jouan, Saint Herblain, France). Le milieu est changé tous les jours. Les cellules sont repiquées tous les 7 jours. Le tapis cellulaire est lavé avec 5 mL de tampon phosphate (PBS ; 0,2 g/L de KH₂PO₄, 1,15 g/L de Na₂HPO₄, 0,2 g/L de KCl et 8 g/L de NaCl, pH 7,4). 2 mL d'une solution de trypsine/EDTA (Ethylène Diamine Tétra Acétique ; 0,1% (p/v) de trypsine et 2mM d'EDTA dilués dans du PBS, Eurobio) sont déposés sur le tapis cellulaire. Les cellules sont placées 5 minutes à 37°C, afin de les décoller. 2 mL de milieu sont ajoutés, afin d'arrêter la réaction trypsique. Après centrifugation à 1000g, pendant 5 min à 4°C, le surnageant est aspiré et les cellules sont reprises dans 5 mL de milieu DMEM. Les cellules sont comptées sur un hématimètre de Malassez, en diluant au préalable un aliquot de la suspension cellulaire avec un même volume d'une solution à 0,04% (v/v) de Bleu de Trypan (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Les cellules sontensemencées à une densité de 10⁵ cellules/mL, quel que soit le support utilisé.

B. Traitement des cellules

Pour la première partie de ce travail, les cellules ont été traitées par 50μM de Pio (Interchim, Montluçon, France), 50μM de ΔPio, 3μM de ΔPGJ2 (Bertin, Montigny le Bretonneux, France), 25 et 50μM de Féno ou 0,1 % (v/v) de DMSO (diméthylsulfoxyde), utilisé comme solvant. ΔPio a été synthétisée au laboratoire par S. Valente³⁵⁰. Dans la seconde partie de ce travail, les cellules ont été traitées par différents dérivés de 4-thiazolidinones, synthétisées au laboratoire par G. Revelant³⁵¹. Les concentrations utilisées correspondent aux valeurs d'IC₅₀ obtenues suite à la réalisation des tests MTT (bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium)). Pour certaines expériences, les cellules sont prétraitées pendant une heure par divers antioxydants ou inhibiteurs (Tableau 4).

C. Tests de prolifération

1. Test MTT

Le MTT (Acros Organics, Noisy le Grand, France) est réduit par l'action de la succinate déshydrogénase mitochondriale. Le MTT forme un composé insoluble ou formazan. Seules les cellules vivantes peuvent effectuer cette transformation.

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à 10^4 cellules par puits. Elles sont ensuite placées à 37°C pendant 24 h. Le milieu est remplacé par 100 μL de milieu contenant des quantités croissantes de chaque molécule (0,05 μM à 100 μM). Après incubation de 72 h, le milieu est remplacé par 100 μL de milieu contenant 0,5 mg/mL de MTT. Les plaques sont incubées à 37°C pendant 2 h. Le solution est aspirée et remplacée par 100 μL de DMSO permettant la dissolution du formazan. L'absorbance de ce dernier est mesurée à 560 nm. Une courbe dose-réponse est établie grâce au logiciel GraphPad (analyse de régression non linéaire).

2. Comptage au Bleu Trypan

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits (Dutscher, Molsheim, France), puis traitées quotidiennement, pendant 3 jours, ou en cinétique (1, 2 et 3 jours). Le milieu de culture, contenant le composé, est renouvelé chaque jour. Après incubation, les cellules sont décollées et comptées, selon le protocole décrit précédemment. L'index mitotique est déterminé par le nombre de cellules vivantes traitées rapporté au nombre de cellules témoins vivantes.

3. Test de clonogénicité

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits à 5000 cellules par puits pour les cellules HT29 et à 1000 cellules par puits pour les cellules HCT116. Les cellules sont traitées immédiatement et incubées 7 jours sans changement de milieu. Le tapis cellulaire est alors lavé au PBS puis fixé dans une solution d'éthanol à 70% (v/v) froid pendant 5 minutes. L'éthanol est remplacé ensuite par une solution à 0,1% (p/v) de bleu de Toluidine pendant 2 à 5 min. Le colorant est retiré et le tapis cellulaire rincé à l'eau, avant que les puits soient pris en photo (appareil Chemi Doc XRS, BioRad).

II. Analyse par cytométrie en flux

A. Etude du cycle cellulaire

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. Deux jours après ensemencement, les cellules sont traitées pendant 24 h. Les cellules sont décollées selon le protocole décrit précédemment, puis centrifugées 5 min à 1000g et à 4°C . Le culot de cellules est remis en

suspension dans 0,5 mL de PBS, puis mélangé à 4,5 mL d'une solution d'éthanol à 70% (v/v) froid. La suspension de cellules est conservée au minimum deux heures à -20°C. Après fixation, le mélange est centrifugé à 1000g à 4°C, pendant 5 min. Le culot est lavé deux fois avec du PBS, puis repris dans 500 µL d'une solution de PBS, composée de 50 µg/mL d'iodure de propidium (IP, Sigma), 83,2 U/mL de ribonucléase A, extraite de pancréas bovin (Euromedex, Strasbourg, France) et 0,1% (v/v) de Triton X-100 (Sigma). Les cellules sont maintenues 20 min à température ambiante, avant analyse par cytométrie en flux (FACS ; Calibur, BD Sciences, Le Pont de Claix, France). La mesure est réalisée sur 10000 cellules. L'analyse des résultats est réalisée grâce au logiciel Modfit (Verity Software House, Topsham, Maine, USA). La distribution des cellules, dans les différentes phases du cycle, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, rapporté au nombre total de cellules isolées analysées.

B. Test de viabilité

Deux sondes fluorescentes sont utilisées pour évaluer la viabilité cellulaire. Le DCF-DA (2'-7'-dichlorofluorescéine diacétate, Accros, Halluin, France) est utilisé pour identifier les cellules vivantes et l'IP pour identifier les cellules mortes. Les membranes intactes des cellules vivantes sont perméables au DCF-DA mais pas à l'IP. En revanche, les membranes altérées des cellules mortes permettent la pénétration de l'IP qui peut alors s'intercaler dans les brins d'ADN, tandis que le DCF-DA diffuse hors de la cellule. Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits, puis traitées deux jours après ensemencement. A la fin du traitement, les cellules sont incubées 15 min à 37°C en présence de 50µM de DCF-DA. Le surnageant est récupéré et les cellules décollées, selon le protocole décrit précédemment, y sont rajoutées. Le tout est centrifugé à 1000g, pendant 5 min et à 4°C. Le culot est rincé avec 2 mL de PBS, avant d'être centrifugé à nouveau. Le culot est repris dans 500 µL d'une solution de PBS composée de 25 µg/mL d'IP et incubé 15 min à l'obscurité et à température ambiante. 30000 cellules sont alors analysées au FACS en utilisant les canaux de fluorescence FL-1 et FL3. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Cyflogic (Cyflo Ltd, Turku, Finland). Le taux de viabilité correspond aux cellules positives au DCF-DA, c'est-à-dire à la fluorescence verte ; il est exprimé en pourcentage.

C. Mesure quantitative de la production d'espèces réactives

L'état de stress oxydant des cellules a été estimé en utilisant le DCF-DA, le 4,5-diaminofluorescéine diacétate (DAF2-DA, Sigma) ou la dihydrorhodamine 123 (DHR) et analysé par cytométrie en flux. Sous l'action d'estéras cellulaires, et en présence

Matériel et Méthodes

respectivement de ROS, de RNS et de peroxyde nitrique, le DCF-DA est transformé en dichlorofluorescéine (DCF), le DAF2-DA en triazolofluorescéine (DAF) et la DHR en rhodamine 123. Tous ces composés sont fluorescents. Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits, puis traitées deux jours après ensemencement. A la fin du traitement souhaité, les cellules sont ensuite incubées 15 min à 37°C, en présence de 50µM de DCF-DA pour la mesure des ROS, 30 minutes en présence de 1µM de DAF2-DA pour la mesure des RNS ou 20 minutes en présence de 25µM de DHR pour la mesure des ONOO-. Elles sont ensuite décollées, selon le protocole décrit précédemment. Les cellules sont remises en suspension avec 2 mL de PBS, puis centrifugées à 1000g, pendant 5 min et à 4°C. Les culots sont remis en suspension dans 0,5 mL de PBS et analysés par cytométrie en flux en utilisant le canal de fluorescence FL-1. 30000 évènements sont mesurés. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel Cyflogic. La quantité d'espèces réactives, générée au cours de chaque traitement, est rapportée à celle obtenue lorsque les cellules sont traitées par le DMSO, utilisé comme solvant de chaque composé ; elle est exprimée en pourcentage.

D. Quantification des vésicules autophagiques

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits, puis traitées deux jours après l'ensemencement. A la fin du traitement, les cellules sont incubées 15 min à 37°C, en présence d'1 µg/mL d'acridine orange. Les cellules sont ensuite récupérées, selon le protocole décrit précédemment. Enfin, 30000 évènements sont analysés, en utilisant le canal de fluorescence FL-3. L'analyse des résultats est effectuée en utilisant le logiciel Cyflogic. La quantité de vésicules acides autophagiques, pour chaque traitement, est rapportée à celle obtenue lorsque les cellules sont traitées par le DMSO, utilisé comme solvant de chaque composé ; elle est exprimée en pourcentage.

III. Dosage du GSH par fluorimétrie

A. Traitement des cellules et préparation des échantillons

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits, puis traitées deux jours après ensemencement. A la fin du traitement, les cellules sont lavées trois fois avec 5 mL de PBS froid, puis récoltées à l'aide d'un râteau (Dutscher), après l'ajout de 500 µL d'une solution froide, à 10% (v/v) d'acide perchlorique (pH 8) contenant 2mM EDTA. Le mélange est centrifugé 15 min à 15000 g et à 4°C. Le culot protéique, repris dans 1 mL de soude à 1M, et le surnageant sont immédiatement congelés à -80°C.

B. Dosage de la forme réduite du glutathion

Le contenu en GSH est mesuré sur chaque surnageant, conservé à -80°C , par la formation d'un adduit fluorescent avec le 2,3-naphtalène dicarboxyaldéhyde (NDA) à pH basique, selon la méthode décrite par Lewicki et al. ³⁵². Pour cela, 20 μL de solution de soude 40% (NaOH, m/v) sont ajoutés à 200 μL d'échantillon afin de neutraliser leur pH acide. Les échantillons peuvent être dilués, au préalable, dans une solution 0,1M HCl (acide chlorhydrique) et EDTA 2mM. La gamme de GSH (0 à 3,25 μM) est également réalisée dans le tampon d'acide chlorhydrique-EDTA. La formation de l'adduit GSH-NDA est effectuée en plaque 96 puits « noires ». Le mélange réactionnel est le suivant : 60 μL de la solution à doser, 120 μL de tampon borate 0,4M pH 9,2 et 20 μL de NDA à 1 mg/mL. La lecture de l'intensité de fluorescence est réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (CytoFluor 4000, PerSeptive BioSystems) en utilisant un filtre excitateur de 485 ± 20 nm et un filtre d'émission à 528 ± 20 nm (sensibilité = 60).

La quantité de protéines, de chaque échantillon, est mesurée en utilisant une méthode décrite par Lowry et al. ³⁵³, modifiée selon le protocole suivant. La quantité de protéines est déterminée à l'aide d'une gamme de concentrations d'Albumine Sérique Bovine (ASB ; Sigma) comprises entre 0 à 1 mg/mL Elle est précipitée par une solution à 10% (v/v) d'acide perchlorique, puis solubilisée avec une solution de soude 1M. L'absorbance est mesurée à 740 nm. Pour chaque échantillon, les quantités de GSH sont rapportées à la quantité de protéines et les résultats sont exprimés en nanomoles de GSH/mg de protéines. Les résultats obtenus, pour chaque traitement, sont rapportés à ceux obtenus lors du traitement des cellules témoins ; ils sont exprimés en pourcentage.

IV. Immunoréplique

A. Préparation des extraits totaux, cytoplasmiques et nucléaires

Les cellules sont ensemencées dans des flacons de 25cm², pour la préparation des extraits protéiques totaux, ou dans des boîtes de Pétri de 65 cm², pour la préparation des extraits cytoplasmiques et nucléaires. 48 heures après ensemencement, les cellules sont traitées. Les extraits totaux sont préparés selon le protocole suivant. Les tapis cellulaires sont lavés 3 fois avec 5 mL de PBS. Les cellules sont récoltées à l'aide d'un râteau, après l'ajout de 250 μL de tampon 25mM d'Hepes/KOH (pH 7,5) contenant 400mM de KCl, 5mM d'EDTA, 0,5% (v/v) de NP40 (Tergitol-type NP-40), 1mM de DTT (dithiothréitol) et 0,1% (v/v) d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (Sigma). Les homogénats sont récupérés, puis laissés dans la glace pendant 30 min, avant d'être centrifugés 30 min à 15000g et à 4°C . Les surnageants,

Matériel et Méthodes

représentant les extraits protéiques totaux, sont repris et stockés à -80°C . Les extraits cytoplasmiques et nucléaires sont préparés selon le protocole suivant. Les tapis cellulaires sont lavés 2 fois avec du PBS. Les cellules sont récoltées, à l'aide d'un râteau, après l'ajout de 2 mL de PBS. La suspension de cellules est centrifugée 5 min à 1000g et à 4°C . Les culots sont repris dans un tampon 10mM Hepes/KOH (pH 7,4) contenant 10mM d'EDTA, 60mM de KCl, 1mM de DTT, 0,5% (v/v) de NP40 et 0,1% (v/v) d'un mélange d'inhibiteurs de protéases. Ils sont ensuite placés 5 min dans la glace, avant d'être centrifugés 5 min à 1000g à 4°C . Les surnageants, représentant les extraits cytoplasmiques, sont recueillis et maintenus à 4°C . Les culots sont repris avec 1 mL du tampon Hepes/KOH précédent, mais ne contenant pas de NP40. Ils sont centrifugés 2 min à 8000g. Cette étape de lavage est réalisée trois fois. Les culots sont repris avec 150 μL de tampon Hepes/KOH initial et représentent les extraits nucléaires. Ils sont maintenus dans la glace pendant 15 min. Finalement, les extraits cytoplasmiques et nucléaires sont centrifugés 15 min à 15000g et à 4°C . Les surnageants obtenus sont prélevés et stockés à -80°C . La concentration en protéines est déterminée par la méthode décrite par Lowry et *al.*³⁵³, en utilisant une gamme de concentrations d'ASB comprises entre 0,25 et 1 mg/ml.

B. Electrophorèse en conditions dénaturantes et transfert sur membrane

25 μg de protéines d'extraits totaux ou 20 μg de protéines d'extraits cytoplasmiques et nucléaires sont séparés sur des gels de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide entre 10 et 15% / 2,5% T), dans des conditions dénaturantes (appareil Protean III, BioRad, les Ulis, France). Les protéines de chaque échantillon sont diluées au demi, dans du tampon 20mM Tris/HCl (pH 8,0) contenant 2,5% (v/v) de β -mercaptoéthanol et 5% (p/v) de SDS (dodécylsulfate de sodium), dans un volume final de 20 μL . Chaque échantillon est chauffé pendant 5 min à 100°C , avant d'être déposé sur le gel. La migration est réalisée à 100 V, pendant 90 min, dans une solution composée de 0,025M Tris, 0,192M Glycine et 0,1% (p/v) SDS. Après migration, les protéines sont transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose (Macherey-Nagel, Hoerd, France), en semi sec, pendant 30 min à 25 V, dans une solution contenant 0,025M Tris, 0,192M Glycine et 10% (v/v) méthanol. Le transfert des protéines du gel vers la membrane est vérifié grâce à une solution à 0,3% (p/v) d'acide trichloroacétique, contenant 0,03 % (p/v) de rouge de Ponceau-S (Sigma). La membrane est finalement lavée avec de l'eau distillée.

C. Détection immunologique

De manière générale, chaque membrane de nitrocellulose est incubée, pendant 1 h, dans une solution de 50mM Tris/HCl (pH 7,4) contenant 0,15M NaCl et 5 % (p/v) de lait écrémé. Après incubation, la solution est remplacée par l'anticorps primaire, préparé dans une solution de 50mM Tris/HCl (pH 7,4) contenant 0,15M NaCl et 0,1 % (v/v) de Tween 20 (TBS-T). La liste des anticorps primaires, utilisés au cours de ce travail, est précisée Tableau 5. Chaque membrane est incubée à 4°C, sous agitation douce pendant la nuit. La membrane est ensuite lavée trois fois 10 min avec 5 mL de TBS-T, puis incubée pendant 45 min à température ambiante avec l'anticorps secondaire, préparé dans le TBS-T. L'anticorps secondaire est couplé à la peroxydase de raifort et correspond au type d'anticorps primaire utilisé (Tableau 5). La membrane est alors lavée trois fois 5 min avec 5 mL de TBS-T. Finalement, la membrane de nitrocellulose est incubée avec une solution commerciale de substrat, composée de luminol (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz, CA, USA), pendant 1 min. La lumière émise est capturée pendant 1 min (appareil Chemi Doc XRS, BioRad). La bande obtenue pour chaque protéine d'intérêt et pour chaque condition est quantifiée, grâce au logiciel d'analyse d'image (Quantity One, BioRad). La valeur obtenue (exprimée en pixels/mm²) est rapportée à celle obtenue par détection immunologique de la protéine de ménage (GAPDH ou β -actine), sur la même membrane. La détection des protéines de ménage s'effectue après élimination des anticorps primaires par lavages successifs de la membrane avec une solution de 25mM Glycine/HCl (pH 2) contenant 1% SDS (m/v) et 1% de Tween 20 (v/v) pendant 15 min, suivi de deux lavages de 10 min avec du TBS-T.

D. Dot blot

Les *dot blots* sont réalisés en déposant 25 μ g d'homogénat de protéines sur une membrane de nitrocellulose, en utilisant un appareil à Dot blot (Biorad) selon les recommandations du constructeur. Les membranes sont séchées, puis incubées dans le TBS-T pendant 15 min. Le marquage de la membrane est effectué avec un anticorps de lapin anti-Nitro-tyrosine (Tableau 5), selon la procédure décrite précédemment.

V. Techniques cytologiques

A. Utilisation de sondes fluorescentes

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm². 48 h après ensemencement, les cellules sont traitées. Après traitement, 50 μ M de DCF-DA, 25 μ M de DHR, 1 μ g/mL de JC-1 (Invitrogen) ou 1 μ g/mL de MitoSox (Invitrogen) sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont incubées pendant 15 min à 37°C, avant l'addition de 0,3 μ g/ml de Hoechst

Matériel et Méthodes

33342, pendant 5 min. Les tapis de cellules sont lavés deux fois avec du PBS à 37°C, puis observés avec un microscope Nikon Eclipse 80i (Nikon-Europe, Kinston, Royaume-Uni), équipé des filtres appropriés pour chaque sonde fluorescente. Les images sont capturées grâce à une caméra (Digital camera DXM1200F, Nikon). Le traitement des images est réalisé avec le logiciel NIS-Element AR 2.3 (Nikon). Nous avons également réalisé, après traitement, une coloration avec le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI), selon le protocole suivant. Après traitement, les tapis cellulaires sont lavés avec du PBS et fixés à l'aide d'une solution d'éthanol 70% (v/v). Après deux lavages avec du PBS, les cellules sont incubées 5 min en présence de 10 µg/mL de DAPI, dissous dans du PBS. Enfin, les tapis sont lavés avec du PBS et observés au microscope à fluorescence.

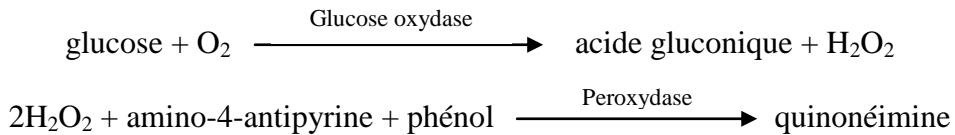
B. Immunocytochimie

Les cellules sontensemencées sur des lamelles dans des plaques 6 puits. 48 h après ensemencement, les cellules sont lavées avec 2 mL de PBS, puis incubées avec une solution de PBS contenant 4% (v/v) de formol froid, pendant 20 min. Les tapis de cellules sont lavés trois fois 5 min avec du PBS, puis incubés, successivement, avec une solution de PBS contenant 3% (p/v) de ASB et 0.1% (v/v) de Triton X100, pendant 30 min, puis avec une solution d'anticorps primaires (Tableau 5), dilués dans du PBS contenant 0,5% (p/v) ASB, 0,1 % (v/v) de Triton X100, pendant la nuit à 4°C. Après incubation, les cellules sont lavées trois fois 5 min avec du PBS, puis incubées avec une solution d'anticorps secondaires, couplés à une sonde fluorescente (Tableau 5), dilués dans du PBS contenant 0,5% (p/v) ASB, 0,1 % (v/v) de Triton X100, pendant 30 min, à température ambiante. Les cellules sont finalement lavées 5 min avec du PBS, puis incubées 5 min avec du PBS contenant 10 µg/mL DAPI, et enfin lavées trois fois 5 min avec du PBS. Chaque lamelle est placée sur une lame en verre, sur laquelle est déposée une goutte de milieu de montage PermaFluor (Immunon, Euromedex). Les cellules sont observées avec un microscope Nikon Eclipse 80i, équipé des filtres appropriés pour chaque sonde fluorescente. Les images sont capturées grâce à une caméra (Digital Camera DXM1200F, Nikon). Le traitement des images est réalisé avec le logiciel NIS-Element AR 2.3 (Nikon).

VI. Dosages colorimétriques

A. Dosage du glucose

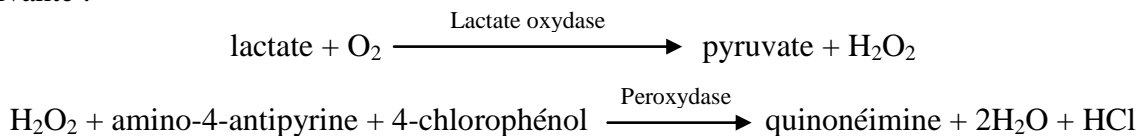
Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. 48 h après ensemencement, elles sont traitées. Le milieu extracellulaire est alors prélevé et le glucose y est dosé en utilisant le kit *Elitech Glucose*, selon les recommandations. Ce dosage s'appuie sur la réaction suivante :



L'absorbance est mesurée à 480nm.

B. Dosage du lactate

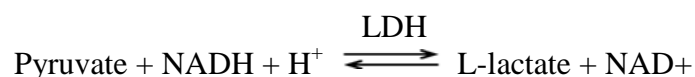
Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. 48 h après ensemencement, elles sont traitées. Le milieu extracellulaire est alors prélevé et le lactate y est dosé en utilisant le kit *Biomérieux Lactate PAP*, selon les recommandations. Ce dosage s'appuie sur la réaction suivante :



L'absorbance est mesurée à 446nm.

C. Dosage de l'activité LDH

Les cellules sontensemencées dans des plaques 6 puits. 48 h après ensemencement, elles sont traitées. Les cellules sont alors rincées avec du PBS, puis récupérées, selon le protocole décrit précédemment. Le culot cellulaire est congelé à -80°C. Le jour de l'analyse, les cellules sont reprises dans 200 µL d'un tampon phosphate 0.1M (pH 7.0) K₂HPO₄/KH₂PO₄. La suspension cellulaire est lysée par ultrasons, puis centrifugée 15 min à 15000g et à 4°C. Le surnageant est récupéré et le dosage de l'activité LDH est réalisé dans un tampon phosphate 0.025M (pH 7.5) K₂HPO₄/KH₂PO₄ contenant 0.3mM de pyruvate et 0.09mM de NADH. Ce dosage s'appuie sur la réaction suivante :



L'absorbance est mesurée en cinétique à 37°C et à 340nm. Le dosage des protéines est effectué en parallèle selon la méthode décrite par Lowry et al.³⁵³. L'activité enzymatique est exprimée en U/mg de protéines, puis rapportée à la valeur obtenue suite au traitement par le DMSO ; elle est exprimée en pourcentage).

VII. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide d'un test t de Student, pour échantillons non appariés et avec $\alpha = 0,05$.

	Origine commerciale	Solvant Utilisé	Concentration finale
N-acétyl cystéine (NAC)	Sigma	PBS	5mM
α -Tocophérol (α -Toc)	Sigma	DMSO	50 μ M
γ -Tocophérol (γ -Toc)	Sigma	DMSO	10 μ M
Para-benzoquinone (pBQ)	Acros Organics	DMSO	10 μ M
Acide ascorbique (Asc)	Fluka	PBS	1mM
D-Mannitol (Man)	Acros Organics	PBS	1mM
L-N ^G -Nitroarginine methyl ester (L-N)	Sigma	PBS	1mM
Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)	Sigma	DMSO	50 μ M
NS398 (NS)	Sigma	DMSO	10 μ M
MK886 (MK)	Cayman	DMSO	10 μ M
GW9662 (GW)	Cayman	DMSO	10 μ M
Trigonelline (Tri)	Sigma	DMSO	100nM
L-Buthionine-(S-R)-sulfoximine (BSO)	Sigma	PBS	100 μ M

Tableau 4 : Molécules utilisées lors des prétraitements ou co-traitements des cellules

Solutions d'anticorps utilisées pour la technique d'immunoréplique

Anticorps primaires (Nom commercial)	Origine commerciale	Hôte	Dilution utilisée
Glyceraldehyde-phosphate déshydrogénase (GAPDH) humaine	Millipore	Souris	1 : 10000
β-actine humaine	Sigma	Souris	1 : 10000
Lamine A/C humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
NO synthase inductible (iNOS) humaine	Cell signaling	Lapin	1 : 500
<i>NF-E2-related factor</i> (Nrf2) humaine	Santa Cruz	Lapin	1 : 100
Glutathione S Transferase π (GSTπ) humaine	Santa Cruz	Souris	1 : 500
hème oxygénase-1 (HO-1) humaine	Epitomics	Lapin	1 : 500
γ-glutamylcystéine ligase (GCL) humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
Thioredoxine (Trx) humaine	Santa Cruz	Souris	1 : 500
Caspase-3 activée humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
poly(ADP-ribose) polymérase-1 (P116/P85, PARP-1) humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
NAD(P)H quinone oxydoréductase 1 (NQO1) humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
Beclin-1 humaine	Epitomics	Lapin	1 : 1000
<i>Hypoxia-inducible factor 1α</i> (HIF1α) humaine	Epitomics	Lapin	1:1000
Hexokinase 2 (HEX2) humaine	ThermoFisher	Lapin	1:1000
Nitro-Tyrosine	Millipore	Lapin	1:500

Anticorps secondaires (Nom commercial)	Origine commerciale	Hôte	Dilution utilisée
anti souris HRP-conjugué (<i>horseradish peroxidase</i>)	Sigma	Chèvre	1 : 5000
Anti lapin HRP-conjugué	Bio Rad	Chèvre	1 : 5000

Solutions d'anticorps utilisées pour la technique d'immunocytochimie

Anticorps primaires (Nom commercial)	Origine commerciale	Hôte	Dilution utilisée
Nrf2 humaine	Epitomics	Lapin	1 : 250

Anticorps secondaires (Nom commercial)	Origine commerciale	Hôte	Dilution utilisée
Anti lapin FITC conjugué (<i>Fluorescein isothiocyanate</i> ; Alexa 488)	Molecular probes	Chèvre	1 : 500

Tableau 5 : Solutions d'anticorps utilisées dans cette étude

Résultats et Discussion

I. Activité anticancéreuse des ligands de PPAR

A. Diminution de la croissance cellulaire par les ligands de PPAR

1. Diminution de la croissance cellulaire par les ligands de PPAR γ

L'analogue de la Pio, la Δ Pio, est capable de se lier au récepteur PPAR γ , mais empêche son activation. L'utilisation de ce composé permet donc de mettre en évidence les effets indépendants de PPAR γ ⁴³. Pour une utilisation éventuelle en thérapeutique, il permettrait d'éliminer les effets indésirables rencontrés suite à l'activation de PPAR γ (prise de poids, ostéoporose...) ^{50,53}.

La détermination de la dose de Δ Pio, nécessaire à l'inhibition de 50% de la croissance cellulaire (IC₅₀), a été effectuée à l'aide d'un test MTT. L'IC₅₀ est respectivement de 53,7 μ M \pm 2,8 μ M et de 46,2 μ M \pm 2,4 μ M lorsque le test est réalisé avec des cellules HT29 ou HCT116. Ces cellules ont donc été traitées par 50 μ M de Δ Pio. Par la suite, des expériences dose-réponse ont été réalisées grâce à un comptage au bleu Trypan, avec les cellules HT29 sur 3 jours (Figure 62). Ces résultats ont confirmé ceux obtenus avec le test MTT. En parallèle, les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées par 50 μ M de Pio. La dose de 3 μ M de Δ PGJ2 a été choisie pour sa capacité à induire une réponse non toxique pour les cellules, contrairement à une dose de 10 μ M qui induit l'apoptose des cellules cancéreuses coliques HT29 ³⁵⁴.

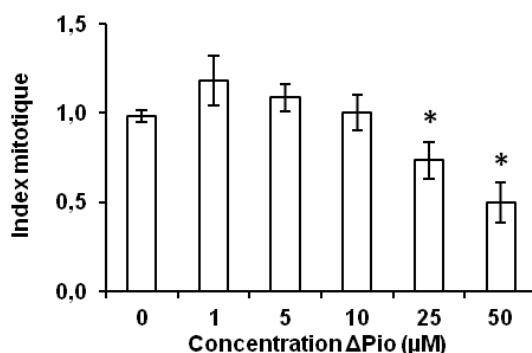


Figure 62 : Courbe dose-réponse de la Δ Pio

Les cellules HT29 ont été traitées 3 jours par différentes concentrations de Δ Pio. Un comptage des cellules est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules vivantes traitées par Δ Pio au nombre de cellules vivantes non traitées.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Δ Pio et celles obtenues lorsque les cellules sont non traitées.

Les cellules HT29 et HCT116 ont alors été traitées pendant 4 jours par 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. Une baisse de la croissance cellulaire (-30%) est obtenue, après deux jours de traitement par Pio et Δ Pio, quelle que soit la lignée cellulaire (Figure 63A et B). Dès trois jours de traitement, l'effet est plus marqué lorsque les cellules HT29 sont traitées par Δ Pio. Effectivement, le nombre de cellules reste constant entre le 3^e et

Résultats et Discussion

le 4^e jour (Figure 63A). En revanche, après 4 jours, le traitement par Pio ne diminue le nombre de cellules vivantes que de 30% (Figure 63A). De même, une réduction du nombre de cellules (-50%) est observée lorsque les cellules HCT116 sont traitées par Pio, ou son analogue, pendant 4 jours (Figure 63B). Cet effet antiprolifératif a été vérifié par un test de clonogénicité (Figure 63C). On observe une forte baisse du nombre de clones suite au traitement des cellules HT29 et HCT116 par Δ Pio, tandis qu'elle est nettement moins marquée avec Pio. De plus, la Δ PGJ2 conduit à un ralentissement de la croissance (-50%) après deux jours de traitement, quelle que soit la lignée cellulaire utilisée (Figure 63A et B). Cependant, cet effet n'est que temporaire, puisqu'en fin d'expérience le nombre de cellules est équivalent à celui des cellules traitées par le DMSO.

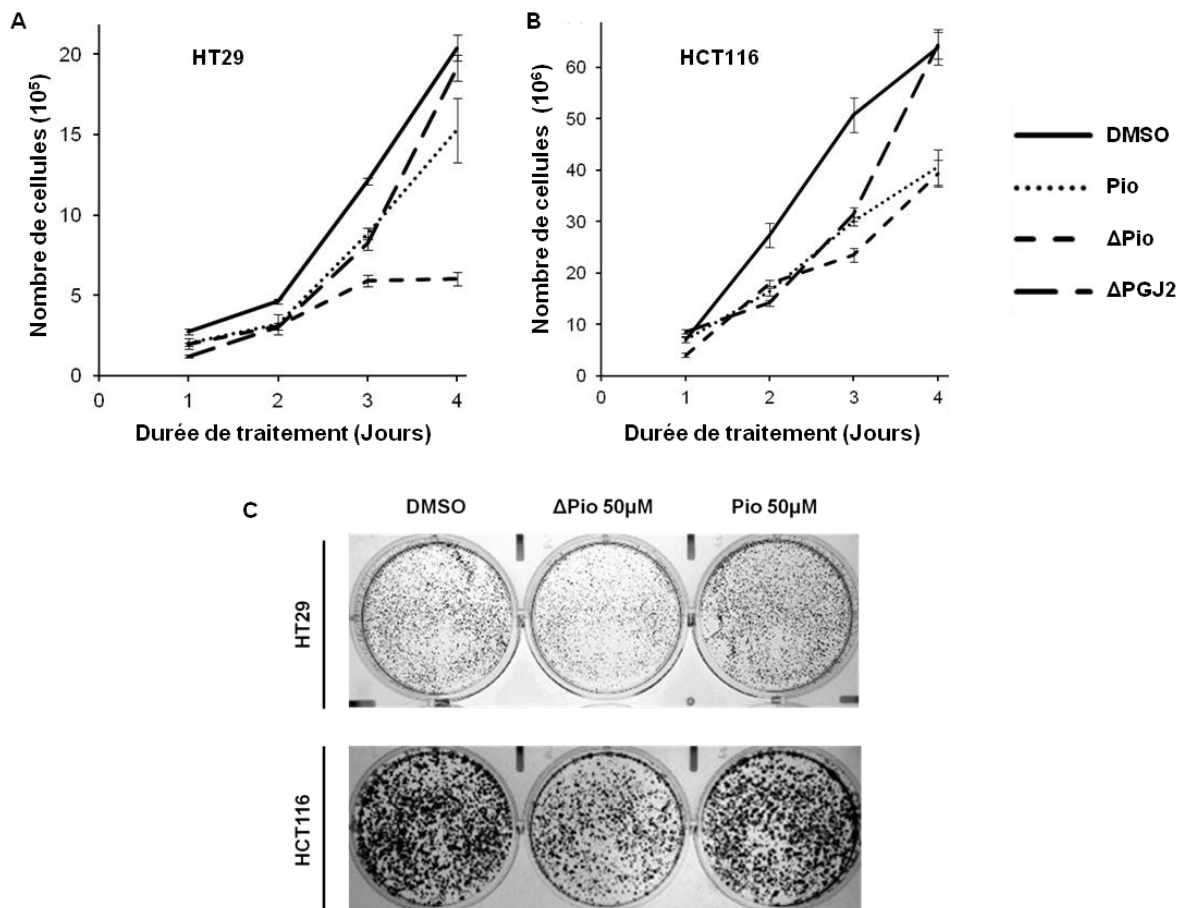


Figure 63 : Diminution prolifération cellulaire par les ligands de PPAR γ

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été traitées quotidiennement pendant 4 jours par 0.1% (v/v) de DMSO, 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. 6 comptages des cellules vivantes sont effectués chaque jour pour chaque série (n = 3).

(C) Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 7 jours par 50 μ M de Pio ou Δ Pio, sans changement de milieu, puis les colonies ont été marquées par le bleu de toluidine, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

De nombreuses études ont montré que les TZD et la Δ PGJ2 diminuaient efficacement la croissance de cellules cancéreuses d'origines diverses¹²⁹, et plus particulièrement les cellules

cancéreuses coliques^{148,169,174}. La baisse de prolifération des cellules HT29 et HCT116 observée avec Pio et Δ PGJ2, au moins les deux premiers jours, est donc bien en adéquation avec ces résultats. En revanche, ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec Pio et Δ Pio sur les cellules cancéreuses prostatiques PC3 et LNCap. En effet, ces deux composés ne réduisent que très faiblement la croissance de ces cellules⁴³. Cependant, la culture de ces dernières en sphéroïdes potentialise considérablement l'efficacité de la Pio, notamment grâce à une modulation du métabolisme du glucose¹³⁷.

Le co-traitement de cellules HT29 par Pio et 10 μ M de GW9662, un antagoniste de PPAR γ , ne modifie pas l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par la Pio seule (Figure 64). Cet effet serait donc indépendant du récepteur PPAR γ , résultat déjà décrit dans la littérature⁵⁵. Cela est également cohérent avec l'inhibition de croissance observée avec Δ Pio (Figure 63).

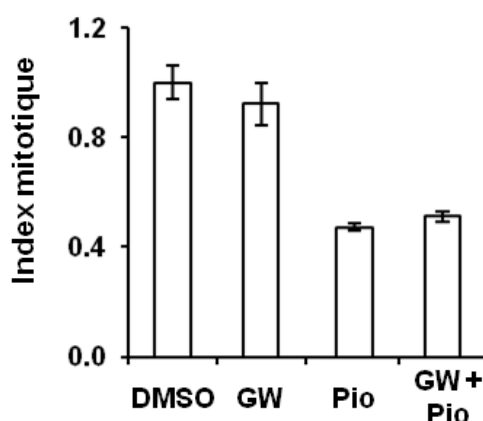


Figure 64 : Diminution de la prolifération cellulaire, induite par Pio, indépendante de PPAR γ

Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 50 μ M de Pio en association ou non avec un traitement par 10 μ M de GW9662 (GW), un antagoniste de PPAR γ . L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules vivantes traitées par Pio, en association ou non avec GW, au nombre de cellules vivantes traitées par le DMSO. 4 comptages sont effectués pour chaque série (n = 3). Il n'existe pas de différence significative (test de Student, $\alpha = 0,05$) entre les cellules traitées par Pio et celles traitées par Pio et GW.

2. Diminution de la croissance cellulaire par Féno

La détermination de l'IC₅₀ du Féno a été effectuée par un test MTT. L'IC₅₀ est égale à 28,0 μ M \pm 0,9 μ M lorsque le test est réalisé avec les cellules HT29. Ces cellules ont donc été traitées par 25 μ M de Féno, mais également par 50 μ M de Féno afin d'exacerber les effets. En revanche, cette IC₅₀ est de l'ordre de 67,0 μ M \pm 11,3 μ M avec les cellules HCT116. Le Féno semble donc être moins efficace sur ces dernières. Cependant, afin de pouvoir comparer les effets entre les deux lignées cellulaires, nous avons retenu des concentrations identiques à celles utilisées avec les cellules HT29.

Une diminution du nombre de cellules HT29 est observée dès le 1^{er} jour de traitement par 25 μ M et 50 μ M de Féno. La différence de prolifération entre les cellules traitées et les cellules

Résultats et Discussion

témoins s'accroissent jusqu'au 3^e jour de traitement. De plus, le nombre de cellules n'augmente que très faiblement entre le 1^{er} et le 3^e jour de traitement, ce qui sous-entend que la croissance cellulaire est quasiment arrêtée. C'est pourquoi au 3^e jour, le nombre de cellules est réduit d'environ 80% avec 25 μ M de Féno et de 90% avec 50 μ M de Féno (Figure 65A). Cette baisse de prolifération, dépendante de la dose, a ensuite été vérifiée par un test de clonogénicité. Une diminution du nombre de colonies est observée et elle s'accroît à mesure que la concentration augmente (Figure 65B). Ces résultats confirment bien les observations précédentes.

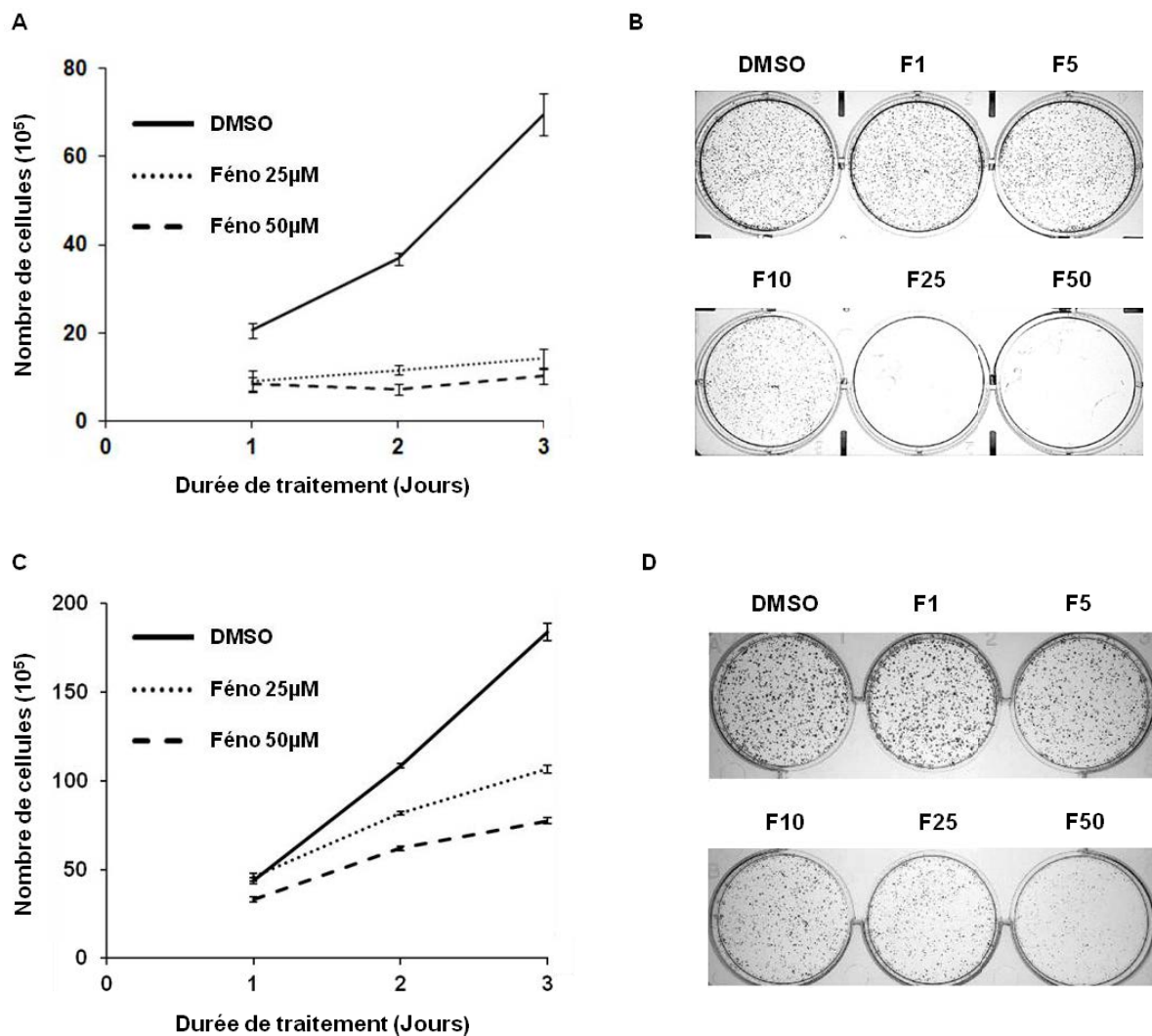


Figure 65 : Diminution de la prolifération cellulaire par Féno

(A et C) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (C) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 0.1% (v/v) de DMSO et par différentes concentrations de Féno (25 μ M et 50 μ M). 4 comptages des cellules vivantes sont effectués chaque jour pour chaque série (n = 3).

(B et D) Les cellules HT29 (B) et HCT116 (D) ont été traitées pendant 7 jours par différentes concentrations de Féno sans changement de milieu, puis les colonies ont été marquées par le bleu de toluidine, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Le Féno a un effet moins marqué sur les cellules HCT116 (Figure 65C). En effet, la diminution de croissance observée avec 25 μ M de Féno n'est significative qu'après 2 jours de traitement. Au 3^e jour, le nombre de cellules n'a baissé que de 40% avec 25 μ M de Féno et de 60% avec 50 μ M de Féno. Il réduit également la formation de colonies de manière dépendante de la concentration (Figure 65D). Différentes études ont également montré que les fibrates présentaient une action anti-cancéreuse, notamment *in vivo*⁷⁷⁻⁸².

De plus, un co-traitement avec un antagoniste de PPAR α , MK886, ne contrecarre pas cette baisse de prolifération induite par Féno dans les deux lignées cellulaires (Figure 66A et C). Ce résultat est également vérifié par un test de clonogénicité (Figure 66B et D).

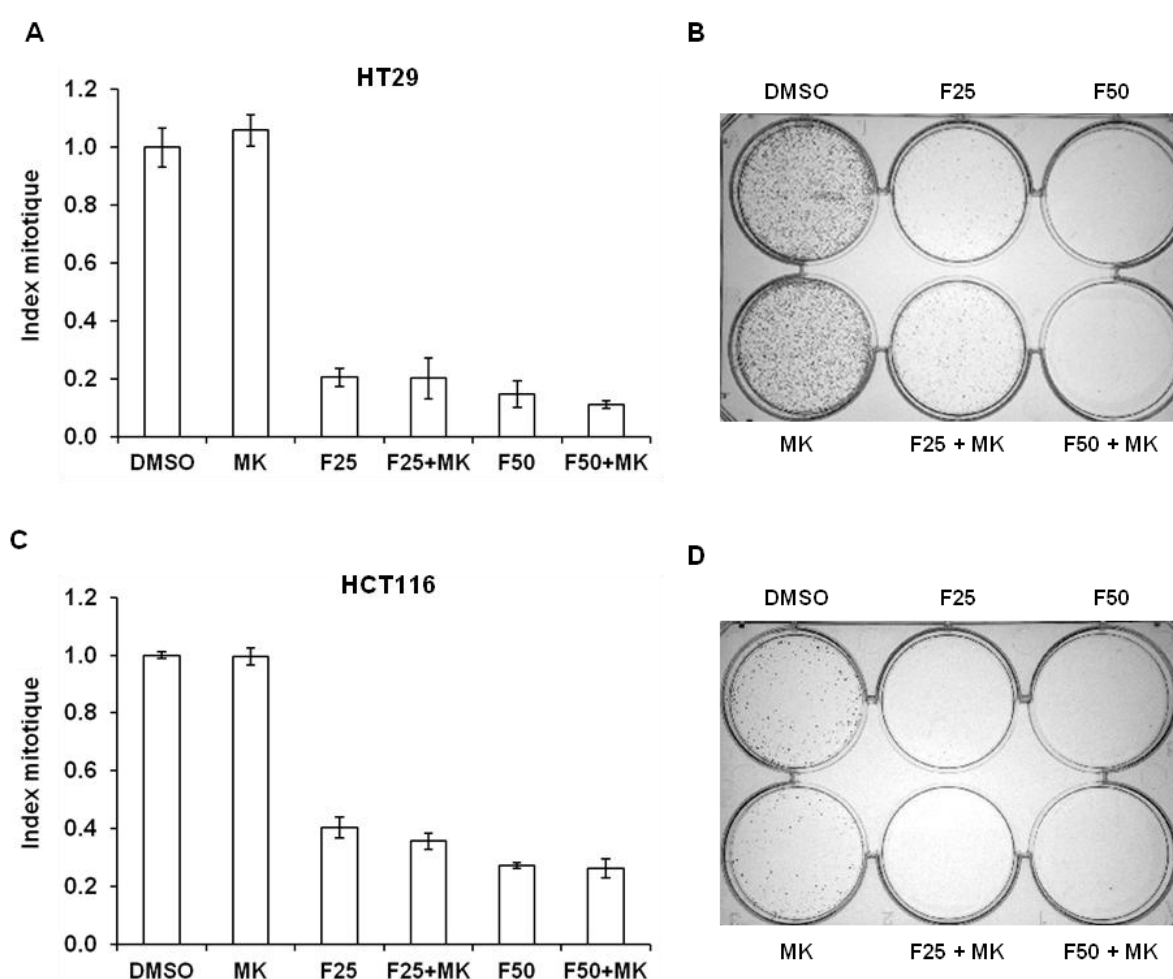


Figure 66 : Diminution de la prolifération cellulaire, induite par Féno, indépendante de PPAR α

(A et C) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (C) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 25 μ M de Féno (F25) et 50 μ M de Féno (F50) en association ou non avec un traitement par 10 μ M de MK886 (MK), un antagoniste de PPAR α . L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules vivantes traitées par Féno, en association ou non avec MK, au nombre de cellules vivantes traitées par le DMSO. 4 comptages sont effectués pour chaque série (n = 3). Il n'existe pas de différence significative (test de Student, $\alpha = 0,05$) entre les cellules traitées par Féno (F25 ou F50) et celles traitées par Féno et MK.

(B et D) Les cellules HT29 (B) et HCT116 (D) ont été traitées pendant 7 jours par 25 μ M ou 50 μ M de Féno, associé ou non à 10 μ M de MK886, sans changement de milieu, puis les colonies ont été marquées par le bleu de toluidine, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Résultats et Discussion

L'inhibition de la prolifération induite par cette molécule serait donc bien indépendante du récepteur PPAR α . Par ailleurs, il a été décrit que le Féno diminuait la prolifération de cellules d'hépatome humain de manière indépendante de PPAR α ⁸⁷.

B. Arrêt du cycle cellulaire par les ligands de PPAR

Afin d'identifier l'origine de l'arrêt de croissance induit par les ligands de PPAR γ , la distribution des cellules, traitées pendant 24 h, dans les différentes phases du cycle cellulaire a été précisée (Tableau 6). Quelle que soit la lignée cellulaire, le traitement par Δ Pio entraîne une accumulation des cellules en phase G0/G1, tandis que les traitements par Pio ou par Δ PGJ2 conduisent à une augmentation du nombre de cellules dans la phase S du cycle cellulaire.

Cet arrêt du cycle a déjà été rapporté suite au traitement par les TZD et la Δ PGJ2³⁵⁵. Il serait principalement provoqué par une hausse de l'expression de p21 et par une réduction de l'expression de c-myc et des différentes cyclines^{85,135,144,148}. Il pourrait également être relatif à un phénomène de différenciation¹⁶³.

		G0/G1	S	G2/M
HT29	DMSO	55.3 \pm 3.7	24.0 \pm 2.9	20.7 \pm 0.9
	Pio	52.8 \pm 1.4	29.1 \pm 2.0	14.6 \pm 1.0
	Δ Pio	67.0 \pm 2.5	21.6 \pm 2.3	8.1 \pm 0.7
	Δ PGJ2	51.1 \pm 3.5	30.0 \pm 2.7	19.0 \pm 3.0
HCT116	DMSO	37.1 \pm 2.3	30.9 \pm 1.0	32.0 \pm 2.6
	Pio	36.2 \pm 2.6	37.4 \pm 4.6	26.3 \pm 4.1
	Δ Pio	41.3 \pm 2.2	30.1 \pm 2.6	28.6 \pm 1.5
	Δ PGJ2	36.0 \pm 2.2	38.0 \pm 1.7	25.9 \pm 1.8

Tableau 6: Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par les ligands de PPAR γ

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 24 h par 0.1% (v/v) de DMSO, 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes. **En gras**, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, Δ Pio ou Δ PGJ2, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Le traitement par Féno induit, quant à lui, une accumulation des cellules HT29 et HCT116 en phase G0/G1 après 24 h ou 48 h de traitement (Tableau 7). Cet arrêt du cycle en phase G0/G1

a été observé dans d'autres modèles tumoraux, et il serait provoqué par une diminution de l'expression des cyclines A et D1, de Cdk1 ou encore de p27^{87,88}.

		24 h			48 h		
		G0/G1	S	G2/M	G0/G1	S	G2/M
HT29	DMSO	61.2 ± 0.7	18.1 ± 1.5	20.7 ± 0.9	59.8 ± 0.5	25.2 ± 1.0	14.5 ± 1.2
	F25	70.8 ± 0.3	14.6 ± 0.7	14.6 ± 1.0	66.9 ± 0.6	19.0 ± 0.6	14.1 ± 0.1
	F50	83.9 ± 0.9	8.0 ± 0.6	8.1 ± 0.7	67.0 ± 2.2	20.1 ± 1.2	12.9 ± 2.0
HCT116	DMSO	62.5 ± 1.2	17.3 ± 0.6	20.1 ± 0.5	58.7 ± 0.6	22.5 ± 0.8	18.9 ± 0.3
	F25	75.1 ± 1.3	10.7 ± 0.1	14.2 ± 0.7	64.5 ± 1.1	17.8 ± 0.1	17.7 ± 1.0
	F50	77.7 ± 1.3	10.5 ± 0.6	11.9 ± 0.8	73.1 ± 0.7	10.3 ± 1.6	16.6 ± 0.9

Tableau 7 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par Féno

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 24 h et 48 h par 0.1% (v/v) de DMSO et par 25µM ou 50µM de Féno (F25 et F50). Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes.

En gras, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

C. Effet des ligands de PPAR sur la mort cellulaire

1. Absence d'induction de la mort cellulaire par apoptose par les ligands de PPAR γ

L'arrêt de croissance, mis en évidence précédemment avec les ligands de PPAR γ , n'est pas corrélé à une baisse de la viabilité cellulaire (Figure 67).

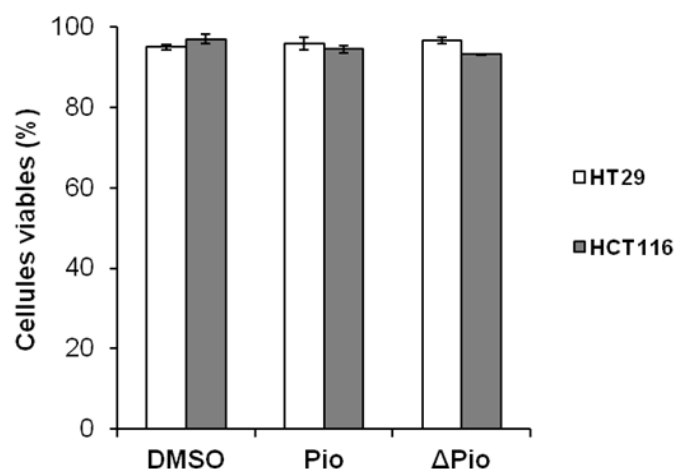


Figure 67 : Absence de diminution de la viabilité cellulaire par les ligands de PPAR γ

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 48 h par 50µM de Pio ou ΔPio. Le pourcentage de cellules viables, c'est-à-dire de cellules négatives à l'IP et positives au DCF-DA, est déterminé selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

Résultats et Discussion

En effet, ces traitements n'induisent aucun processus apoptotique, puisqu'aucun clivage de PARP-1 (pour poly(ADP-ribose) polymérase-1) ou de caspase-3, n'est observé par immunoréplique (Figure 68A). Le clivage de PARP-1 ou de caspase 3 n'est retrouvé que lorsque les cellules sont traitées par la camptothécine (Cpt). Cette molécule a été choisie car elle induit l'apoptose des cellules cancéreuses dérivées d'adénocarcinomes mammaires ou coliques. L'absence d'induction d'apoptose, par les ligands de PPAR γ , est confirmée par l'absence d'accroissement du nombre de noyaux présentant une condensation de la chromatine (Figure 68B). De même, aucune perturbation du potentiel membranaire mitochondrial, mis en évidence par l'utilisation de la sonde JC-1, n'est observée (Figure 68C).

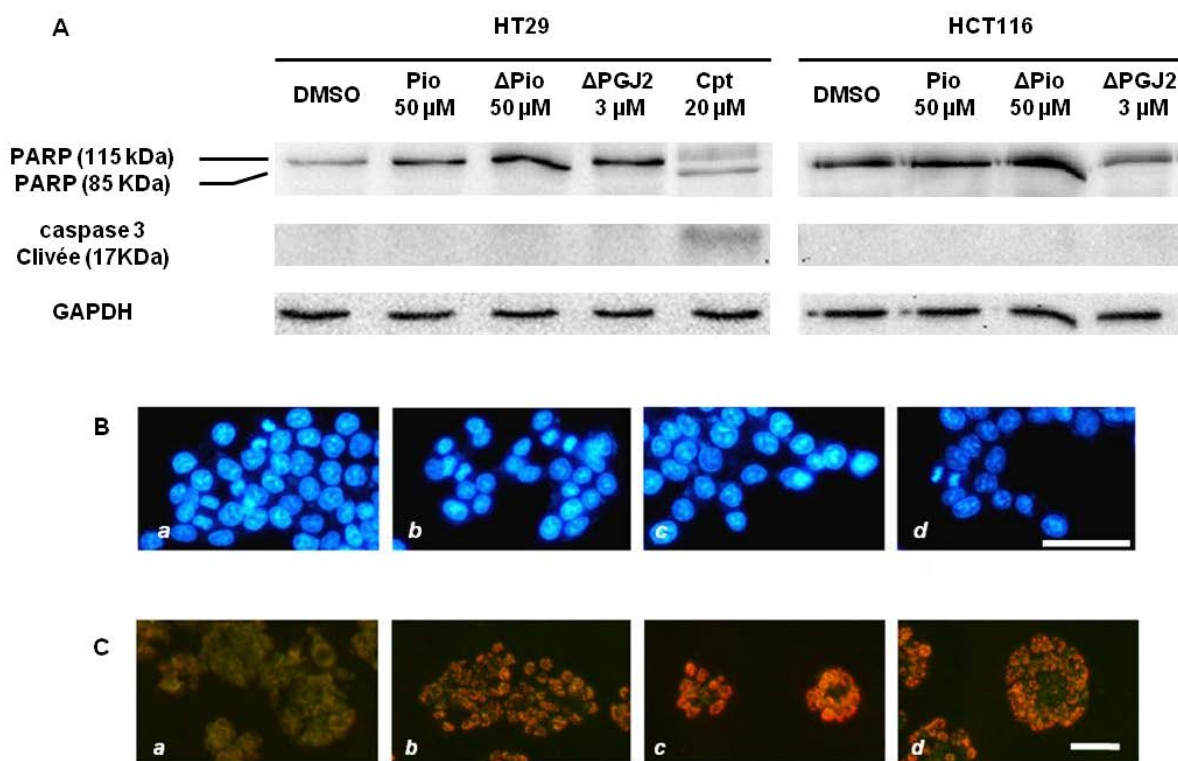


Figure 68 : Absence d'induction de l'apoptose par les ligands de PPAR γ

(A) Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 48 h par 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. Les cellules HT29 ont également été traitées par 20 μ M camptothécine (Cpt), utilisée comme témoin positif. L'immunoréplique a été réalisée, à partir de 25 μ g de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expérience a été réalisée sur 3 séries indépendantes.

(B) Mise en évidence des noyaux par DAPI, après traitement des cellules HT29 par 0.1% DMSO (a), 50 μ M de Pio (b), 50 μ M de Δ Pio (c) et 3 μ M de Δ PGJ2 (d). Le marquage par DAPI est homogène et montre une absence de condensation de la chromatine.

(C) Mise en évidence de la présence du potentiel membranaire mitochondrial (Ψ_m) par JC-1, lors du traitement des cellules HT29 par le DMSO (b), 50 μ M de Pio (c) et 50 μ M de Δ Pio (d), pendant 24 h. La fluorescence orange/rouge indique la présence de Ψ_m . Cette fluorescence est absente lors du traitement des cellules par 50 μ M de CCCP (a), un agent bloquant la génération du potentiel Ψ_m . Les barres d'échelle représentent 50 μ m pour B et C.

Ces résultats sont aussi en accord avec l'absence d'accumulation de cellules en phase sub-G1, observée suite au traitement des cellules HT29 et HCT116 par Pio et Δ Pio (Tableau 8). Enfin, aucune libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire n'est observée après 48 h de traitement, ces molécules sont donc incapables d'induire le phénomène de nécrose (Résultats non présentés).

	Sub-G1	48 h
HT29	DMSO	8.2 ± 0.6
	Pio	8.5 ± 0.3
	Δ Pio	8.9 ± 0.4
HCT116	DMSO	8.1 ± 1.0
	Pio	8.9 ± 1.3
	Δ Pio	9.8 ± 0.8

Tableau 8 : Proportion des cellules traitées par ligands de PPAR γ en phase sub-G1

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 48 h par 0.1% (v/v) de DMSO, 50 μ M de Pio ou Δ Pio. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La proportion de cellules en phase sub-G1 est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes.

En gras, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

L'absence d'apoptose suite au traitement par la Pio diffère des résultats obtenus avec d'autres TZD. Effectivement, certaines provoquent l'apoptose des cellules HT29, HCT116 et d'autres cellules cancéreuses coliques ou prostatiques^{43,131,133,134,354}. En revanche, il a été montré que Pio était capable d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses coliques n'exprimant pas la protéine Rb (SNU-C4 et SNU-C2A)¹³⁵. De plus, elle entraîne l'apoptose de cellules de glioblastome murin en diminuant le potentiel membranaire mitochondrial⁵⁵. Enfin, l'absence d'apoptose, engendrée par le traitement des cellules HT29 et HCT116 par 3 μ M de Δ PGJ2, contraste avec les résultats obtenus à une concentration plus importante (>10 μ M)^{133,134,354}.

2. Absence d'induction de la mort cellulaire par apoptose par Féno

Féno réduit la viabilité des cellules HT29, après 48 h de traitement, de manière modérée à 25 μ M, mais de façon très marquée à 50 μ M (Figure 69A et B). En revanche, ce traitement n'induit pas de modification de la viabilité des cellules HCT116 pour ces mêmes concentrations (Figure 69A). Ces résultats sont confirmés en microscopie (Figure 69B).

Résultats et Discussion

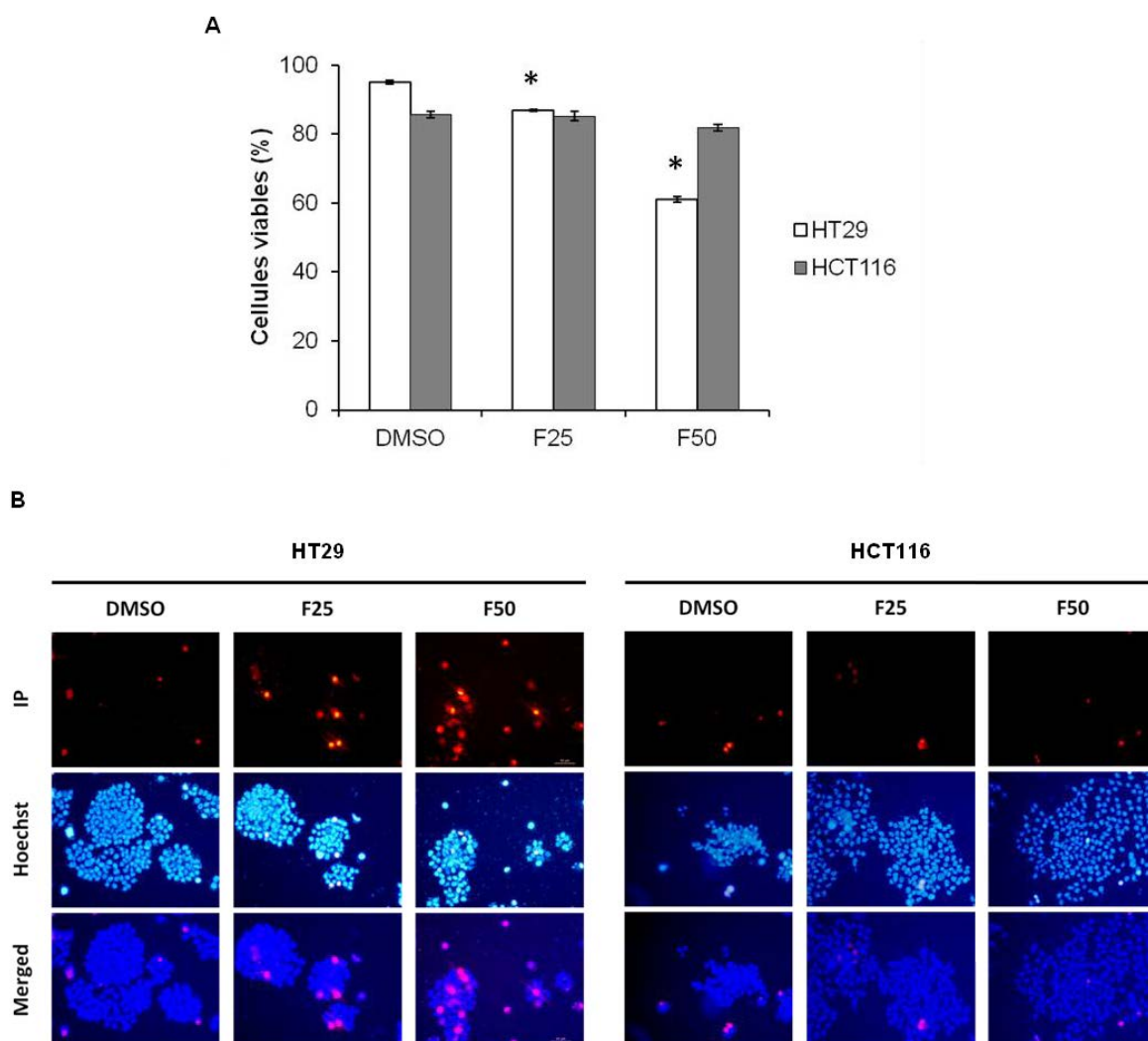


Figure 69 : Diminution de la viabilité cellulaire par le ligand de PPAR α

(A) Les cellules HT29 et HCT116 sont traitées pendant 48h par 25 μ M (F25) et 50 μ M (F50) de Féno. Le pourcentage de cellules viables, c'est-à-dire de cellules négatives à l'IP et positives au DCF-DA, est déterminé selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

(B) Les cellules HT29 et HCT116 sont traitées pendant 48h par 25 μ M (F25) et 50 μ M (F50) de Féno, puis incubées 15 minutes avec 25 μ g/mL d'IP. Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342. Les deux images sont alors superposées (Merged).

La proportion de cellules en phase sub-G1 ne varie pas suite au traitement des cellules HT29 et HCT116 par Féno. Aucune fragmentation nucléaire, synonyme d'apoptose, n'est donc observée. Cela laisse supposer que cette mort cellulaire est provoquée par un mécanisme différent de l'apoptose (Tableau 9).

Sub-G1		24 h	48 h
HT29	DMSO	6.7 ± 1.6	4.66 ± 0.8
	F25	6.2 ± 0.8	4.80 ± 0.8
	F50	7.0 ± 0.6	6.39 ± 1.5
HCT116	DMSO	2.5 ± 0.3	5.46 ± 0.3
	F25	5.6 ± 1.5	6.22 ± 0.9
	F50	6.6 ± 2.0	6.40 ± 0.8

Tableau 9 : Proportion des cellules traitées par Féno en phase sub-G1

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 24 h et 48 h par 0.1% (v/v) de DMSO et par 25µM ou 50µM de Féno (F25 et F50). Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La proportion de cellules en phase sub-G1 est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes.

Aucune différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Cette observation est confirmée par une absence de clivage de la caspase 3 suite au traitement des cellules HT29 par 50µM de Féno (Figure 70). De même, aucune condensation de la chromatine (Figure 71A) et aucune perturbation du potentiel membranaire mitochondrial (Figure 71B) ne sont observées à cette concentration. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les cellules sont traitées par 25µM de Féno. Enfin, il n'entraîne aucune condensation de la chromatine et aucune dépolarisation de la membrane mitochondriale dans les cellules HCT116 (Figure 71A et B). Pourtant, le Féno induit l'apoptose des cellules de médulloblastome et de glioblastome^{83,84}.

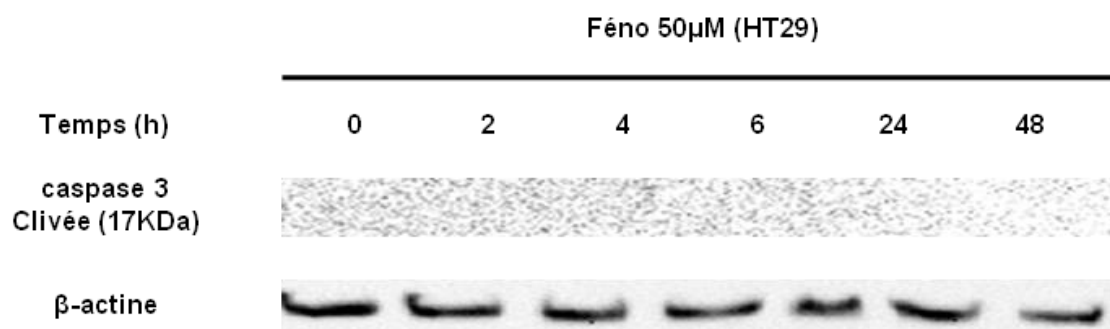


Figure 70 : Absence de clivage de la caspase 3 par le ligand de PPARα

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 48 h par 50µM de Féno. L'immunoréplique a été réalisée, à partir de 25 µg de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expérience a été réalisée sur 3 séries indépendantes.

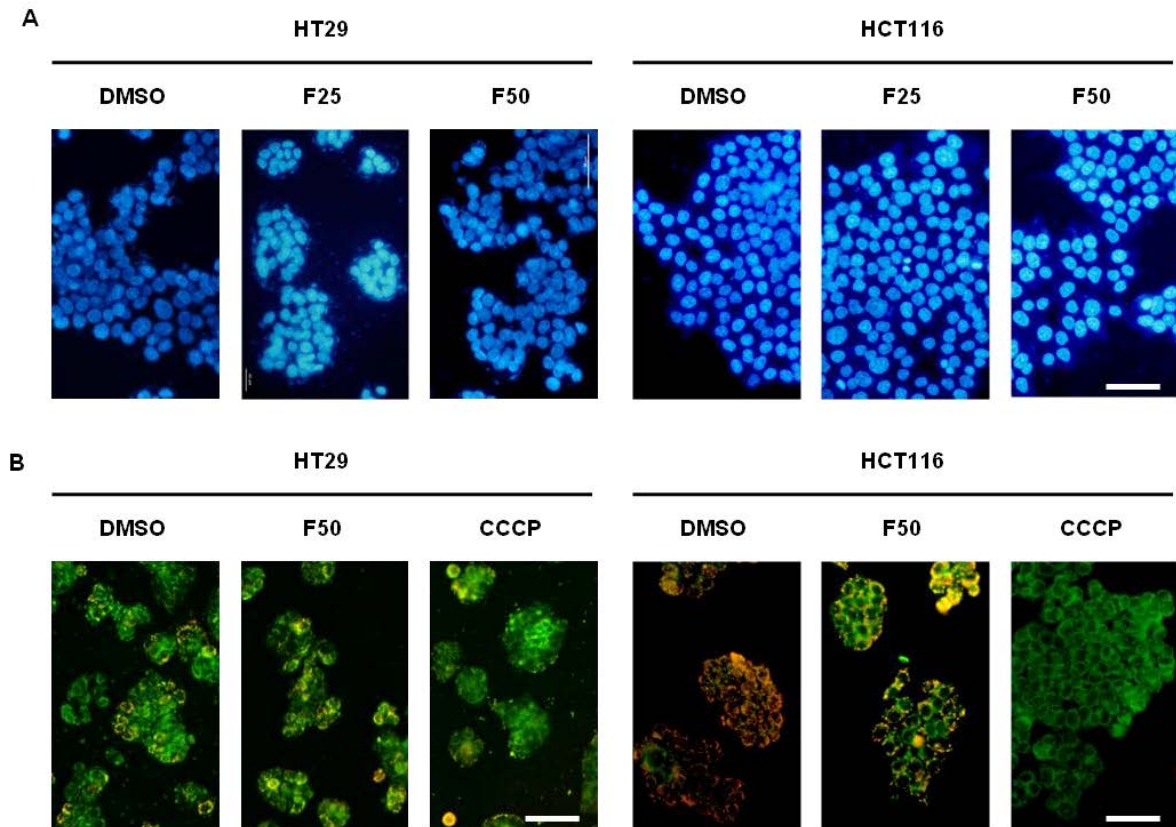


Figure 71 : Absence d'induction de condensation de la chromatine et de dépolarisation de la membrane mitochondriale par Féno

(A) Mise en évidence des noyaux par DAPI, après traitement des cellules HT29 et HCT116 par 0.1% de DMSO, 25 μ M (F25) ou 50 μ M (F50) de Féno pendant 48 h. Le marquage par DAPI est homogène et montre une absence de condensation de la chromatine.

(B) Mise en évidence de la présence du potentiel membranaire mitochondrial (Ψ_m) par JC-1, lors du traitement des cellules HT29 et HCT116 par 0.1% de DMSO ou 50 μ M (F50) de Féno pendant 3 h. La fluorescence orange/rouge indique la présence de Ψ_m . Ce potentiel est absent lors du traitement des cellules par 50 μ M de CCCP. Les barres d'échelle représentent 50 μ m pour B et C.

D. Induction du phénomène d'autophagie

1. Action des ligands de PPAR γ

Le Féno diminue la viabilité des cellules HT29 sans induire leur apoptose. L'autophagie est à l'origine un mécanisme de survie cellulaire, mais si son activation est trop importante, elle peut aboutir à une mort cellulaire indépendante de l'apoptose. Il a d'ores et déjà été démontré que des agents anticancéreux, tels que la rapamycine, pouvaient induire une mort cellulaire autophagique³⁵⁶. Par exemple, l'étoposide et la staurosporine provoquent une mort cellulaire autophagique dans les cellules embryonnaires de souris (MEF) double KO pour les protéines pro-apoptotiques Bad^{-/-} et Bax^{-/-}. Cette baisse de la viabilité, mise en évidence par une perméabilisation à l'IP, n'est pas associée à une condensation de la chromatine ou à une fragmentation de l'ADN³⁵⁷.

L'induction du phénomène d'autophagie a donc été étudié dans les cellules HT29 et HCT116

traitées par Féno. Pour cela, l'acridine orange a été utilisée, car elle permet de mettre en évidence les vésicules acides par une coloration orangée (Figure 72). La formation de ces vésicules acides, probablement autophagiques, a été détectée dès le 1^{er} jour de traitement des cellules HT29 par 25µM ou 50µM de Féno. Ce phénomène persiste jusqu'au 3^e jour de traitement (Figure 72A). L'analyse par cytométrie en flux a confirmé ces résultats (Figure 72B). Le traitement par 50µM de Féno induit une formation de vésicules acides plus importante que celle observé avec 25µM de Féno. Les traitements par Féno entraînent également la formation de ces vésicules acides dans les cellules HCT116 après 3 jours de traitement (Figure 72A et B).

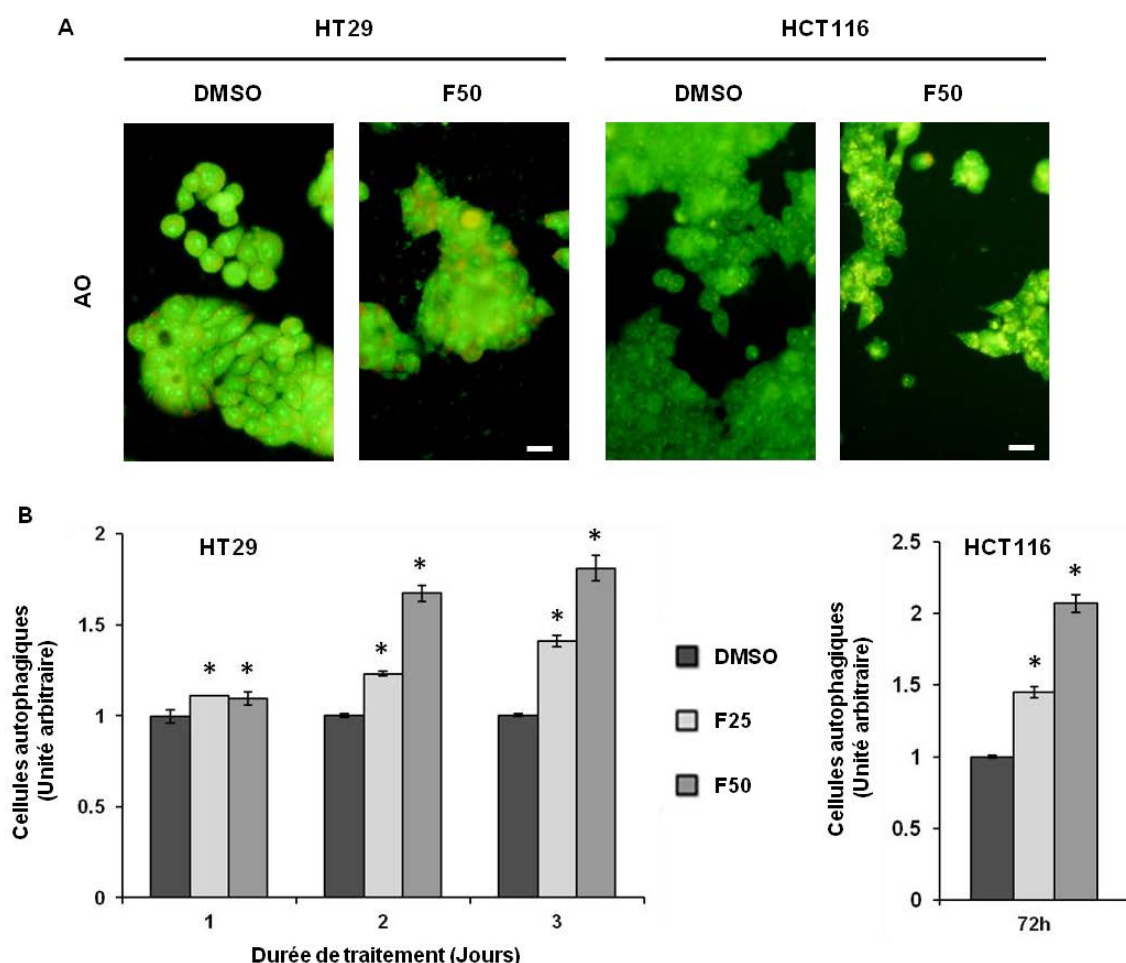


Figure 72 : Induction de la formation de vésicules acides par Féno

(A) Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées par 50µM de Féno pendant 3 jours. Après traitement, 1 µg/ml d'acridine orange a été ajouté au milieu de culture, pendant 15 min, avant observation au microscope selon les procédures décrites dans la section **Matériel et Méthodes**.

(B) Les cellules HT29 ont été traitées pendant 1, 2 ou 3 jours par 25µM (F25) ou 50µM (F50) de Féno, tandis que les cellules HCT116 ont été traitées uniquement pendant 3 jours, avant analyse par cytométrie en flux. Les cellules sont alors incubées avec l'acridine orange selon le protocole décrit précédemment. Les résultats représentent le rapport entre la fluorescence orange détectée dans les cellules traitées par Féno et celle obtenue lorsque les cellules sont traitées par le DMSO, pour chaque durée de traitement. Les résultats ont été obtenus sur 3 séries indépendantes, pour un total de 6 échantillons par traitement.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Résultats et Discussion

Il est important de noter que grâce à la cytométrie en flux, il a pu être montré que ces traitements augmentaient considérablement la granulométrie cellulaire (Résultats non présentés).

Ensuite, l'expression de Beclin-1, protéine impliquée dans la formation de l'autophagosome, a été évaluée par immunoréplique dans les cellules traitées par 50 μ M de Féno. A cette concentration, ce dernier induit l'expression de Beclin-1 dès 6 h de traitement, expression qui se maintient après 24 h dans les cellules HT29 (Figure 73). Dans ces cellules, l'étude par immunoréplique n'a pas pu être réalisée pour des temps plus longs (48 et 72 h), car le marquage de la protéine de ménage (β -actine) était trop diminué. Le traitement des cellules HCT116 par Féno induit l'expression de Beclin-1 uniquement à partir de 48 h (Figure 73). L'autophagie induite par Féno a déjà été décrite dans les cellules ARPE-19, un modèle d'épithélium pigmenté de la rétine, en conditions hyperglycémique et hypoxique³⁵⁸.

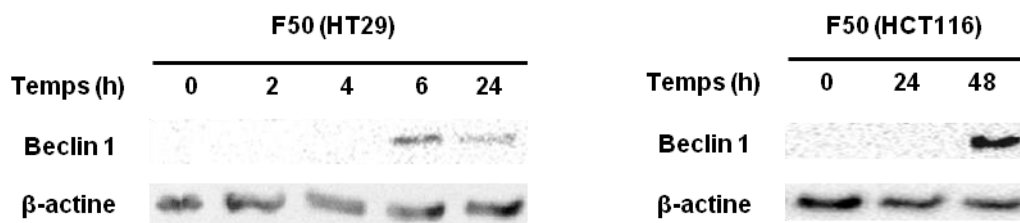


Figure 73 : Induction de l'expression de Beclin-1 par Féno

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 2, 4, 6 et 24 h par 50 μ M de Féno et les cellules HCT116 pendant 24 h et 48 h par 50 μ M de Féno. L'expression de Beclin-1 est étudiée par immunoréplique selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

2. Action du Féno

L'autophagie a également été étudiée suite au traitement des cellules HT29 et HCT116 par Pio et Δ Pio (Figure 74). L'observation du marquage par l'acridine orange, au microscope, révèle la présence de vésicules acides dans les cellules HCT116 traitées par Pio et Δ Pio après 3 jours de traitement (Figure 74A). Le même résultat est obtenu avec les cellules HT29 (Résultats non présentés). Cette acidification a aussi été quantifiée par une technique de cytométrie en flux. L'analyse montre une augmentation de la formation de vésicules acides dans les cellules HT29 (Figure 74B) et HCT116 (Figure 74C) après 24 h de traitement par Δ Pio. La formation de ces vésicules n'est retrouvée qu'après 3 jours de traitement par Pio. Afin de confirmer la nature de ces vésicules acides, l'expression de Beclin-1 a été évaluée suite au traitement des cellules HT29 (Figure 74D) et HCT116 (Figure 74E) par Pio et Δ Pio. Dans les deux lignées cellulaires, Δ Pio induit fortement l'expression de Beclin-1, dès le 1^{er} jour de traitement (Figure 74D et E). En revanche, Pio entraîne l'expression de cette protéine

de manière croissante du 1^{er} au 3^e jour dans les cellules HT29 (Figure 74D) et uniquement le 3^e jour dans les cellules HCT116 (Figure 74E).

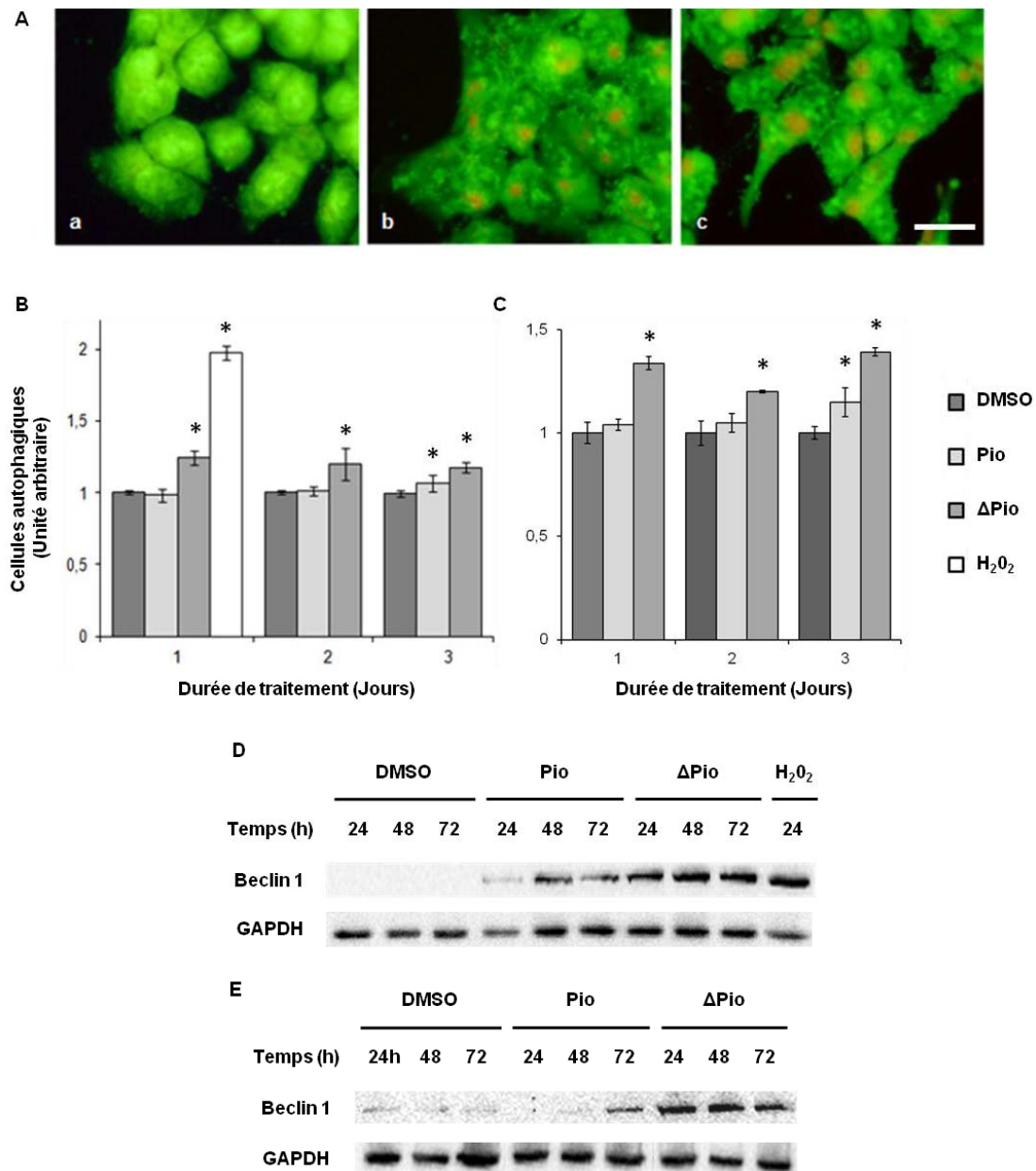


Figure 74 : Induction de l'autophagie par Pio et ΔPio

(A) Les cellules HCT116 ont été traitées par 0.1% (v/v) de DMSO (a) et par 50μM de Pio (b) ou ΔPio (c), pendant trois jours. Après traitement, 1 μg/ml d'acridine orange a été ajouté au milieu de culture, pendant 5 min, avant observation au microscope.

(B et C) Les cellules HT29 (B) et HCT116 (C) ont été traitées pendant 1, 2 ou 3 jours par 50μM de Pio ou ΔPio avant addition dans le milieu de 1 μg/mL d'acridine orange. Après 15 minutes d'incubation, les cellules sont remises en suspension puis analysées par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage et représentent le rapport entre la fluorescence détectée dans les cellules traitées par Pio ou ΔPio et celle obtenue lorsque les cellules sont traitées par le DMSO, pour chaque durée de traitement. Les résultats ont été obtenus sur 3 séries indépendantes, pour un total de 6 échantillons par traitement. Le traitement de 24 h par 500μM de H₂O₂ est utilisé comme contrôle positif.

(D et E) Les cellules HT29 (D) et HCT116 (E) ont été traitées pendant 24, 48 et 72 h par 50μM de Pio ou ΔPio. L'expression de Beclin-1 est étudiée par immunoréplique selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes. Le traitement par 1 μM H₂O₂ a été utilisé comme contrôle positif.

L'induction de l'autophagie par les TZD a déjà été décrite dans d'autres lignées cellulaires cancéreuses^{160,356}.

E. Induction d'un stress oxydant par les ligands de PPAR

1. Induction d'un stress oxydant par les ligands de PPAR γ

a. Production de ROS et de RNS

La production accrue d'espèces réactives peut être à l'origine d'un arrêt de croissance des cellules⁵⁵, mais également de l'induction du processus autophagique²⁰⁵.

Ainsi, la génération de ROS a été recherchée, par une technique de cytométrie en flux, dans les cellules HT29 ou HCT116 traitées par Pio, Δ Pio ou Δ PGJ2. Ces espèces réactives sont détectées dès 5 min de traitement par Pio et Δ Pio. La production de ROS est maximale après 15 min, puis reste constante entre 30 min et 1 h, quelles que soient les cellules testées (Figure 75A et C). La génération de ROS, après 15 min de traitement, a été confirmée par une technique cytologique réalisée avec les cellules HT29 (Figure 75E). Pio et Δ Pio ayant une action similaire, la production de ROS serait indépendante du récepteur PPAR γ . A l'inverse, le traitement par la Δ PGJ2 ne génère pas de ROS (Figure 75A, C et E). Le taux est même plus faible dans les cellules HT29 traitées par Δ PGJ2 que dans celles traitées par le DMSO (Figure 75A). La production de ROS a également été étudiée pour des temps plus longs. Le contenu en ROS reste globalement constant entre 1 h et 2 h de traitement dans les cellules HT29 traitées par Pio ou Δ Pio (Figure 75B). En revanche, une forte diminution des ROS est observée après 4 h de traitement par Δ Pio, suivie d'une forte production de ROS qui atteint un maximum après 8h. Cette production baisse ensuite légèrement jusqu'à 24 h de traitement. Dans les cellules HT29 traitées par Pio, une réduction des ROS est observée entre 2 h et 6 h de traitement, pour aboutir à un taux inférieur à celui retrouvé dans les cellules témoins. Il s'en suit un léger accroissement, pour atteindre après 8h une valeur égale à celle observée dans les cellules témoins. Puis, le taux de ROS diminue progressivement jusqu'à 24 h. Cette réponse biphasique observée dans les cellules HT29 traitées par Pio et Δ Pio pourrait être le résultat de la mise en place de la réponse antioxydante cellulaire. Cet effet biphasique est aussi retrouvé dans les cellules HCT116 traitées par Pio et Δ Pio pour des temps d'incubation supérieurs à 2 h (Figure 75D). Néanmoins, il est important de noter que cet effet est nettement moins marqué que dans les cellules HT29. Ainsi, quelle que soit la durée de traitement, le contenu en ROS des cellules HCT116 traitées par Pio et Δ Pio est nettement supérieur à celui retrouvé dans les cellules témoins.

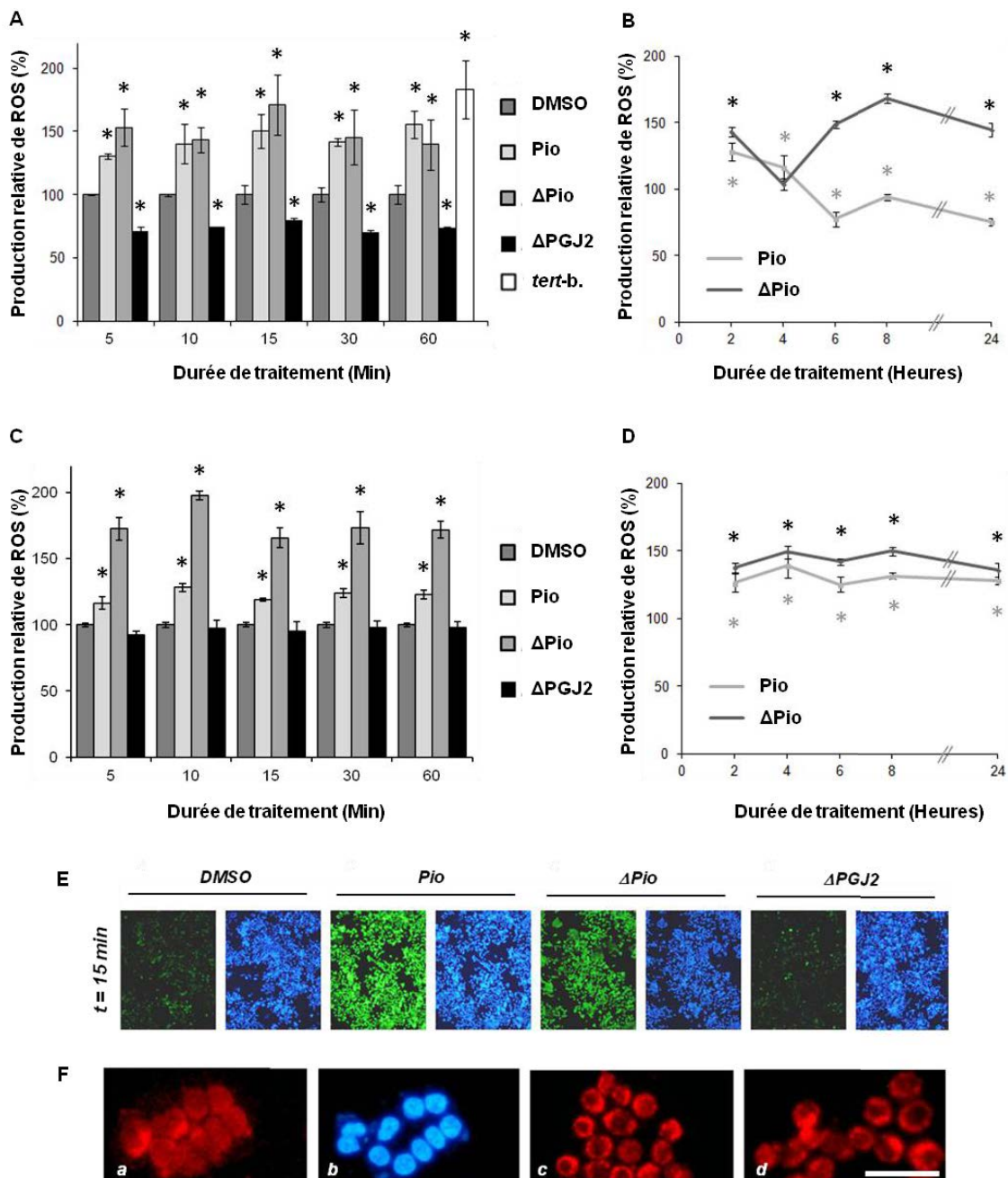


Figure 75 : Production de ROS induite par Pio et ΔPio

(A – D) La génération de ROS a été mesurée après traitement des cellules HT29 (A et B) et HCT116 (C et D) par 0.1% (v/v) de DMSO, 50μM de Pio ou ΔPio et 3μM de ΔPGJ2 pour des temps variant jusqu'à 24 h. La génération de ROS a été mise en évidence par une technique de cytométrie en flux, en utilisant la sonde DCF-DA selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Le traitement par 1mM de *tert*-butyl hydroperoxyde (*tert*-butyl; A) a été utilisé comme générateur de ROS. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins non traitées. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes. *, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, ΔPio ou ΔPGJ2, et celles obtenues lorsque les cellules ne sont pas traitées.

(E) Mise en évidence de la génération de ROS, par le DCF-DA (en vert), dans les cellules traitées pendant 15 min par Pio, ΔPio et ΔPGJ2. Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342 (en bleu). (F) Mise en évidence de la production d'anions superoxydes, par marquage avec la sonde Mitosox, dans les cellules traitées par 0.1% (v/v) de DMSO (a et b), 50μM de Pio (c) ou 50μM de ΔPio (d). Le marquage est diffus dans les cellules témoins (a) et forment un anneau fluorescent dans les cellules traitées (c et d). b, contre coloration avec Hoeschst 33342, mettant en évidence les noyaux des cellules HT29. Les barres d'échelle représentent 200 μm pour E et 25 μm pour F.

Résultats et Discussion

Afin d'identifier quelles espèces réactives oxygénées particulières sont produites suite au traitement par les ligands de PPAR γ , les cellules HT29 et HCT116 sont prétraitées par la parabenzoquinone, un piège à anions superoxydes, ou par le D-mannitol, un piège à radicaux hydroxyls. Ces deux antioxydants diminuent partiellement la production de ROS induite par les ligands de PPAR γ (Tableau 10). Pio et Δ Pio induisent donc la production d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyls dans ces cellules. De plus, l'augmentation d'anions superoxydes, au cours du traitement des cellules HT29 par Pio et Δ Pio a été confirmée *in cellulo*, grâce à la sonde fluorescente MitoSox (Figure 75F).

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 \pm 9.2	100.0 \pm 2.8
D-Mannitol	55.0* \pm 1.9	71.2* \pm 1.3
<i>p</i> -benzoquinone	74.1* \pm 5.4	53.8* \pm 3.7
Pio	152.0* \pm 4.2	124.5* \pm 4.5
Pio + D-Mannitol	133.5# \pm 1.9	103.4# \pm 2.3
Pio + <i>p</i> -benzoquinone	109.1# \pm 3.8	75.0# \pm 3.8
Δ Pio	171.8* \pm 6.0	147.7* \pm 4.6
Δ Pio + D-Mannitol	118.2# \pm 2.3	94.5# \pm 3.2
Δ Pio + <i>p</i> -benzoquinone	122.6# \pm 7.2	94.8# \pm 5.8

Tableau 10 : Impact des antioxydants sur la production de ROS induite par Pio et Δ Pio

La génération d'espèces réactives a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 et HCT116 prétraitées 1 h par 1mM de D-Mannitol et 10 μ M de parabenzoquinone, puis traitées 15 min par 50 μ M de Pio ou Δ Pio. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, Δ Pio ou les antioxydants seuls et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés aux différents antioxydants.

La quantité de RNS a aussi été évaluée suite au traitement des cellules HT29 ou HCT116 par les ligands de PPAR γ (Figure 76A et B). Les traitements par Pio ou Δ Pio génèrent une production de RNS dans ces deux modèles cellulaires. Plus précisément, le taux de RNS est maximal après 6 h de traitement dans les cellules HT29 et après 4 h dans les cellules HCT116. Le contenu en RNS reste quasiment constant jusqu'à 24 h de traitement. Ce résultat est confirmé par l'accroissement de la proportion de résidus tyrosine nitrosylés dans les cellules

HT29 suite au traitement de 24 h par Pio (Figure 76C et D). Il est important de noter que la production de RNS est plus marquée dans les cellules traitées par Δ Pio que dans celles traitées par Pio (Figure 76A et B). Par ailleurs, la production de RNS est plus précoce dans les cellules HCT116 que dans les cellules HT29, et l'effet de la Pio y est plus marqué (Figure 76B). En revanche, le traitement des cellules HT29 ou HCT116 par la Δ PGJ2 pendant 24 h diminue significativement le taux de RNS (Figure 76A et B).

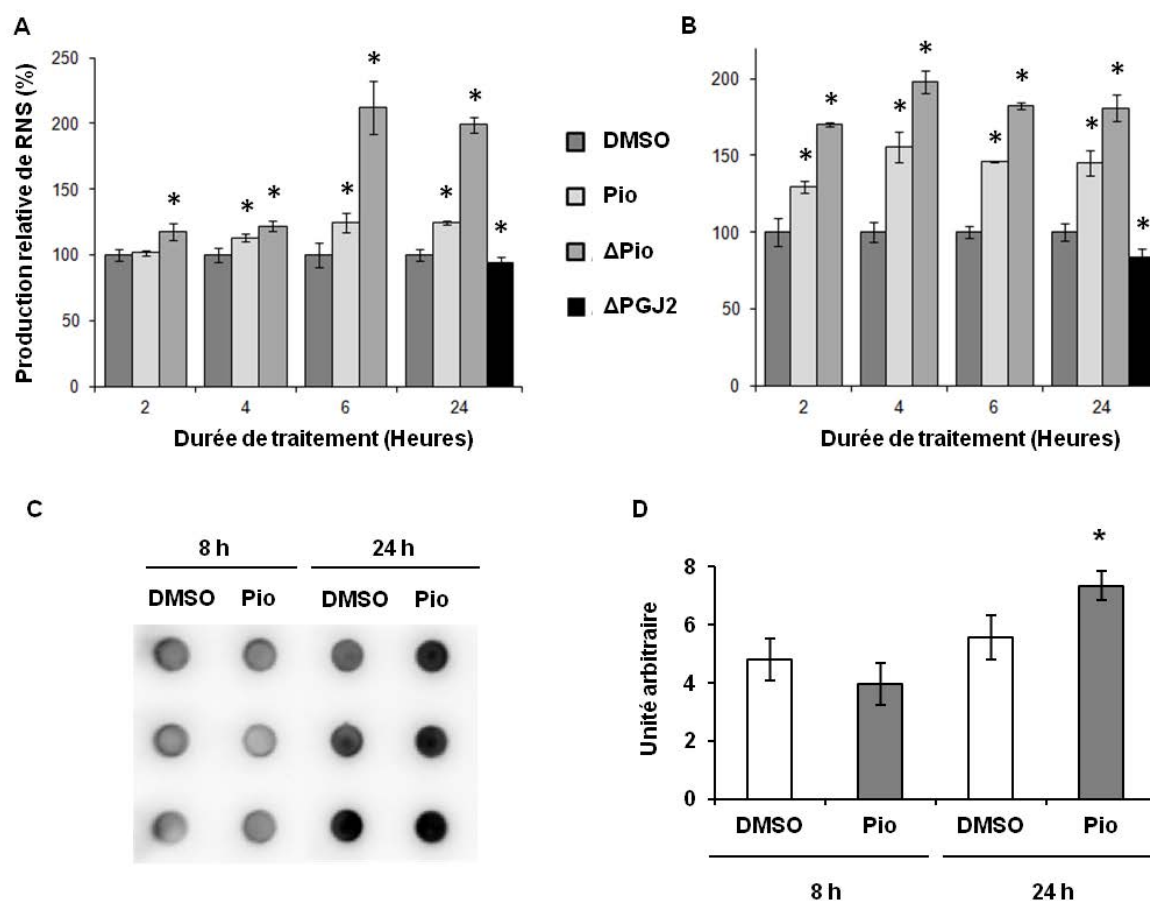


Figure 76 : Production de RNS par Pio et Δ Pio

(A et B) La génération de RNS a été mesurée après traitement des cellules HT29 (A) et HCT116 (B) par 0.1% (v/v) de DMSO, 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. La génération de RNS a été mise en évidence par une technique de cytométrie en flux en utilisant la sonde DAF2-DA, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

(C et D) *Dot blotting* réalisé à partir d'homogénats protéiques de cellules HT29 traitées par 50 μ M de Pio pendant 8 h et 24 h, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résidus NO-Tyrosine sont détectés en utilisant la procédure de *Western Blotting*. Les champs sont quantifiés en utilisant le logiciel Quantity One (BioRad). L'expérience a été réalisée deux fois et les histogrammes (D) représentent la moyenne \pm écart-type de 6 champs par condition.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, Δ Pio ou Δ PGJ2, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Enfin, l'utilisation de la sonde DHR n'a pas permis de mettre en évidence la production de peroxyde nitrique dans ces deux lignées cellulaires (Figure 77A et B). Les ligands de PPAR γ induiraient donc une production majoritaire d'oxyde nitrique.

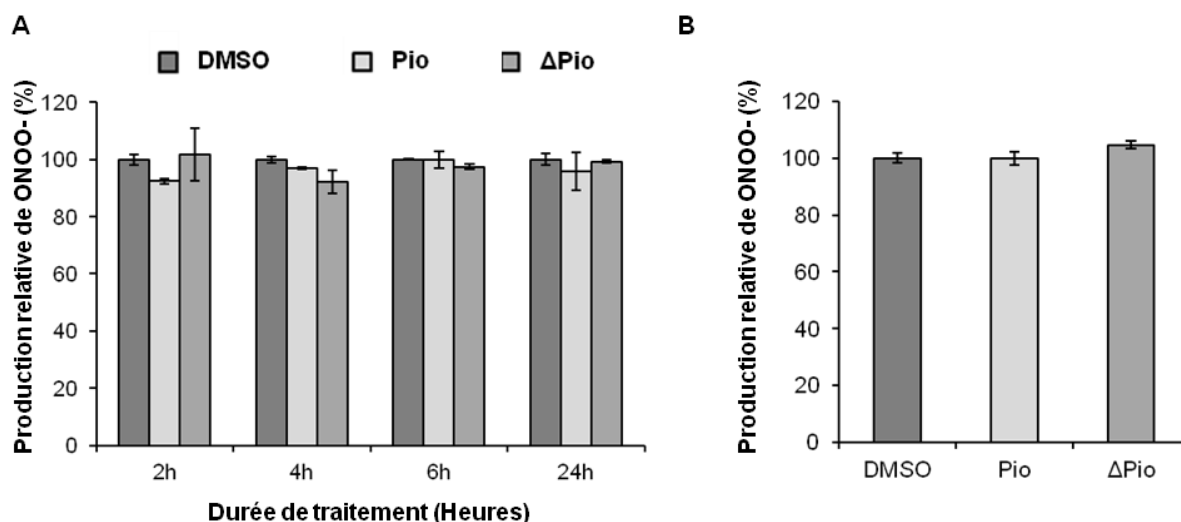


Figure 77 : Absence de production de peroxyde nitrique par Pio et Δ Pio

(A et B) La génération de ONOO⁻ a été mesurée après traitement en cinétique des cellules HT29 (A) ou après un traitement des cellules HCT116 pendant 24 h (B) par 0.1% (v/v) de DMSO, 50 μ M de Pio et Δ Pio. Pour cela, une technique de cytométrie en flux, avec la sonde DHR, a été utilisée selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

Pas de différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio et Δ Pio et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Plusieurs études ont montré que le traitement par les TZD génère des espèces réactives^{239,359,360}. Pio pourrait générer ces dernières en se liant à la protéine mitochondriale Mitoneet⁵⁵. En revanche, l'effet protecteur induit par la Δ PGJ2 contraste avec sa capacité à induire un stress oxydant dans des cellules de neuroblastome²⁶⁶.

b. Implication de PPAR γ dans la production du stress oxydant

L'implication du récepteur PPAR γ dans la production du stress oxydant induit par ses ligands a été évaluée (Figure 78). Les cellules ont été prétraitées par 10 μ M de GW9662, un antagoniste de PPAR γ . Le prétraitement par cet antagoniste ne modifie pas le taux de ROS (Figure 78A et C), mais diminue le taux de RNS (Figure 78B et D) dans les deux lignées cellulaires. Mais, puisque GW9662 est capable de réduire significativement le taux de RNS (Figure 78B et D), il est probable que cet antagoniste de PPAR γ joue un rôle protecteur vis-à-vis de ces espèces réactives, de manière indépendante du récepteur. La production de ROS et de RNS par Pio et Δ Pio serait donc tout de même indépendante du récepteur PPAR γ .

Nos résultats confirment la génération d'un stress oxydant par les TZD, de manière indépendante du récepteur PPAR γ ⁵⁵.

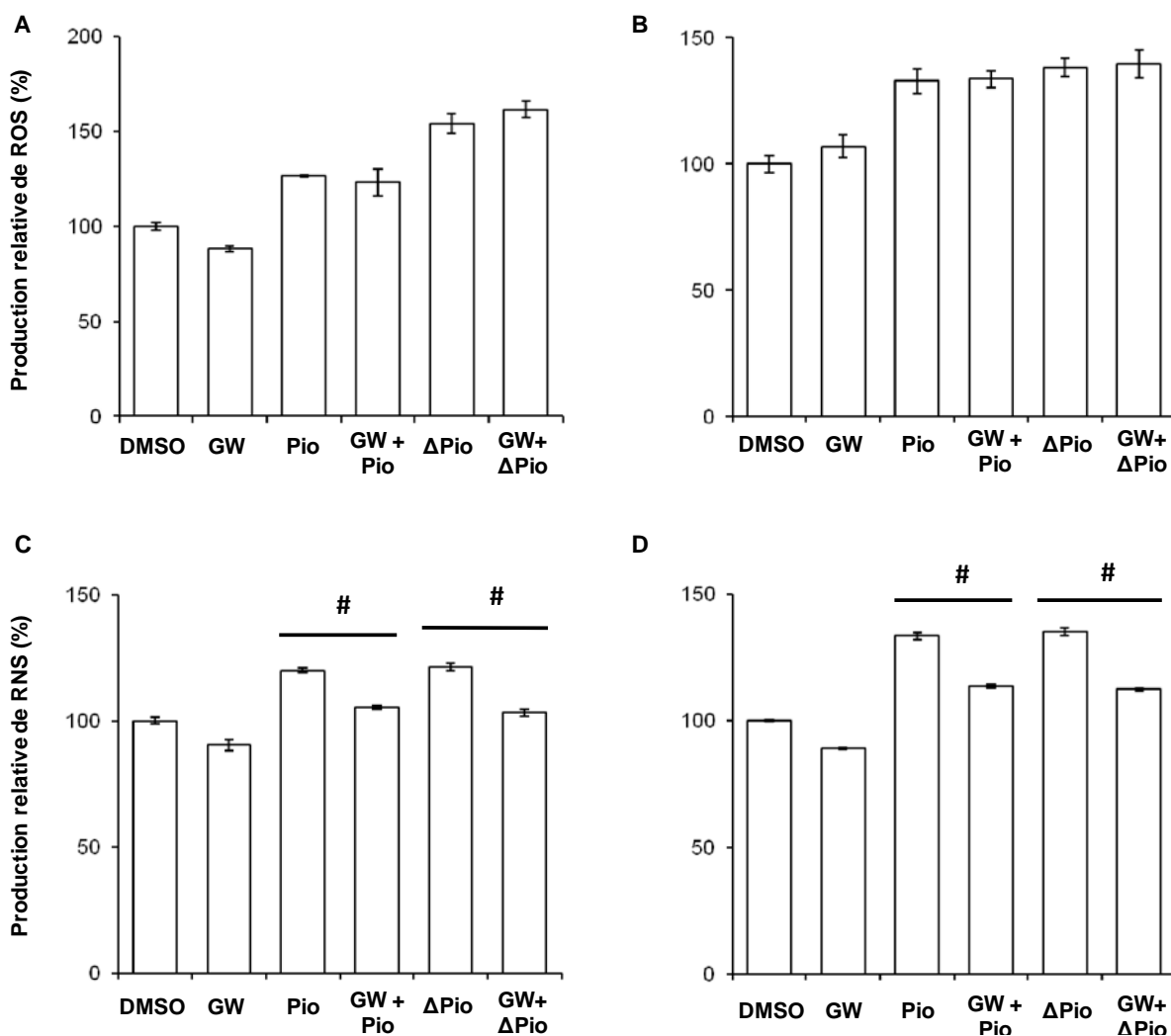


Figure 78 : Production d'espèces réactives induite par Pio et Δ Pio indépendante de PPAR γ

(A - D) La génération d'espèces réactives a été mesurée, comme précédemment (Figure 75 et Figure 76), dans les cellules HT29 (A et C) et HCT116 (B et D). Ces dernières ont été prétraitées 1 h par 10 μ M de GW9662 (GW), un antagoniste de PPAR γ , puis traitées 15 minutes pour les ROS ou 24 h pour les RNS par 50 μ M de Pio et Δ Pio. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à GW9662.

c. Origine des espèces réactives

Afin d'identifier l'origine des espèces réactives induites par les ligands de PPAR γ , les cellules HT29 (Figure 79A, C et E) et HCT116 (Figure 79B, D et F) ont été prétraitées 1 h par 50 μ M de carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, Figure 79A et B) ou par 10 μ M de NS398 (NS, Figure 79C et D). CCCP est un inhibiteur de la phosphorylation oxydative, et NS398 un inhibiteur de COX2, une enzyme fortement exprimée dans les cancers coliques.

Ces prétraitements contrecarrent partiellement la production de ROS induite par Pio et Δ Pio (Figure 79A à D).

Résultats et Discussion

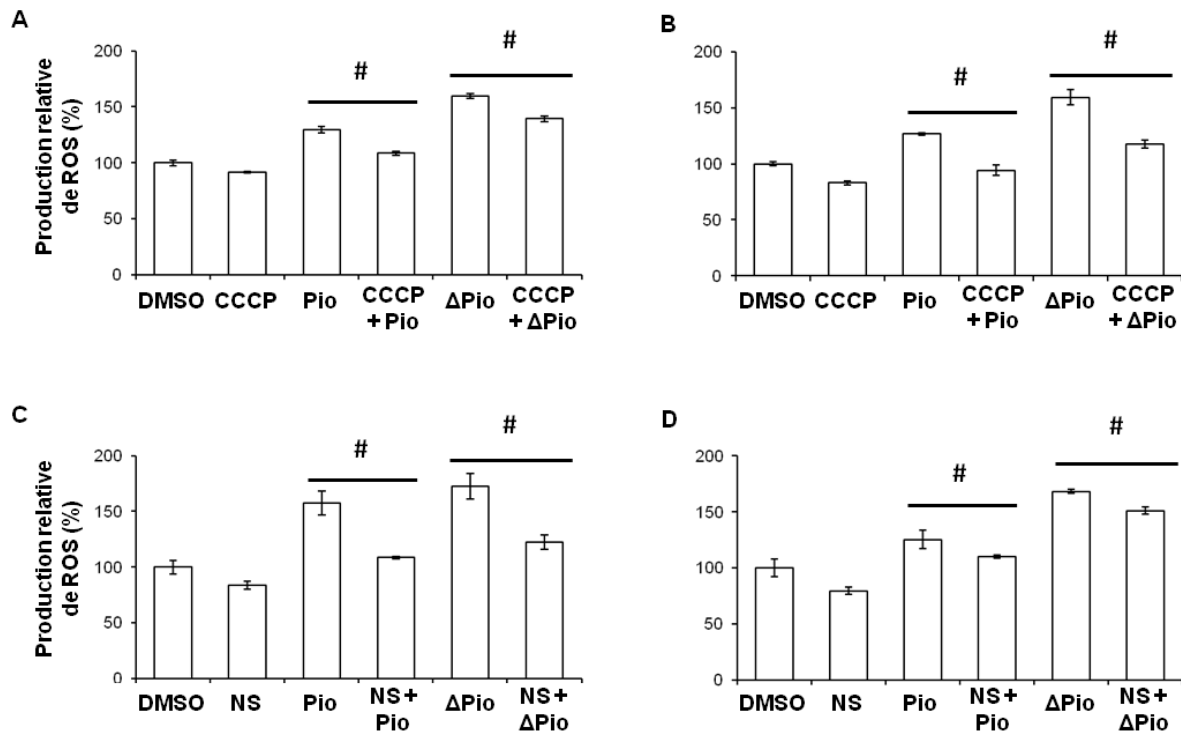


Figure 79 : Origine des ROS induits par les ligands de PPAR γ

(A – D) La génération de ROS (A à D) a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 (A et C) et HCT116 (B et D) suite à des prétraitements de 1h par 50 μ M de CCCP (A et B) ou par 10 μ M de NS398 (NS, C et D), puis traitées par 50 μ M de Pio ou Δ Pio pendant 15 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à un inhibiteur.

Dans les cellules HT29, le NS398 a un effet protecteur plus important que le CCCP, tandis que dans les cellules HCT116, la situation est inversée. Par conséquent, les ROS induits par les ligands de PPAR γ sont d'origine mitochondriale et issus de la réaction catalysée par l'enzyme COX2. La prépondérance de chaque mécanisme varie en fonction de la lignée cellulaire. En effet, COX2 pourrait jouer un rôle plus important dans les cellules HT29 en raison de son expression constitutive³⁶¹. D'autres enzymes oxygénases pourraient également jouer un rôle dans ce phénomène, comme les LOX ou les POX. Effectivement, ces dernières semblent être impliquées dans le stress oxydant induit par les TZD^{269,270}.

De surcroît, le prétraitement des cellules par 1mM de L-NAME (L-N^G-Nitroarginine methyl ester ; L-N, Figure 80A et B), un inhibiteur de l'enzyme iNOS, contrecarre partiellement la production de RNS induite par Pio et Δ Pio, dans les deux lignées cellulaires. Ce résultat suggère qu'il pourrait exister une autre source de RNS que l'enzyme iNOS. Par exemple, des RNS peuvent être produits au sein des peroxysomes, suite à l'action de la xanthine oxydase³⁶².

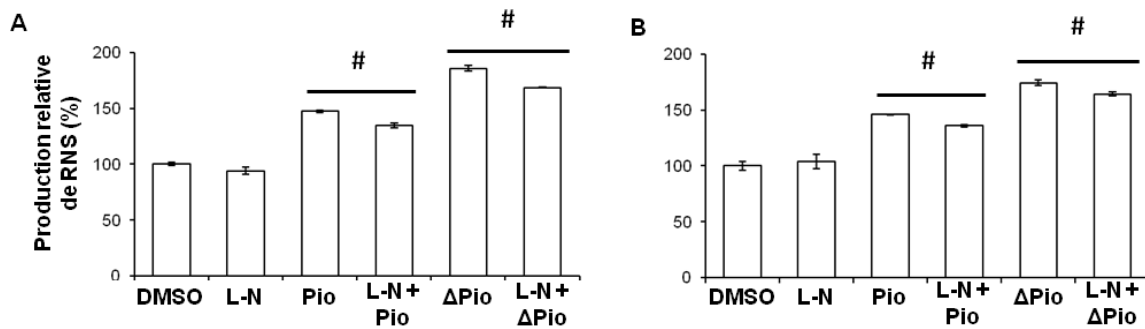


Figure 80 : Origine des RNS induits par les ligands de PPAR γ

(A – B) La génération de RNS a été mesurée, comme précédemment (Figure 76), suite au traitement des cellules HT29 (B) et HCT116 (D) par 50 μ M de Pio ou Δ Pio pendant 24 h et à l’addition de 1mM de L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-N) les 3 dernières heures de traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L’expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à L-NAME.

L’implication d’iNOS dans la production de RNS induite par Pio et Δ Pio est confortée par l’augmentation de son expression dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 81). Bien que la Δ PGJ2 n’induit pas de production de RNS, elle induit un accroissement de l’expression d’iNOS dans les deux lignées cellulaires (Figure 81). Ces résultats ne coïncident pas avec la diminution de l’expression d’iNOS décrite, suite à l’activation de PPAR γ , dans d’autres modèles cellulaires^{253–256}. L’augmentation de l’expression de cette enzyme par les ligands de PPAR γ est plus importante dans les cellules HT29, où cette enzyme est inductible, que dans les cellules HCT116, où son expression est constitutive³⁶¹.

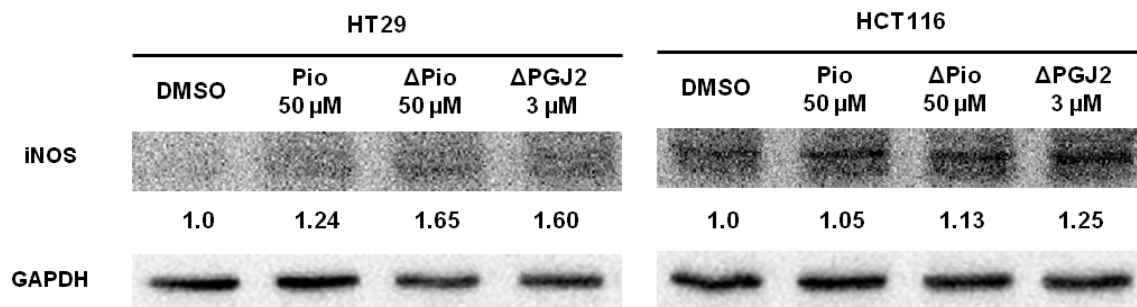


Figure 81 : Augmentation de l’expression d’iNOS par les ligands de PPAR γ

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 24 h par 50 μ M Pio, 50 μ M Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. L’immunoréplique a été réalisée selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

2. Induction d’un stress oxydant par Féno

a. Production de ROS et de RNS

La production de ROS a été étudiée suite au traitement des cellules HT29 par Féno (Figure 82). Comme pour Pio et Δ Pio, un effet biphasique a été observé. En effet, le traitement par 25 μ M de Féno induit une production de ROS maximale après 30 min de traitement (150%). Ce taux de ROS reste ensuite relativement constant jusqu’à 1 h de

Résultats et Discussion

traitement, avant de diminuer progressivement jusqu'à 2 h, où il est identique au taux initial. La quantité de ROS augmente à nouveau après 3 h de traitement (120%), avant de revenir au taux initial après 5 h de traitement. Le niveau du contenu en ROS est ensuite constant jusqu'à 24 h de traitement (Figure 82A). Pour le traitement par 50 μ M de Féno, la production de ROS est nettement plus importante que celle observée avec 25 μ M, mais le profil est semblable. Le taux de ROS accroit rapidement jusqu'à 1 h de traitement, est légèrement réduit après 2 h, avant d'atteindre son maximum après 3 h de traitement. Le taux de ROS diminue ensuite graduellement jusqu'à 24 h de traitement. Quelle que soit la durée de traitement, le taux de ROS induit par 50 μ M de Féno est plus important que le niveau initial (Figure 82A).

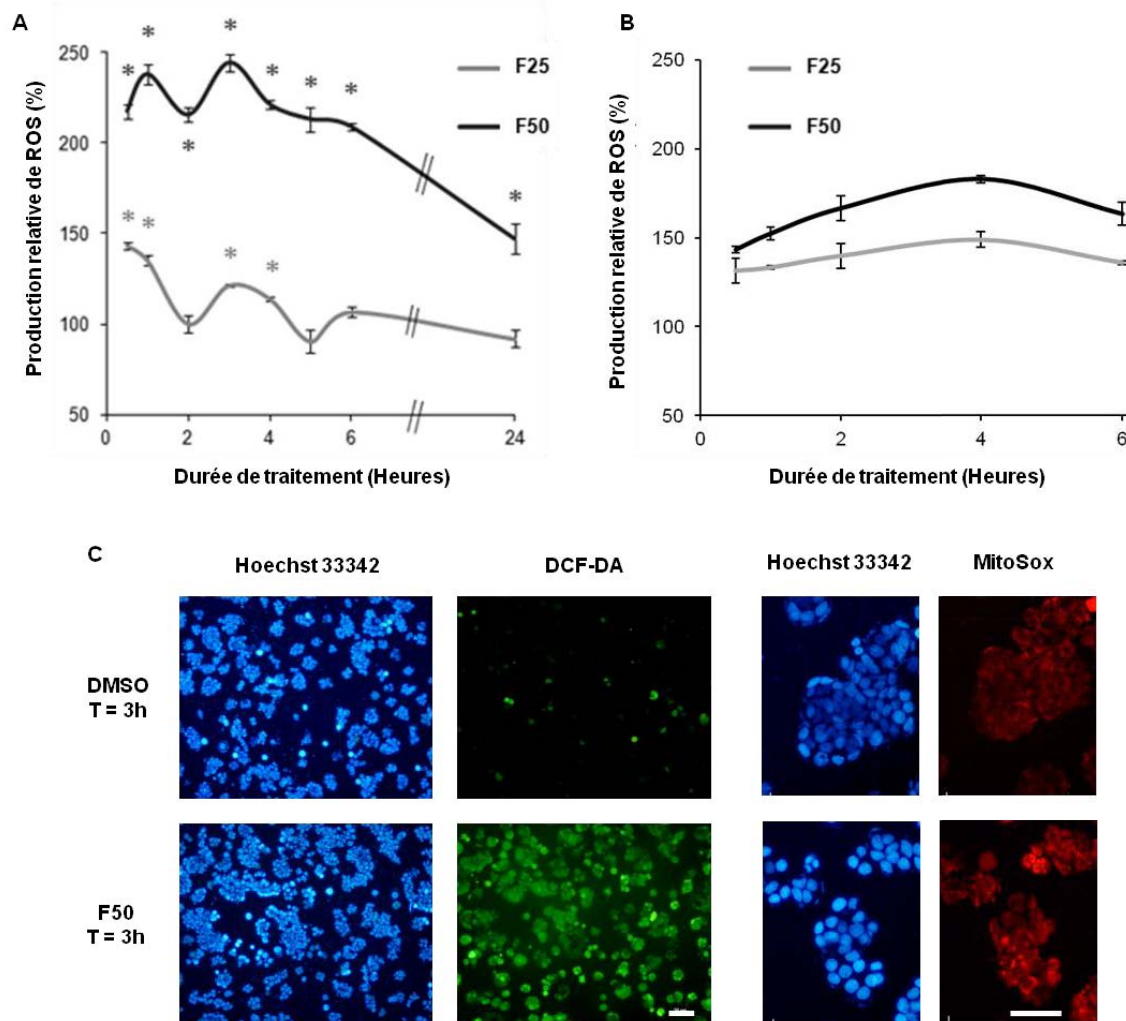


Figure 82 : Production de ROS par Féno

(A et B) La génération d'espèces réactives oxygénées a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), après traitement des cellules HT29 (A) et HCT116 (B) par 25 μ M ou 50 μ M de Féno (F25 et F50), pour des temps variant jusqu'à 24 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins non traitées. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque les cellules ne sont pas traitées.

(C) Mise en évidence de la génération de ROS, par le DCF-DA (en vert), ou de la production d'anions superoxydes, par la sonde MitoSox (en rouge), dans les cellules HT29 traitées 3 h par 50 μ M de Féno. Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342 (en bleu).

En revanche, cet effet biphasique n'est pas observé dans les cellules HCT116 (Figure 82B). Une production de ROS est observée dès 30 min de traitement par 25 μ M et 50 μ M de Féno et s'accroît progressivement jusqu'à 4 h de traitement. Ensuite, le taux de ROS diminue légèrement jusqu'à 6 h de traitement. Il est à noter que le stress induit par 25 μ M de Féno est inférieur à celui induit par 50 μ M de Féno. De plus, cette production de ROS, induite dans les cellules HT29 par 50 μ M de Féno, a été confirmée par microscopie (Figure 82C). Des résultats similaires sont obtenus avec 25 μ M de Féno, tout comme avec 25 μ M et 50 μ M de Féno dans les cellules HCT116 (Résultats non présentés).

La production de RNS suite au traitement de 24 h par 50 μ M de Féno est plus importante que celle induite suite au traitement par 25 μ M de Féno (Figure 83A). Ces RNS sont en partie composés de radicaux ONOO⁻, comme l'indique le marquage à l'aide de la sonde DHR réalisé par cytométrie en flux (Figure 83B). Comme précédemment, le traitement par 50 μ M de Féno induit une production de radicaux ONOO⁻ plus importante que le traitement par 25 μ M de Féno.

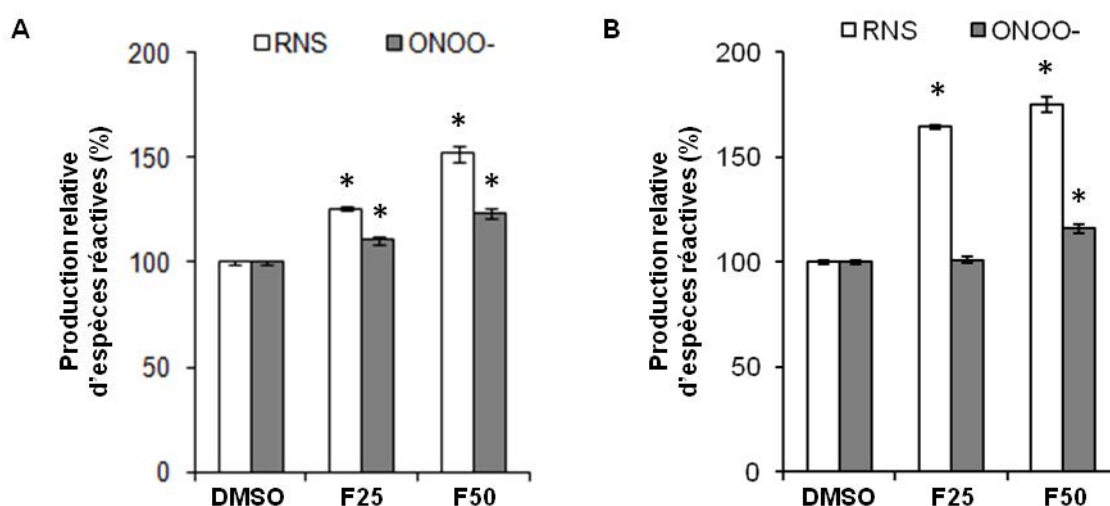


Figure 83 : Production de RNS par Féno, analysée par cytométrie en flux

(A et B) La génération de RNS et de ONOO⁻ a été mesurée, comme précédemment (Figure 76 et Figure 77) après traitement des cellules HT29 (A) et HCT116 (B) par 25 μ M ou 50 μ M de Féno (F25 et F50) pendant 24 h. Pour cela, l'analyse est réalisée par une technique de cytométrie en flux, en utilisant, respectivement, les sondes DAF-2DA et DHR selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

La production de peroxyde nitrique par 25 μ M et 50 μ M de Féno a été confirmée par microscopie dans les cellules HT29 (Figure 84) et les cellules HCT116 (Résultats non présentés).

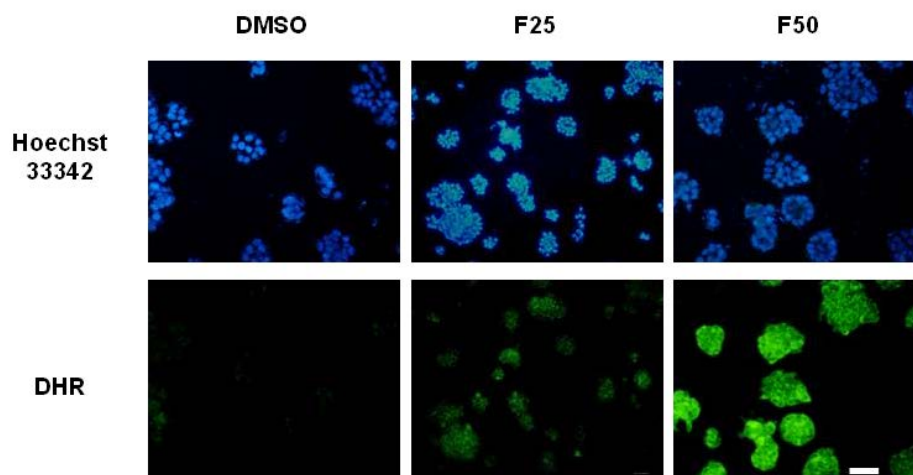


Figure 84 : Production de ONOO- par Féno analysée par microscopie

La production de ONOO- a été étudiée après traitement des cellules HT29 par 25µM ou 50µM de Féno pendant 24 h, par microscopie, en utilisant la sonde DHR selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Afin d'identifier quelles espèces réactives oxygénées particulières sont produites suite au traitement par Féno, les cellules sont prétraitées par la parabenzoquinone, un piège à anions superoxydes, ou par le D-mannitol, un piège à radicaux hydroxyls. Comme observé précédemment avec les ligands de PPARγ, ces deux antioxydants diminuent partiellement la production de ROS induite par Féno dans les cellules HT29 et HCT116 (Tableau 11). Il induit donc la production d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyls dans ces cellules. Encore une fois, la production d'anions superoxydes a été confirmée *in cellulo*, grâce à la sonde fluorescente MitoSox (Figure 82C).

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 ± 1.3	100.0 ± 5.5
Féno	206.0* ± 3.2	187.1* ± 5.0
<i>para</i> -benzoquinone	77.7* ± 6.4	84.2* ± 4.4
Féno + <i>para</i> -benzoquinone	176.0# ± 2.3	163.8# ± 3.2
D-Mannitol	109.3 ± 4.0	102.4 ± 6.8
Féno + D-Mannitol	159.0# ± 1.9	167.5# ± 2.4

Tableau 11 : Impact des antioxydants sur la production de ROS induite par Féno

La génération d'espèces réactives a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 et HCT116 suite à un prétraitement de 1 h par 1mM de D-Mannitol et 10µM de parabenzoquinone, puis traitées 3 h par 50µM de Féno. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno ou les antioxydants seuls, et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés aux différents antioxydants

Différentes études ont montré que les fibrates inhibent le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, inhibition à l'origine de la production d'un stress oxydant^{33,238,239}. De plus, Wy-14643 induit un stress oxydant important, d'origine mitochondriale, dans les cellules leucémiques ou de cancer pulmonaire, sans induire de perturbation du potentiel mitochondrial ou de la viabilité cellulaire²³⁹. Cela ressemble à la situation observée suite au traitement des cellules HCT116 par Féno. Il a aussi été décrit que les agonistes de PPAR α produisent à la fois des anions superoxydes et du H₂O₂^{69,241,242}. Enfin, la production de RNS, générée par Féno dans les cellules HT29 et HCT116, contraste avec la diminution de NO induite par des agonistes de PPAR α dans des macrophages activés par le LPS (lipopolysaccharide)³⁶³.

b. Implication de PPAR α dans la production du stress oxydant

L'implication du récepteur PPAR α dans la production du stress oxydant induit par Féno a ensuite été étudiée (Figure 85). Pour cela, les cellules ont été prétraitées 1 h par 10 μ M de MK886, un antagoniste de PPAR α .

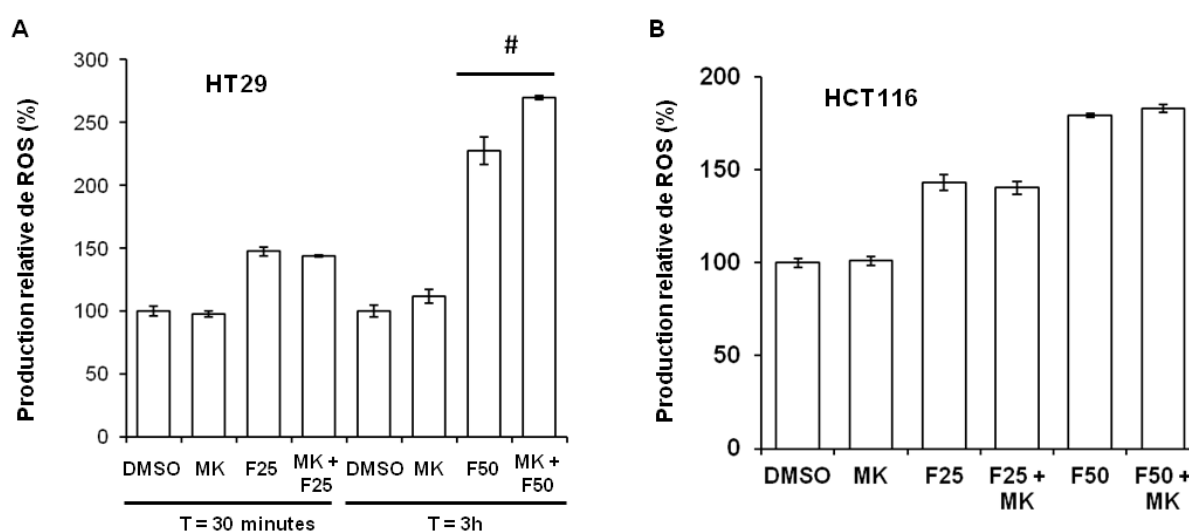


Figure 85 : Production de ROS induite par Féno, indépendante de PPAR α

(A) La mesure des ROS est réalisée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 prétraitées 1 h par 10 μ M de MK886 (MK), un antagoniste de PPAR α , puis traitées 30 min par 25 μ M de Féno et 3 h par 50 μ M de Féno.

(B) La mesure des ROS est réalisée dans les cellules HCT116 prétraitées 1 h par 10 μ M de MK886 (MK), puis traitées 4 h par 50 μ M de Féno.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à MK886.

Le prétraitement par MK886 n'a aucune incidence sur la production de ROS induite par 25 μ M de Féno après 30 min de traitement dans les cellules HT29. En revanche, ce prétraitement accentue la production de ROS induite par 50 μ M de Féno après 3 h de traitement. Cela peut être dû à l'induction de ROS par MK886 lui-même après 3 h de

Résultats et Discussion

traitement (Figure 85A). Dans les cellules HCT116, le prétraitement par MK886 ne modifie pas la production de ROS induite par 25 μ M et 50 μ M de Féno (Figure 85B). La production de ROS induite par Féno serait donc bien indépendante du récepteur PPAR α .

De plus, le prétraitement par MK886 n'a aucune incidence sur la production de RNS induite par 25 μ M et 50 μ M de Féno dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 86A et B).

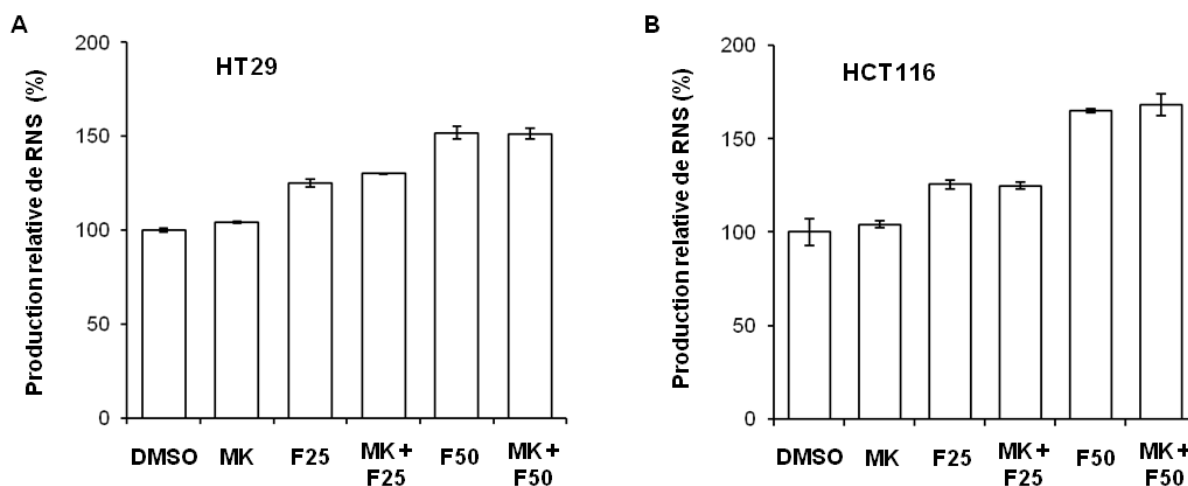


Figure 86 : Production de RNS induite par Féno, indépendante de PPAR α

(A et B) La mesure des RNS est réalisée, comme précédemment (Figure 76), dans les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) prétraitées 1 h par 10 μ M de MK886 (MK), un antagoniste de PPAR α , puis traitées 24 h par 25 μ M ou 50 μ M de Féno.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

Pas de différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à MK886.

La production d'un stress oxydant, de manière indépendante de PPAR α , est déjà décrite dans la littérature^{33,238,239}.

c. Origine des espèces réactives

Pour déterminer l'origine des espèces réactives générées, les cellules HT29 et HCT116 ont été prétraitées par le CCCP et par L-NAME. Ces prétraitements contrecarrent partiellement la production de ROS (Figure 87A et C) ou de RNS (Figure 87B et D) induite par 50 μ M de Féno. Les ROS induits par ce composé sont donc partiellement issus de l'activité mitochondriale. Les RNS sont, quant à eux, principalement issus de la réaction catalysée par iNOS. Une étude a d'ailleurs montré que Wy-14643 et le Clofibrate provoquent une augmentation de la transcription d'iNOS dans diverses cellules, de manière indépendante de PPAR α ²⁴³.

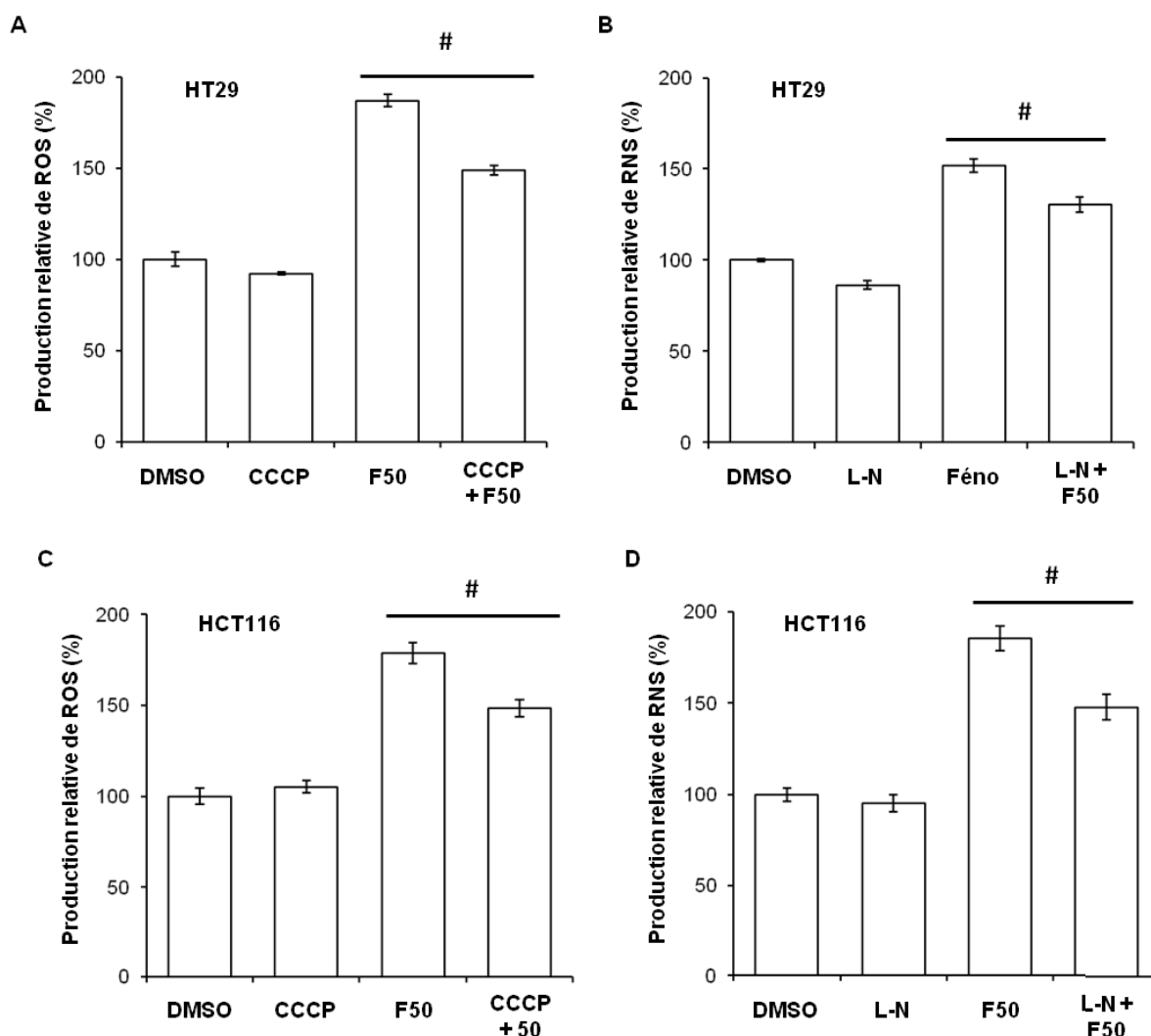


Figure 87 : Origine du stress oxydant induit par Féno

(A et C) La génération de ROS a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 (A) et HCT116 (C) prétraitées 1 h par 50 μ M de CCCP, puis traitées 3 h par 50 μ M de Féno (F50).

(B et D) La génération de RNS a été mesurée, comme précédemment (Figure 76), suite au traitement des cellules HT29 (B) et HCT116 (D) par 50 μ M de Féno (F50) pendant 24 h et à l'addition de 1mM de L-NG-Nitroarginine Methyl Ester (L-N) les 3 dernières heures de traitement. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à un inhibiteur.

F. Diminution du contenu en glutathion réduit (GSH) par les ligands de PPAR

1. Diminution du contenu en GSH par les ligands de PPAR γ

L'une des conséquences de la génération d'espèces réactives est une déplétion du taux de GSH intracytoplasmique¹. Le contenu en GSH a ainsi été mesuré après traitement des cellules HT29 ou HCT116 par les ligands de PPAR γ (Figure 88). Dès 2 h de traitement des cellules HT29 par Pio, le taux de GSH est significativement réduit et cette diminution est maximale après 24 h (Figure 88A). Des résultats comparables sont obtenus lorsque ces

Résultats et Discussion

cellules sont traitées par Δ Pio (Figure 88A). De même, le contenu en GSH des cellules HCT116 est fortement réduit suite aux traitements par Pio et Δ Pio (Figure 88B).

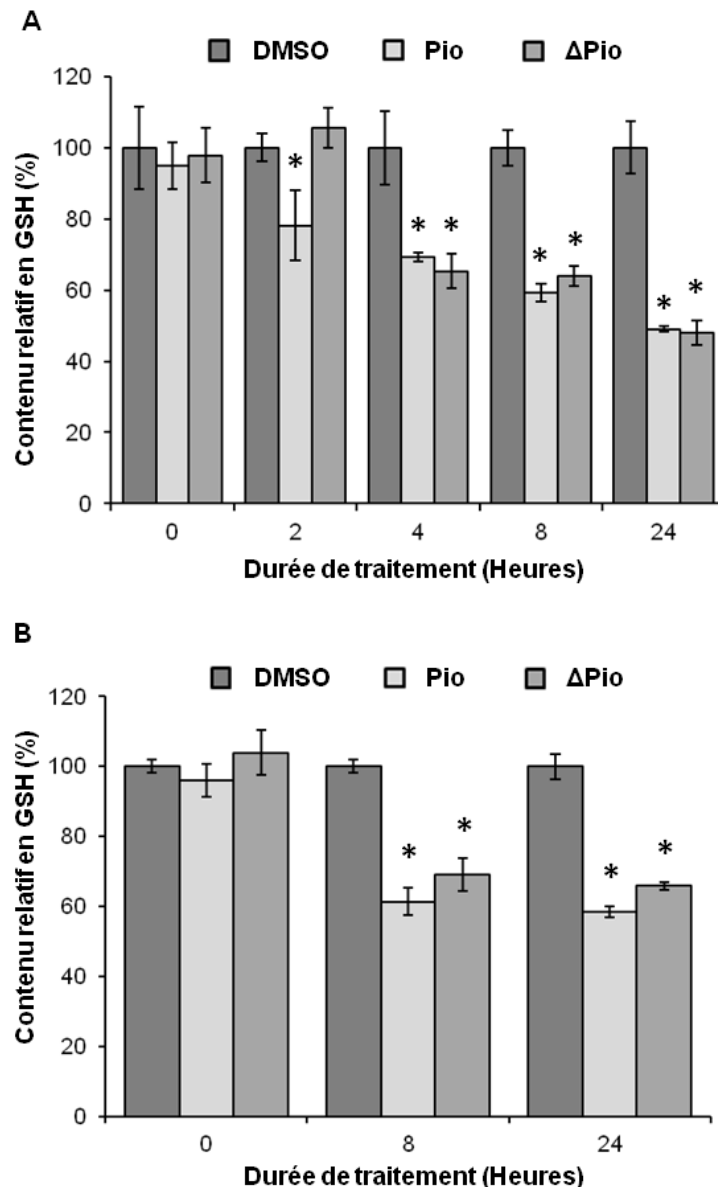


Figure 88 : Diminution du contenu en GSH intracellulaire par les ligands de PPAR γ

(A et B) Le contenu en GSH a été mesuré en cinétique sur les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) entre 0 et 24 heures. Les cellules ont été traitées par 50 μ M Pio (A et B) ou 50 μ M Δ Pio (A et B). Le contenu en GSH a été mesuré, sur trois échantillons de trois séries indépendantes, pour chaque traitement, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont rapportés, pour chaque traitement, au contenu en GSH des cellules traitées par le DMSO et exprimés en pourcentage.

* différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par DMSO, dans les mêmes conditions opératoires.

Pio et Δ Pio ont un effet similaire, puisqu'elles induisent une réduction d'environ 40-50 % du contenu en GSH dans les deux lignées cellulaires. Cette baisse du GSH a déjà été décrite en présence d'un stress oxydant généré par les TZD^{239,360}. Cette diminution pourrait aussi être provoquée par une conjugaison des composés avec le GSH sous l'action des GSTs. Le

conjugué serait alors exporté hors de la cellule par les transporteurs membranaires MRP²⁷¹. Effectivement, des adduits entre le GSH et les TZD ont été observés dans des microsomes hépatiques chez le chien, chez le rat et chez l'Homme. Mais leur formation nécessite une métabolisation des TZD, c'est à dire l'ouverture du cycle thiazolidine²⁷³. En revanche, la Δ Pio pourrait se conjuguer au GSH, selon une réaction d'addition de Michael, comme cela a déjà été observé avec la Δ PGJ2²⁷¹.

Afin d'évaluer l'implication des espèces réactives dans la diminution du contenu en GSH, la parabenzoquinone, le D-Mannitol et le γ -Tocophérol, un inhibiteur spécifique des RNS, ont été utilisés. Précédemment, il a été montré que la parabenzoquinone et le D-Mannitol réduisaient bien la production de ROS induite par Pio et Δ Pio (Tableau 10 ; p.98). De même, il a été démontré que le γ -Tocophérol diminuait les RNS produits par ces composés (Tableau 12).

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 \pm 3.9	100.0 \pm 3.3
γ -Tocophérol	86.0* \pm 4.8	106.7 \pm 5.0
Pio	124.9* \pm 1.8	156.0* \pm 8.4
Pio + γ -Tocophérol	107.6# \pm 1.0	123.1# \pm 0.7
Δ Pio	207.2* \pm 0.5	203.4* \pm 7.2
Δ Pio + γ -Tocophérol	189.4# \pm 3.5	174.1# \pm 1.6

Tableau 12 : Impact du γ -Tocophérol sur la production de RNS induite par Pio et Δ Pio

La génération d'espèces réactives nitrées a été mesurée, comme précédemment (Figure 76), dans les cellules HT29 prétraitées 1 h par 10 μ M de γ -Tocophérol, puis traitées 24 h par 50 μ M de Pio ou Δ Pio. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, Δ Pio ou γ -Tocophérol, et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés au γ -Tocophérol.

Ainsi, l'utilisation des différents antioxydants a permis de montrer que toutes les espèces réactives générées sont impliquées dans la diminution du GSH observée, puisque chacun d'eux est capable de restaurer partiellement le taux de GSH (Tableau 13).

Résultats et Discussion

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 ± 2.5	100.0 ± 3.0
D-Mannitol	94.8 ± 3.8	98.1 ± 1.3
<i>p</i> -benzoquinone	102.5 ± 0.5	113.4* ± 3.3
γ -Tocophérol	100.3 ± 2.8	116.8* ± 1.0
Pio	57.0* ± 0.8	59.0* ± 1.2
Pio + D-Mannitol	65.8# ± 0.6	65.4# ± 0.9
Pio + <i>p</i> -benzoquinone	72.2# ± 5.0	86.2# ± 1.0
Pio + γ -Tocophérol	64.9# ± 2.5	68.9# ± 1.3
Δ Pio	71.2* ± 0.9	70.2* ± 1.8
Δ Pio + D-Mannitol	92.6# ± 1.2	85.7# ± 1.2
Δ Pio + <i>p</i> -benzoquinone	87.4# ± 5.0	95.1# ± 4.0
Δ Pio + γ -Tocophérol	91.0# ± 5.7	92.9# ± 1.3

Tableau 13 : Impact des antioxydants sur la diminution du GSH induite par Pio et Δ Pio

Le contenu en GSH été mesuré, comme précédemment (Figure 88), dans les cellules HT29 ou HCT116 prétraitées 1 h par 1mM de D-Mannitol, 10 μ M de parabenzoquinone ou 10 μ M de γ -Tocophérol, puis traitées 24 h par 50 μ M de Pio ou Δ Pio.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio, Δ Pio ou les antioxydants seuls et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés aux différents antioxydants.

En revanche, le taux de GSH est fortement augmenté après le traitement des cellules HT29 ou HCT116 par la Δ PGJ2 (Figure 89A et B). Cet accroissement du contenu en GSH est inhibé, lorsque les cellules sont prétraitées, pendant 1 h, par 100 μ M de L-Buthionine-(S-R)-sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la GCL. Cette dernière catalyse l'étape limitante de la biosynthèse du GSH (Figure 89C et D). Il a déjà été montré que l'activation de la voie Nrf2/Keap1 par la Δ PGJ2 entraînait une hausse de l'expression de la GCL et de la GR, qui permet un accroissement du contenu en glutathion^{39,263,264}.

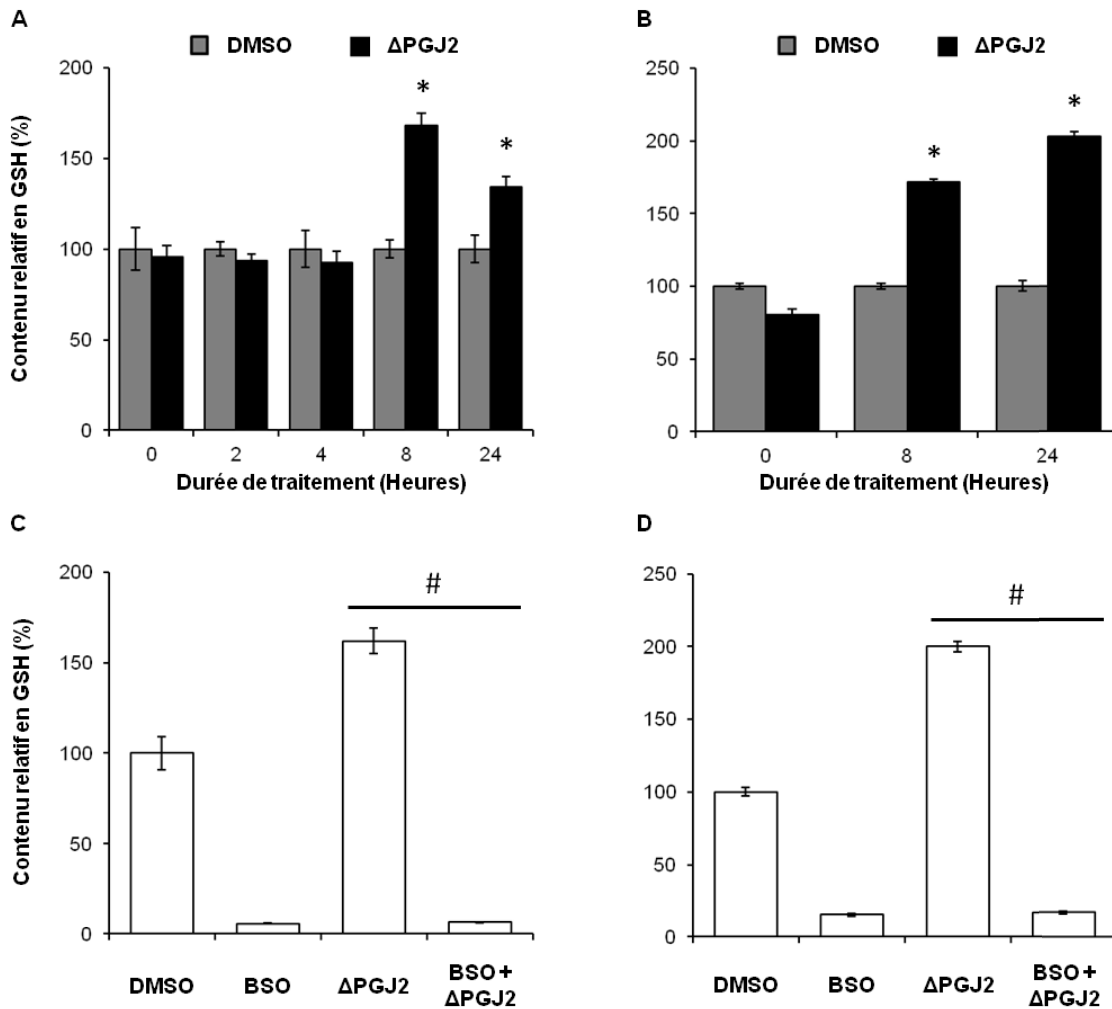


Figure 89 : Augmentation du GSH, induite par la ΔPGJ2, inhibée par le BSO

(A et B) Le contenu en GSH est mesuré en cinétique sur les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) suite à un traitement par 3μM de ΔPGJ2 entre 0 h et 24 h, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. * différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par la ΔPGJ2 et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

(C et D) Le contenu en GSH est mesuré dans les cellules HT29 (C) et HCT116 (D) prétraitées pendant 1 h par 100μM de L-Buthionine-(S-R)-sulfoximine (BSO), puis traitées 24 h par 3μM de ΔPGJ2. Ce contenu a été mesuré sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

Les résultats sont rapportés au contenu en GSH des cellules traitées par le DMSO et exprimés en pourcentage. #, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par le BSO et celles obtenues lorsque les cellules sont co-traitées par le BSO et la ΔPGJ2.

2. Diminution du contenu en GSH par Féno

Le Féno induit une baisse du GSH dans les cellules HT29 à partir de 8 h de traitement, pour atteindre une diminution maximale de 20% après 24 h de traitement (Figure 90A). Néanmoins, cette réduction du GSH est nettement moins importante que celle observée avec Pio et ΔPio dans ces cellules. Le traitement par 25μM de Féno n'a aucune incidence sur le contenu en GSH. En revanche, le traitement des cellules HCT116 par 25μM et 50μM de Féno pendant 24 h diminue le taux de GSH de manière dose dépendante (Figure 90B). Cependant, ces baisses restent limitées.

Résultats et Discussion

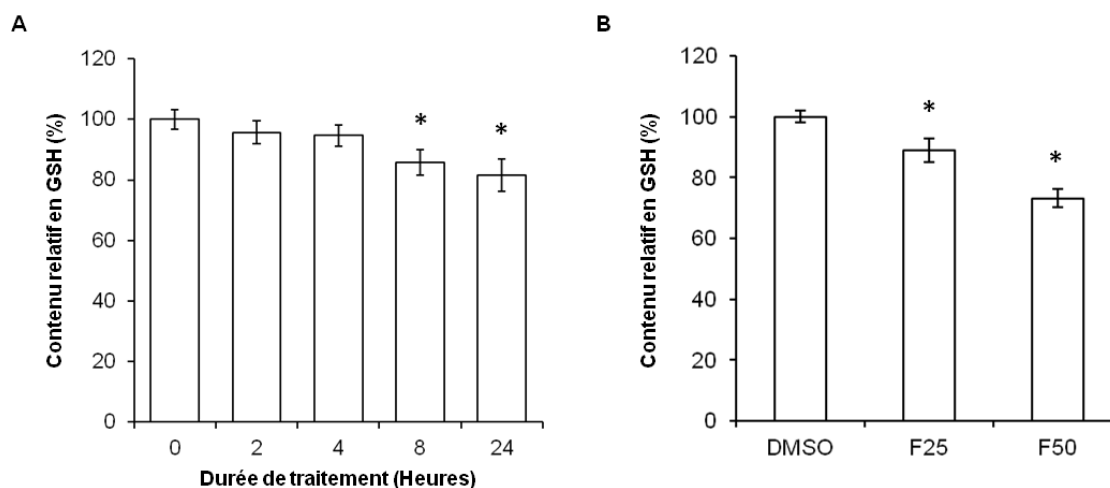


Figure 90 : Diminution du GSH induite par Féno

(A et B) Le contenu en GSH a été mesuré, comme précédemment (Figure 88) suite au traitement de cellules HT29 par 50µM de Féno de 0 h à 24 h (A) ou de cellules HCT116 par 25µM et 50µM de Féno pendant 24 h (B). Les résultats sont rapportés au contenu en GSH des cellules non traitées et exprimés en pourcentage.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno et celles obtenues avec les cellules contrôle.

La production d'un stress oxydant, associée à une déplétion en GSH, a également été observée suite au traitement de cellules cancéreuses hépatiques HepG2 par Féno²⁴⁰.

Comme auparavant, la parabenzoquinone, le D-Mannitol et le γ -Tocophérol ont été utilisés pour démontrer l'implication des espèces réactives dans la réduction du GSH. Il a déjà été montré que la parabenzoquinone et le D-Mannitol diminuaient bien la production de ROS induite par Féno (Tableau 11 ; p.106). De même, la capacité du γ -Tocophérol, à baisser les RNS produits par ce composé, a été montré dans les cellules HT29 et HCT116 (Tableau 14).

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 ± 3.9	100.0 ± 3.6
Féno	151.9* ± 3.6	185.5* ± 6.6
γ -Tocophérol	84.0* ± 3.2	103.2 ± 7.0
Féno + γ -Tocophérol	134.6# ± 1.8	157.8# ± 4.5

Tableau 14 : Impact du γ -Tocophérol sur la production de RNS induite par Féno

La génération de RNS a été mesurée, comme précédemment (Figure 76), dans les cellules HT29 et HCT116 prétraitées 1 h par 10µM de γ -Tocophérol, puis traitées 24 h par 50µM de Féno. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno ou le γ -Tocophérol, et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ce traitement est associé au γ -Tocophérol.

Les prétraitements par les divers antioxydants restaurent totalement le contenu en GSH des cellules HT29 et HCT116 traitées par Féno (Tableau 15). Il semblerait donc que l'ensemble des espèces réactives soient responsables de la diminution de GSH observée avec Féno.

Traitement	HT29	HCT116
Contrôle (DMSO)	100.0 ± 3.8	100.0 ± 1.9
D-Mannitol	107.6 ± 3.5	124.8* ± 1.6
<i>p</i> -benzoquinone	116.5* ± 3.8	147.1* ± 4.7
γ -Tocophérol	104.7 ± 1.2	114.8 ± 9.4
Féno	79.0* ± 3.0	85.3* ± 2.6
Féno + D-Mannitol	94.4# ± 4.7	98.5# ± 1.8
Féno + <i>p</i> -benzoquinone	113.2# ± 1.8	105.6# ± 4.3
Féno + γ -Tocophérol	102.8# ± 3.2	101.8# ± 1.8

Tableau 15 : Impact des antioxydants sur la diminution du GSH induite par Féno

Le contenu en GSH été mesuré, comme précédemment (Figure 88), dans les cellules HT29 et HCT116 prétraitées 1h par 1mM de D-Mannitol, 10 μ M de parabenzoquinone ou 10 μ M de γ -Tocophérol, puis traitées 24 h par 50 μ M de Féno. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno ou les antioxydants seuls et celles obtenues avec les cellules traitées par le DMSO.
#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés aux différents antioxydants.

G. Impact des ligands de PPAR sur l'activation de la voie Nrf2/Keap1

La voie Nrf2/Keap1 est activée lorsque les cellules sont soumises à un stress oxydant²¹⁶. Puisque les ligands de PPAR génèrent un stress oxydant dans les cellules HT29 et HCT116, l'impact de ces composés sur cette voie de transduction a été étudié. Plusieurs études ont montré que le traitement par la Δ PGJ2 active la voie Nrf2/Keap1³⁹. Par conséquent, cette prostaglandine a été utilisée en tant qu'activateur de cette voie de signalisation.

1. Activation de la voie Nrf2/Keap1 par les ligands de PPAR γ

a. Translocation nucléaire de Nrf2

Afin de mettre en évidence l'activation de la voie Nrf2/Keap1, la translocation nucléaire de Nrf2 dans les cellules HT29 et HCT116 a été étudiée suite au traitement par les ligands de PPAR γ (Figure 91).

Résultats et Discussion

Par immunoréplique, une bande de 60 kDa, correspondant à la présence de Nrf2 dans les extraits nucléaires, a été détectée dès la 1^{ère} heure de traitement. Cette translocation perdure jusqu'à 5 h de traitement (Figure 91A et B). Pio et Δ Pio activent cette voie de manière similaire, cet effet serait donc indépendant de PPAR γ . La présence de Nrf2 est également confirmée dans les extraits cytoplasmiques, sous la forme de plusieurs bandes, qui correspondent à la protéine partiellement dégradée (Figure 91A et B).

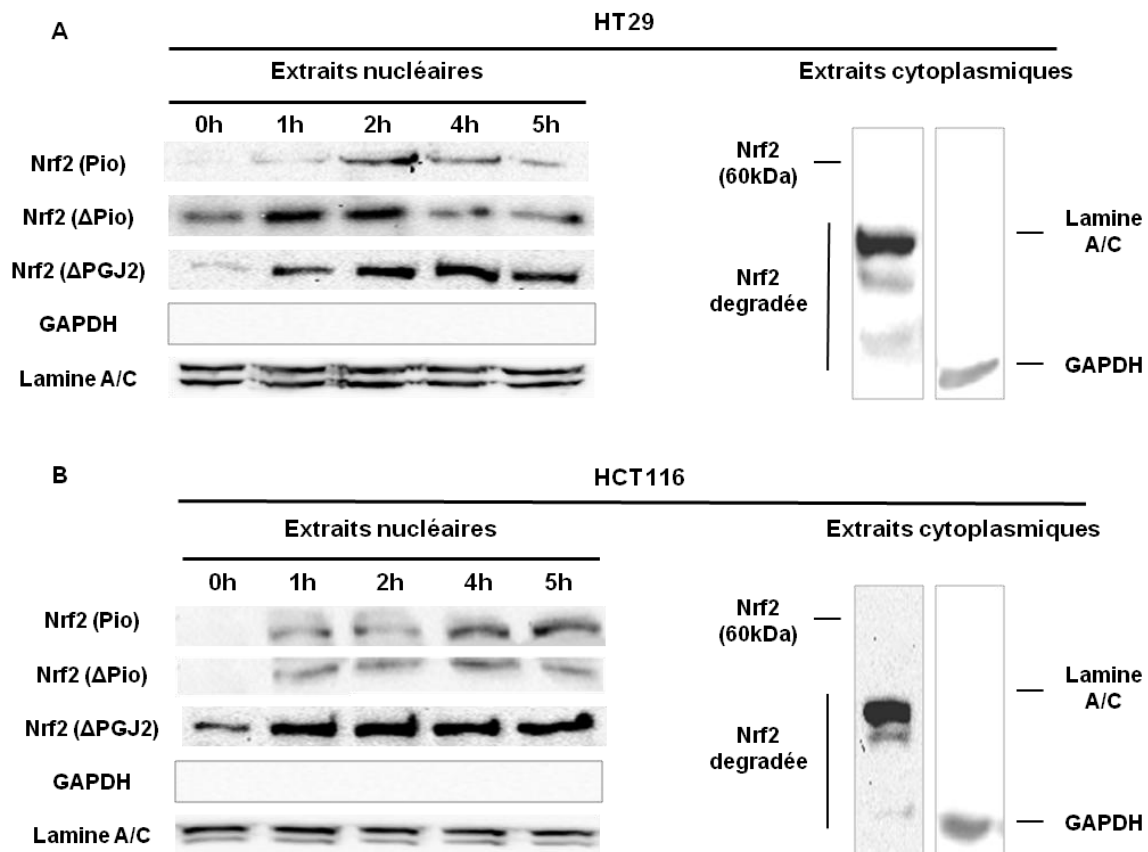


Figure 91 : Activation de la voie Nrf2/Keap1 par les ligands de PPAR γ

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) sont traitées pendant 4 h et 6 h par 50 μ M de Pio, 50 μ M de Δ Pio ou 3 μ M de Δ PGJ2. Après incubation, les extraits cytoplasmique et nucléaire sont préparés, puis analysés par immunoréplique, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**. Une bande, estimée à 60 kDa, est détectée dans les extraits de protéines nucléaires. Plusieurs bandes sont détectées dans les extraits cytoplasmiques, préparés à partir de cellules non traitées. Elles correspondent à la protéine Nrf2 dégradée. La qualité des extraits est vérifiée en utilisant une solution d'anticorps dirigés contre la GAPDH, localisée uniquement dans le cytoplasme et la lamine A/C, protéine exclusivement nucléaire.

La translocation nucléaire de Nrf2 a été également confirmée, pour tous les traitements, par une technique d'immunocytochimie, réalisée sur les cellules HT29 ou HCT116 (Figure 92). Après 24 h de traitement, le signal immunologique semble d'avantage cytoplasmique que nucléaire, ce qui confirme les résultats obtenus par immunoréplique.

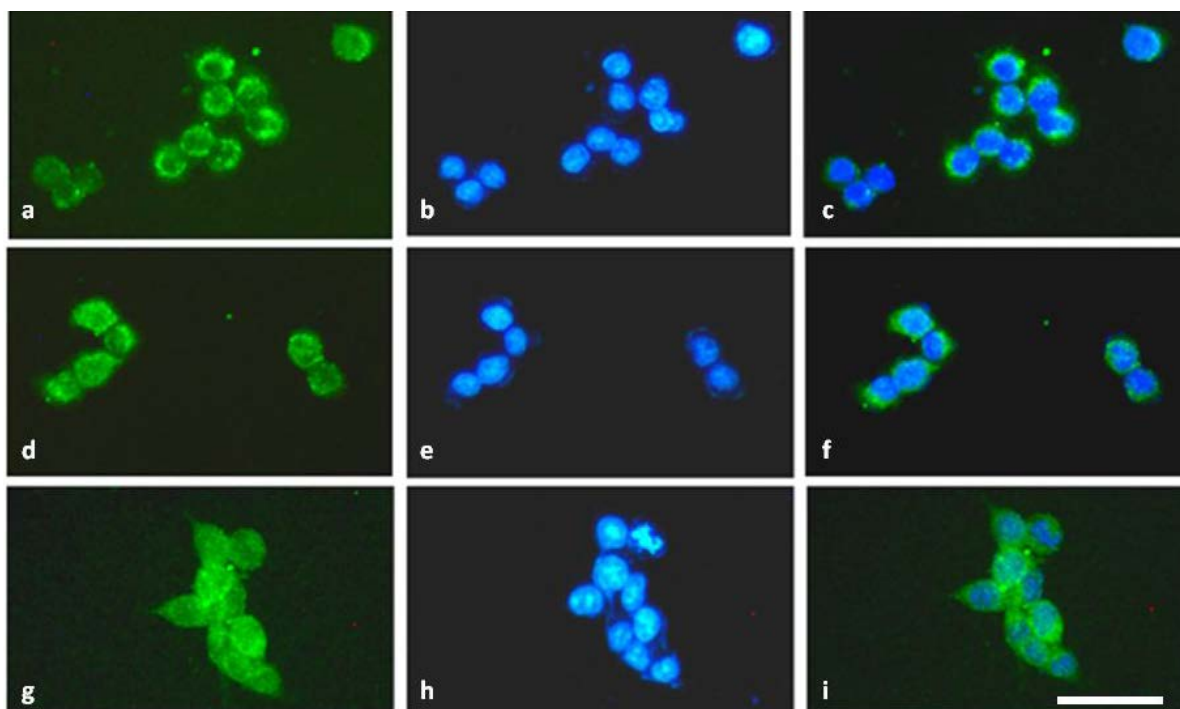


Figure 92 : Activation de la voie Nrf2/Keap1 par les ligands de PPAR γ , observée par immunocytochimie

Mise en évidence de la présence de Nrf2, par une technique d'immunocytochimie, réalisée sur des préparations de cellules HT29 (*a-f*) et HCT116 (*g-i*) traitées respectivement par 0,1% (v/v) de DMSO (*a-c*), 50 μ M de Δ Pio (*d-f*) et 3 μ M de Δ PGJ2 (*g-i*), pendant 4 h. Nrf2 est principalement localisée dans le cytoplasme ou présente une localisation péri-nucléaire en absence de traitement (*a*). Dans les cellules traitées par Δ Pio (*d*) ou Δ PGJ2 (*g*), le signal est diffus dans le cytoplasme et dans les noyaux des cellules HT29 ou HCT116, respectivement. *b*, *e*, *h*, mise en évidence des noyaux des cellules après coloration des cellules par le DAPI. *c*, *f*, *i*, superposition respective des images *a* et *b*, *d* et *e*, *g* et *h*.

L'activation de la voie Nrf2 peut être provoquée par des espèces réactives oxygénées, mais elle peut aussi l'être suite à une nitrosylation de Keap1 par le NO^{213,364}. Comme Pio et Δ Pio génèrent abondamment cette espèce réactive, elles pourraient activer la voie Nrf2/Keap1 de cette façon. De plus, l'activation de la voie Nrf2/Keap1 pourrait être amplifiée par l'augmentation de l'expression de Nrf2 suite à l'activation de PPAR γ par Pio. En effet, le gène Nrf2 contient une séquence PPRE dans son promoteur²⁴⁴⁻²⁴⁶. De même, Nrf2 serait capable d'induire l'expression de PPAR γ , grâce à une séquence ARE, présente au sein de son promoteur^{248,365,366}. Enfin, il est possible que Δ Pio soit capable d'activer la voie Nrf2/Keap1, en se liant directement sur Keap1, selon une réaction d'addition de Michael. Des résultats comparables ont été obtenus avec un autre ligand synthétique de PPAR γ , le CDDO (pour 2-Cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid), également capable de former des adduits selon une réaction d'addition de Michael et d'activer la voie Nrf2/Keap1³⁶⁷.

b. Expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1

Bien que tous ces traitements permettent la translocation nucléaire de Nrf2, ils n'ont pas le même effet sur tous ses gènes-cibles (Figure 93).

Résultats et Discussion

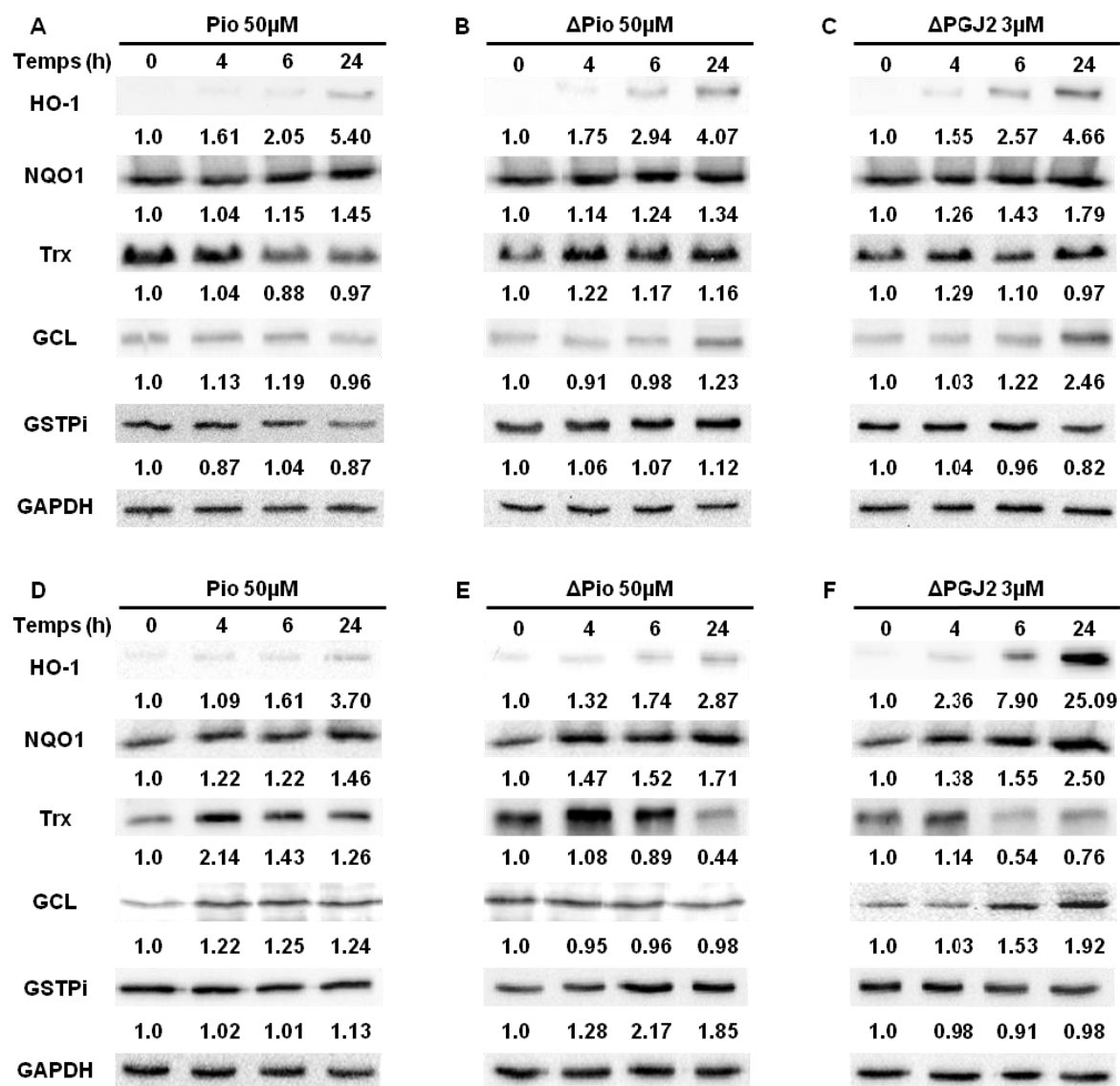


Figure 93 : Impact des ligands de PPAR γ sur l'expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1

(A - F) Les cellules HT29 (A, B et C) et HCT116 (D, E et F) sont traitées pendant 4 h, 6 h et 24 h par 50 μ M de Pio (A et D), 50 μ M de Δ Pio (B et E) et 3 μ M de Δ PGJ2 (C et F). Les expressions de l'Hème Oxygénase 1 (HO1), de la NAD(P)H déhydrogénase quinone 1 (NQO1), des Thiorédoxines (Trx), de la Glutamate Cystéine Ligase (GCL) et de la Glutathion-S-Transférase π (GST π), sont étudiées par immunoréplique. Cette dernière est réalisée à partir de 25 μ g de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expression de chaque protéine a été rapportée à celle de la GAPDH, pour chaque condition, puis comparée à celle obtenue dans les cellules non traitées. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

Les taux protéiques de HO-1 et NQO1 sont augmentés dès 4 h, quels que soient le traitement ou la lignée testée (Figure 93). De plus, l'induction de l'expression de NQO1 pourrait être à l'origine d'une inhibition du phénomène d'autophagie, comme cela a déjà été montré par Rao et *al.*²²⁴. L'inhibition de la voie Nrf2/Keap1 pourrait donc permettre d'accentuer le phénomène d'autophagie induit par Pio et Δ Pio. La Δ PGJ2 induit, quant à elle, l'expression de la GCL dans les deux lignées cellulaires (Figure 93C et F), ce qui est en accord avec

l'augmentation de GSH observée précédemment (Figure 89A et B ; p.113). L'induction de HO-1 et de la GCL par la Δ PGJ2 est en accord avec d'autres résultats retrouvés dans la littérature²⁶³⁻²⁶⁵. En revanche, le traitement par la Δ PGJ2 entraîne une diminution des taux de GST π et des Trx (Figure 93C et F). Des variations existent également lorsque les cellules HT29 ou HCT116 sont traitées par Pio et Δ Pio. Le taux protéique de GCL est augmenté lorsque les cellules HT29 sont traitées par Δ Pio (Figure 93B) ou lorsque les cellules HCT116 sont traitées par Pio (Figure 93D). Une réduction du taux des Trx est aussi observée après traitement des cellules HCT116 par Δ Pio (Figure 93E).

c. Induction de l'expression de HO-1 dépendante du stress oxydant, mais indépendante de l'activation du récepteur PPAR γ

Différentes études ont montré que l'expression de HO-1 pouvait être induite par d'autres voies de signalisation que la voie Nrf2/Keap1. Par exemple, cette protéine est induite par les voies PPAR γ ²⁴⁷ ou AP-1³⁶⁸, mais également par une diminution du contenu en GSH³⁶⁷. Afin de déterminer l'implication du stress oxydant et du récepteur PPAR γ dans l'induction de son expression, les cellules HT29 et HCT116 ont été prétraitées 1 h par 5mM de N-acétylcystéine (NAC) et 10 μ M de Trolox (Tro), des antioxydants généraux (Figure 94). Au préalable, la capacité de ces derniers à réduire les ROS induits par Pio et Δ Pio a été démontrée dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 94A, B, G et H). Ces prétraitements empêchent l'induction de l'expression de HO-1 par les ligands de PPAR γ , dans les deux lignées cellulaires (Figure 94C-D et I-J). Un effet similaire est observé suite au prétraitement des cellules par 10 μ M de γ -Tocophérol (Figure 94E et K). L'induction de HO-1 serait donc dépendante des ROS, mais également des RNS. En revanche, le prétraitement des cellules HT29 et HCT116 par GW9662, un antagoniste de PPAR γ , n'a aucun effet sur l'induction de HO-1 par Pio et Δ Pio (Figure 94F et L). Cet effet serait donc bien indépendant du récepteur PPAR γ , tout comme l'induction de HO-1 par le CDDO et la Δ PGJ2 dans les fibroblastes pulmonaires³⁶⁷.

Résultats et Discussion

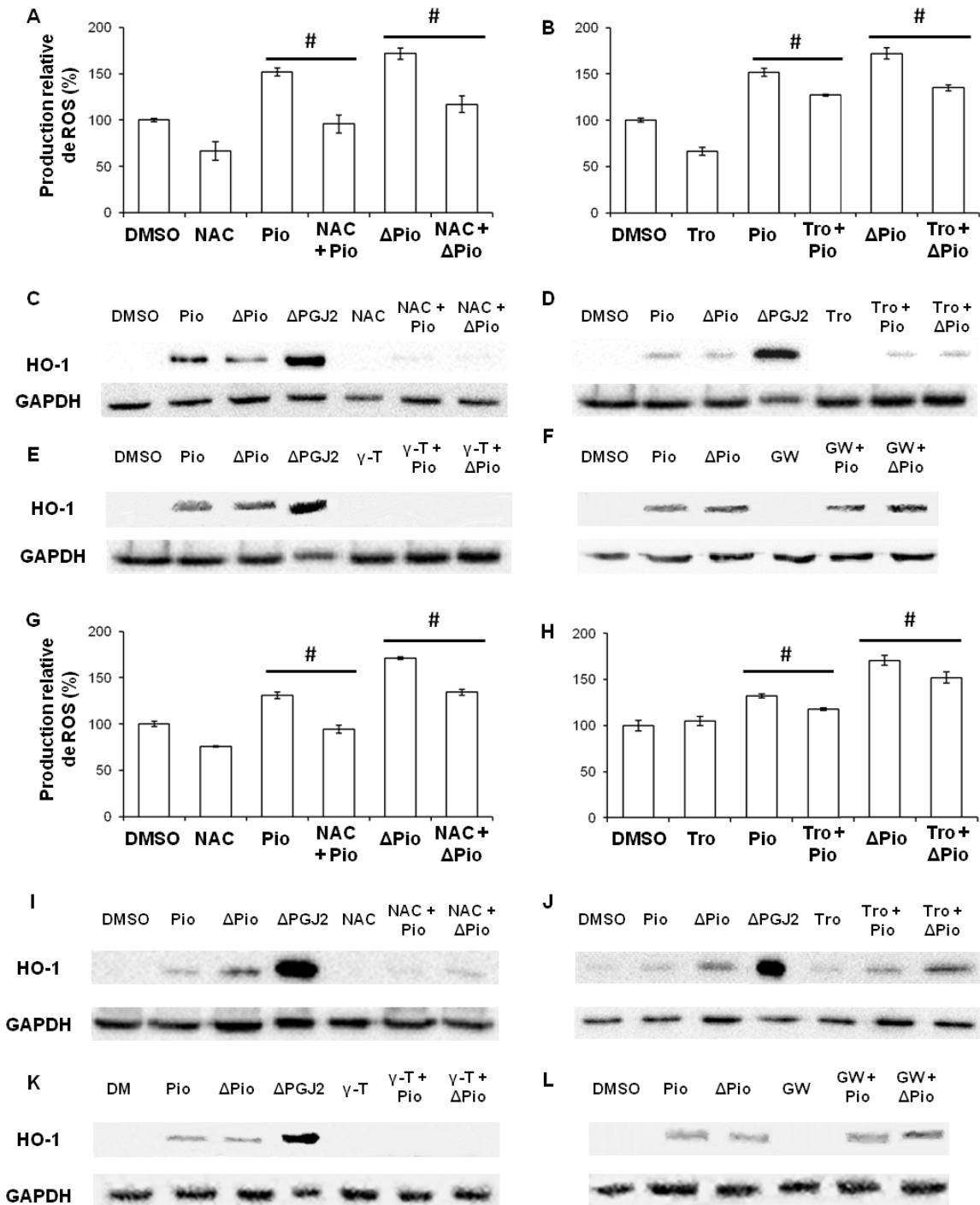


Figure 94 : Induction de l'expression de HO-1 par les ligands de PPAR γ dépendante du stress oxydant mais indépendante du récepteur PPAR γ

(A-B, G-H) : La production de ROS a été analysée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 (A-B) et HCT116 (G-H) prétraitées 1 h par 5mM de N-acétylcystéine (NAC ; A et G) ou 10 μ M de Trolox (Tro ; B et H) puis traitées pendant 15 min par 50 μ M de Pio ou Δ Pio.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à NAC ou Trolox.

(C-F, I-L) L'étude de l'expression de HO-1 a été réalisée, comme précédemment (Figure 93), dans les cellules HT29 (C-F) ou HCT116 (I-L) prétraitées 1 h par 5mM de NAC (C et I), 10 μ M de Trolox (D et J), 10 μ M de γ -Tocophérol (E et K) ou 10 μ M de GW9662 (GW ; F et L) puis traitées par 50 μ M de Pio ou Δ Pio pendant 24 h. Le traitement par 3 μ M de Δ PGJ2 est utilisé en tant que contrôle positif. L'expression de chaque protéine a été rapportée à celle de la GAPDH, pour chaque condition, puis comparée à celle obtenue dans les cellules traitées par le DMSO. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

d. Absence d'effet de la voie Nrf2/Keap1 sur la diminution de viabilité induite par les ligands de PPAR γ

L'activation de la voie Nrf2/Keap1 peut limiter l'efficacité des drogues thérapeutiques. Ainsi, l'inhibition de Nrf2 par siRNA permet d'accroître l'efficacité du 5-FU dans les cellules HT29 ²²⁶. La Trigonelline permet également d'inhiber cette voie. En effet, un traitement des cellules HT29 par 100nM de Trigonelline diminue l'expression de Nrf2, sa translocation nucléaire, ainsi que la transcription de ses gènes-cibles ³⁶⁹. De même, il a été montré que la Trigonelline réduisait la translocation nucléaire de Nrf2 dans des cellules cancéreuses pancréatiques, ce qui les rend plus sensibles à l'apoptose induite par TRAIL ³⁷⁰. L'impact de la Trigonelline, sur la diminution de viabilité induite par les ligands de PPAR γ , a été étudié dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 95). La baisse de l'activation de Nrf2 induite par la Trigonelline n'a aucun effet sur la réduction de viabilité induite par Pio et Δ Pio. L'activation de la voie Nrf2, par ces composés, n'aurait donc aucun effet protecteur sur la viabilité cellulaire. Il conviendrait tout de même de vérifier que le cotraitement avec la Trigonelline diminue bien la translocation nucléaire de Nrf2 induite par Pio et Δ Pio dans ces deux lignées cellulaires.

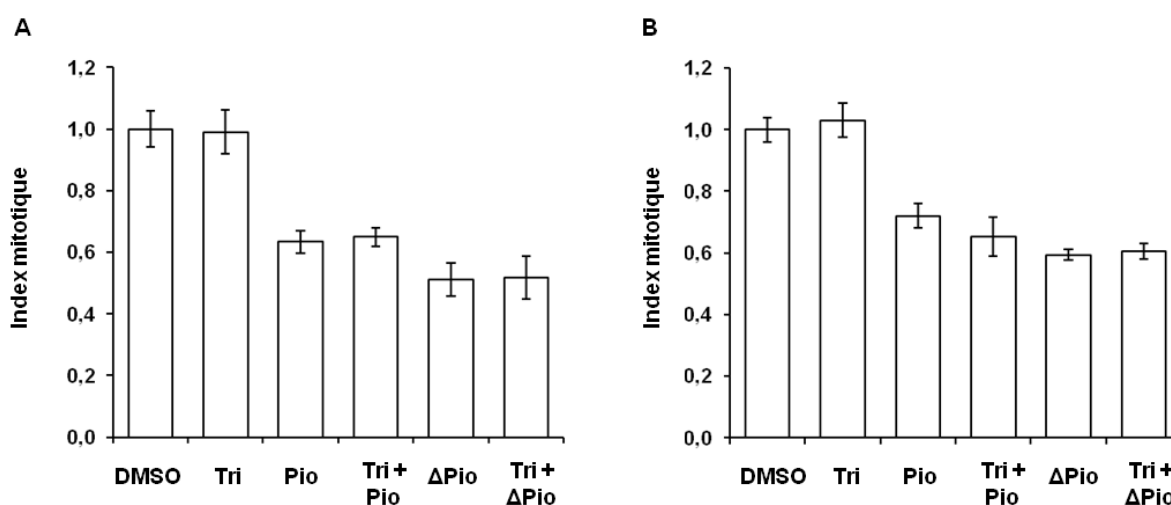


Figure 95 : Impact de l'activation de la voie Nrf2 sur la diminution de croissance induite par Pio et Δ Pio

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 50 μ M de Pio ou Δ Pio, en association ou non avec 100nM de Trigonelline (Tri). Un comptage des cellules est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules vivantes traitées par Pio et Δ Pio, en association ou non avec Tri, au nombre de cellules vivantes traitées par le DMSO

Aucune différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou Δ Pio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à la Trigonelline.

2. Absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1 par Féno

a. Absence de translocation nucléaire de Nrf2

L'activation de la voie Nrf2/Keap1, ainsi que l'expression de ses gènes-cibles, a été étudiée dans les cellules HT29 traitées par Féno. Contrairement aux ligands de PPAR γ , le traitement par Féno n'active pas la voie Nrf2/Keap1, qu'il s'agisse des cellules HT29 ou HCT116 (Figure 96A et B). Il semblerait même que le traitement des cellules HCT116 par Féno induise une diminution de la translocation nucléaire de Nrf2, pour certains temps de traitement. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec d'autres agonistes de PPAR α dans le foie de souris. En effet, l'acide perfluorooctanoïque et l'acide perfluorodécanoïque y activent la voie Nrf2/Keap1 et la transcription de deux de ses gènes-cibles, *MRP-3* et *MRP-4*³⁷¹.

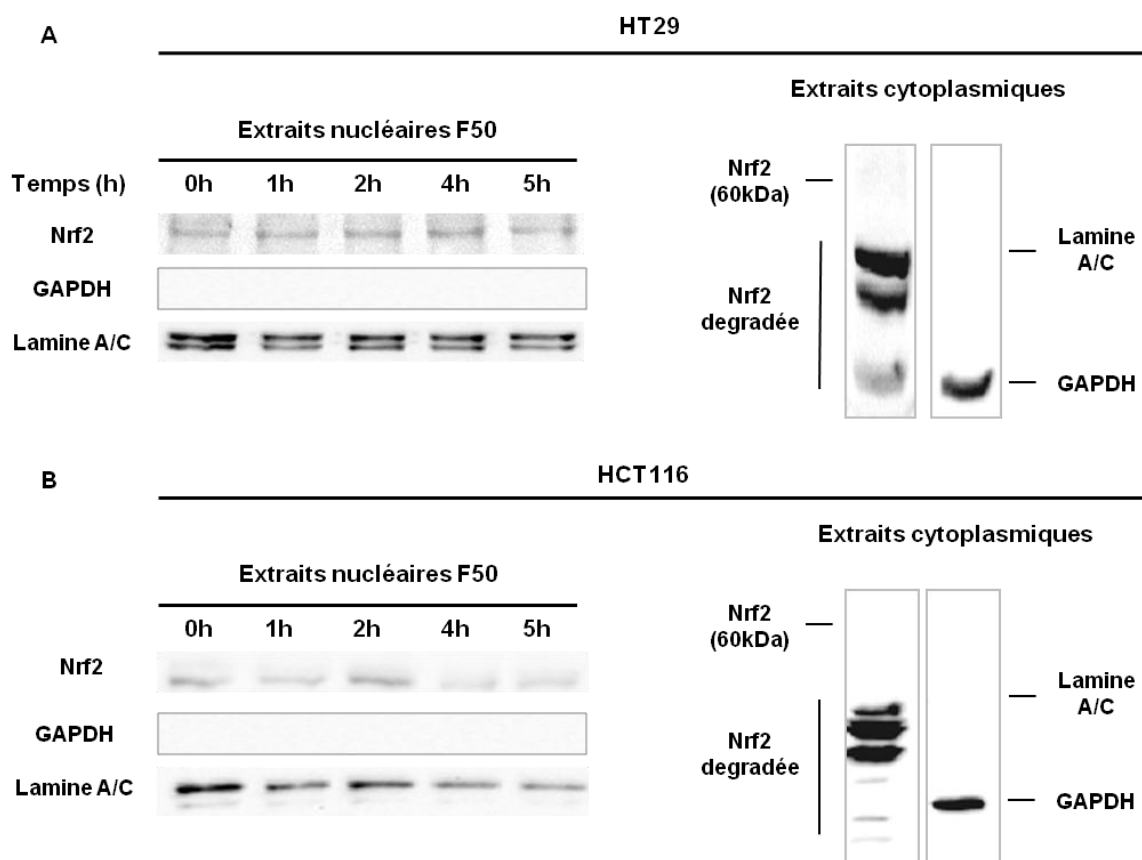


Figure 96 : Absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1 par Féno

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été traitées pendant 1 h, 2 h, 4 h et 5 h par 50 μ M de Féno. Après incubation, les extraits cytoplasmique et nucléaire sont préparés, puis analysés par immunoréplique, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**. Une bande, estimée à 60 kDa, est détectée dans les extraits de protéines nucléaires. Plusieurs bandes sont détectées dans les extraits cytoplasmiques, préparés à partir de cellules non traitées. Elles correspondent à la protéine Nrf2 dégradée. La qualité des extraits est vérifiée par immunoréplique, en utilisant une solution d'anticorps dirigés contre la GAPDH, localisée uniquement dans le cytoplasme, et la lamine A/C, protéine exclusivement nucléaire.

b. Absence d'induction de l'expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1

Cette absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1, par 50µM de Féno, est vérifiée par un manque d'induction de ses gènes-cibles dans les cellules HT29 (Figure 97A). Cette absence d'induction est également vérifiée dans les cellules HCT116 avec NQO1 et GCL (Figure 97B). Néanmoins, une induction de l'expression de HO-1 et de GSTπ est observée dans ces cellules (Figure 97B). Ces protéines peuvent être induites par d'autres voies de signalisation. Par exemple, l'activation de la transcription du gène codant pour HO-1 par PPARα a déjà été rapportée²⁴⁷. En revanche, c'est plutôt une diminution de la transcription de GSTπ par des agonistes de PPARα qui est observée dans le foie de souris³⁷².

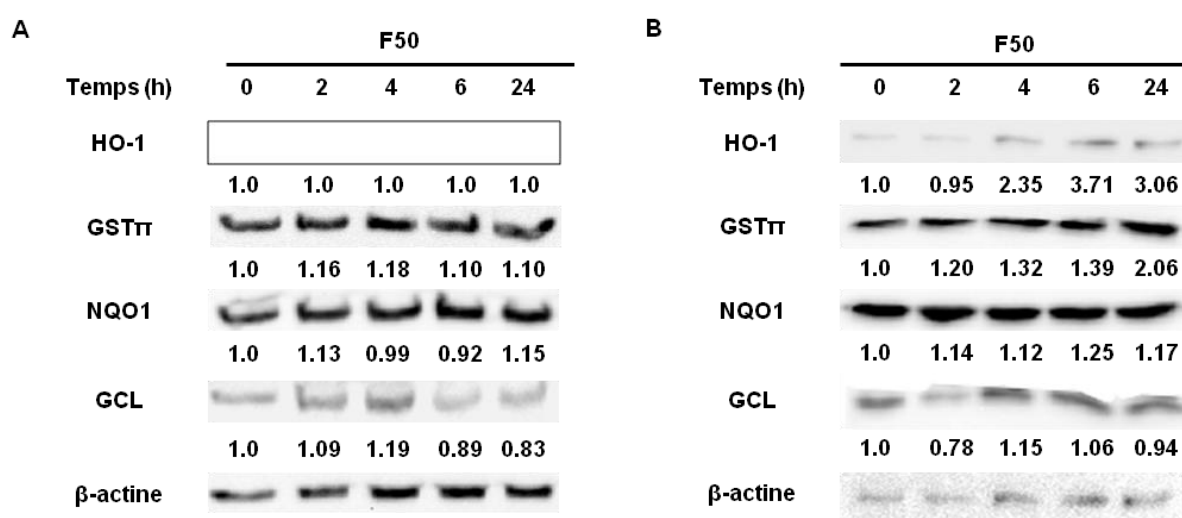


Figure 97 : Impact de Féno sur l'expression des gènes cible de la voie Nrf2/Keap1

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été traitées pendant 2 h, 4 h, 6 h et 24 h par 50µM de Féno. Les expressions de l'Hème Oxygénase 1 (HO1), de la Glutathion-S-Transférase π (GSTπ), de la NAD(P)H déhydrogénase quinone 1 (NQO1) et de la Glutamate Cystéine Ligase (GCL) sont étudiées par immunoréplique. Elle est réalisée à partir de 25 µg de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expression de chaque protéine a été rapportée à celle de la β-actine, pour chaque condition, puis comparée à celle obtenue dans les cellules non traitées. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

H. Impact du stress oxydant sur la viabilité cellulaire

1. Modification de la viabilité cellulaire par les ligands de PPARγ dépendante du stress oxydant

a. Diminution de la prolifération par les ligands de PPARγ – Importance du stress oxydant

Le stress oxydant pouvant être à l'origine de la diminution de la prolifération cellulaire, son implication a été étudiée suite aux traitements par Pio et ΔPio. Pour cela, un co-traitement avec l'acide ascorbique a été réalisé. Des études préliminaires ont montré que le traitement

Résultats et Discussion

par l'acide ascorbique n'avait aucune influence sur la prolifération cellulaire après 3 jours de traitement, contrairement à la NAC. En effet, cette dernière induit une baisse de 30% de la prolifération après 3 jours de traitement, notamment en raison d'une accumulation des cellules en phase G0/G1 (Figure 98).

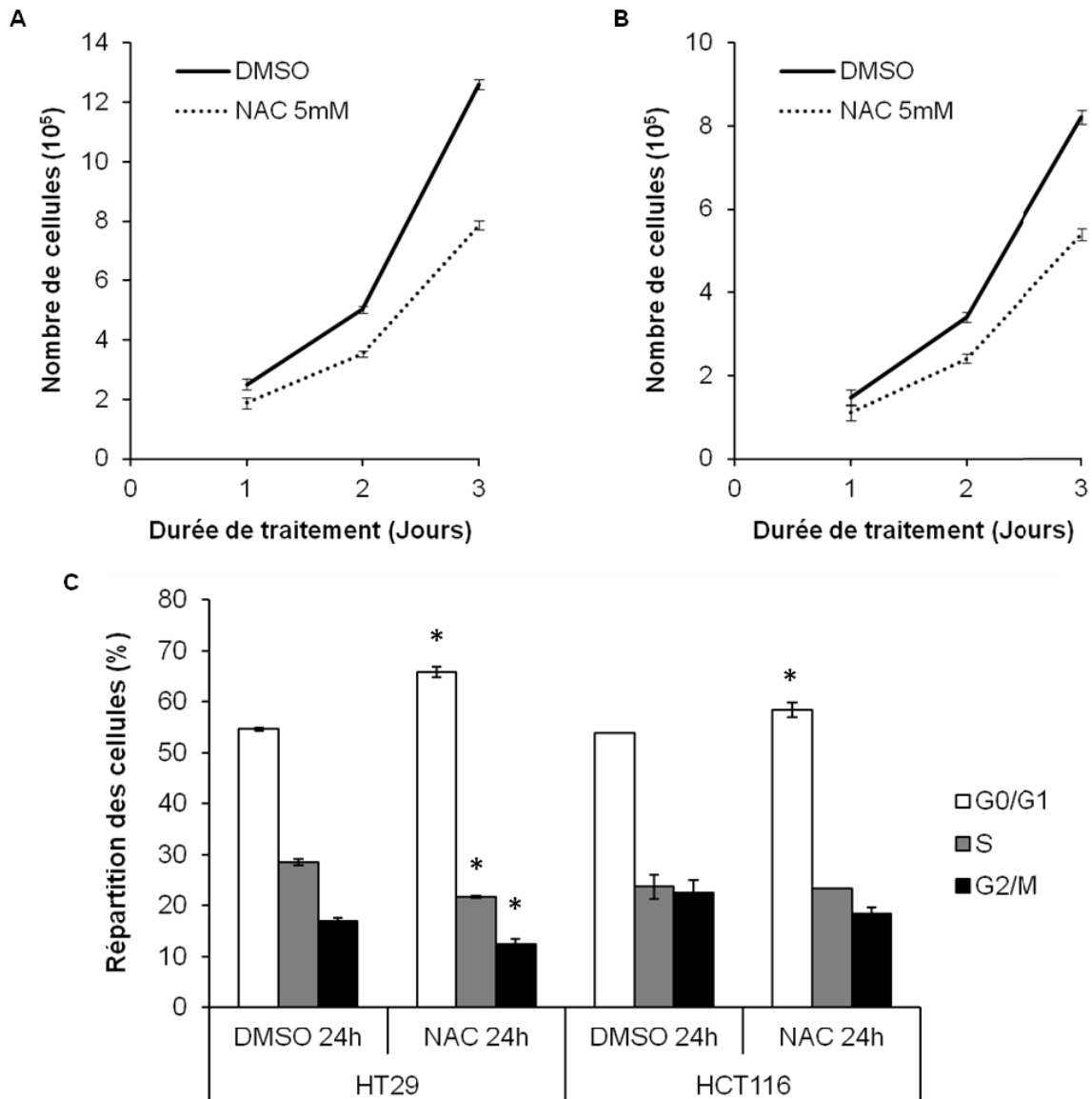


Figure 98 : Impact de la NAC sur la prolifération cellulaire

(A et B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 5mM de N-Acétylcystéine (NAC). 4 comptages des cellules vivantes sont effectués chaque jour pour chaque série (n = 3). (C) Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées pendant 24 h par 0.1% (v/v) de DMSO ou 5mM de NAC. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par NAC, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Au préalable, il a été vérifié que l'acide ascorbique diminuait bien les ROS induits par Pio et Δ Pio dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 99A et B). Effectivement, le prétraitement de

1 h par 1mM d'acide ascorbique réduit le taux des ROS induits par ces molécules après 15 min de traitement et limite la baisse de croissance cellulaire suite à un traitement de 3 jours (Figure 99C et D). La génération d'un stress oxydant par ces molécules serait donc partiellement responsable de la réduction de prolifération observée. Cet effet a déjà été observé par Feinstein *et al.*⁵⁵.

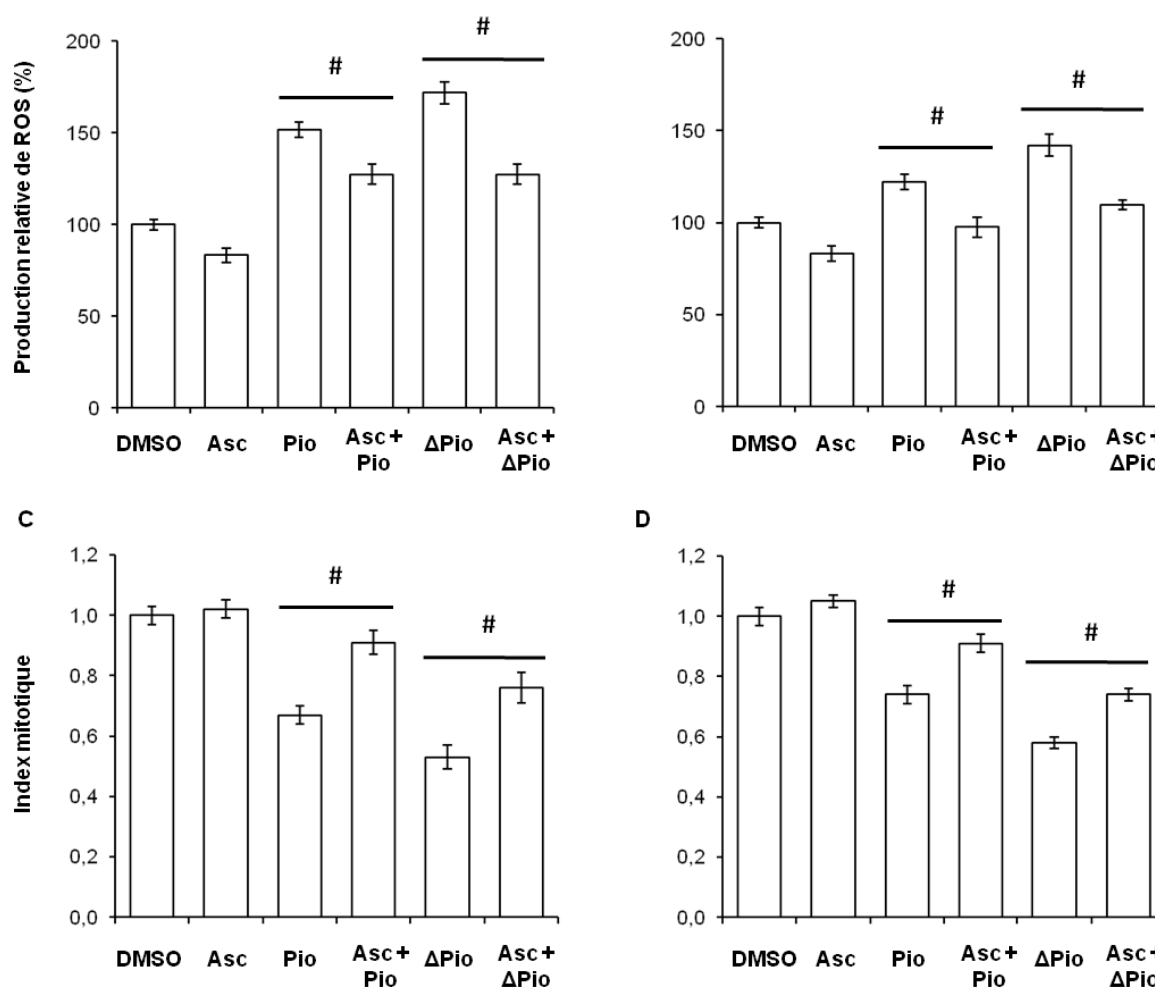


Figure 99 : Impact du stress oxydant sur la diminution de croissance induite par Pio et ΔPio

(A et B) La génération de ROS a été mesurée, comme précédemment, dans les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) suite à un prétraitement de 1 h par 1mM d'acide ascorbique, puis traitées par 50μM de Pio ou ΔPio pendant 15 min. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons, de 3 séries indépendantes.

(C et D) Les cellules HT29 (C) et HCT116 (D) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 50μM de Pio ou ΔPio, en association ou non avec 1mM d'acide ascorbique. Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par Pio et ΔPio, en association ou non avec Asc, au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO.

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio ou ΔPio, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à l'acide ascorbique.

b. Induction de l'autophagie par les ligands de PPAR γ – Importance du stress oxydant

Le stress oxydant pouvant induire l'autophagie²⁰⁵, son implication dans ce phénomène a été étudiée en cotraitant les cellules HT29 et HCT116 pendant 3 jours par 5mM de NAC et 50 μ M de Pio ou Δ Pio. Précédemment, il a été vérifié que le prétraitement par la NAC diminuait bien les ROS induits par Pio et Δ Pio dans les cellules HT29 et HCT116 (Figure 94A et G ; p.120). De plus, le co-traitement avec NAC permet de diminuer l'induction de l'expression de Beclin-1 par Pio et Δ Pio après 72 h, sans toutefois l'inhiber totalement (Figure 100A et B). Le stress oxydant induit par Pio et Δ Pio serait donc bien impliqué dans l'induction du phénomène d'autophagie.

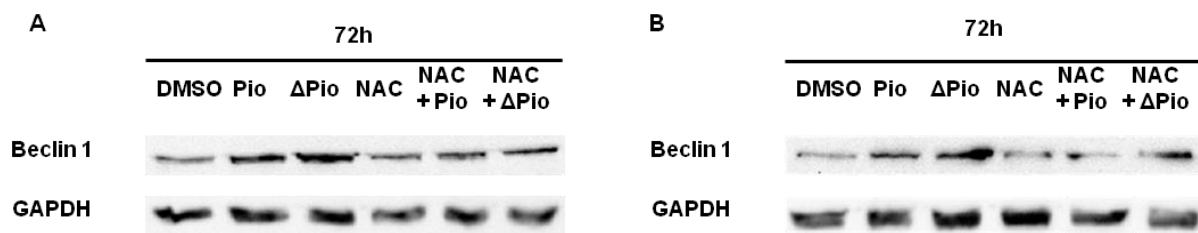


Figure 100 : Induction de l'autophagie par Pio et Δ Pio, dépendante du stress oxydant

(A-B) Les cellules HT29 (A) et HCT116 (B) ont été cotraitées pendant 72 h par 5mM de NAC et 50 μ M de Pio ou Δ Pio. L'expression de Beclin-1 est étudiée par immunoréplique, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

2. Modification de la viabilité cellulaire par Féno – Importance du stress oxydant

Bien que le prétraitement par l'acide ascorbique diminue significativement les ROS induits par 25 μ M et 50 μ M de Féno dans les cellules HT29 (Figure 101A), il ne contrecarre que la diminution de prolifération des cellules traitées pendant 3 jours par 50 μ M de Féno (Figure 101B). Aucune variation n'est observée lorsque le traitement par 25 μ M de Féno est associé à l'acide ascorbique (Figure 101B). Le stress oxydant n'est donc pas impliqué dans la diminution de prolifération induite par 25 μ M de Féno. En revanche, il serait partiellement impliqué dans celle induite par 50 μ M de Féno. Cette différence d'action pourrait être due au fait que le traitement par 50 μ M de Féno induit une production de ROS supérieure au traitement par 25 μ M de Féno (Figure 82). Dans les cellules HCT116, l'acide ascorbique diminue significativement les ROS produits par Féno (Figure 101C) et il contrecarre partiellement la diminution de prolifération induite par 25 μ M et 50 μ M de Féno (Figure 101D). De même, il a déjà été démontré, dans d'autres modèles, que le stress oxydant induit

par les fibrates pouvait être responsable d'une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaire^{33,238-240}.

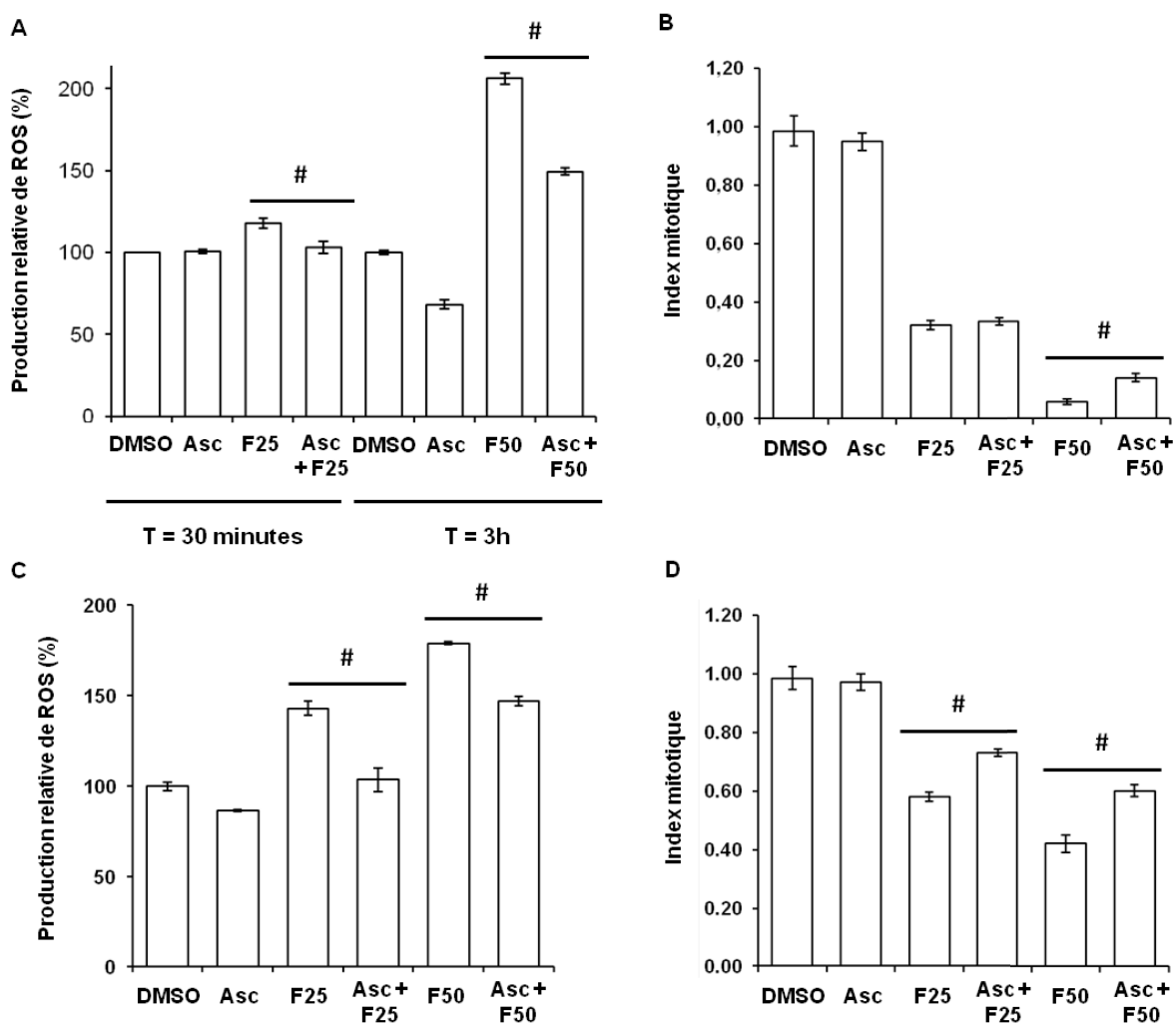


Figure 101 : Impact du stress oxydant sur la diminution de croissance induite par Féno

(A et C) La génération de ROS a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules prétraitées 1h par 1 mM d'acide ascorbique, puis traitées par 25µM de Féno (F25) pendant 30 min ou par 50µM de Féno (F50) pendant 3 h (cellules HT29 : A) ou traitées 4 h par F25 et F50 (cellules HCT116 : C). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

(B et D) Les cellules HT29 (B) et HCT116 (D) ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par 25µM ou 50µM de Féno, en association ou non avec 1mM d'acide ascorbique. Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par Féno, en association ou non avec Asc, au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à l'acide ascorbique.

I. Modification du métabolisme glycolytique par les ligands de PPAR

Il a été montré dans divers types cellulaires que le traitement par les TZD induisait une inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire³³. Ce dysfonctionnement serait à l'origine d'une libération de lactate. De plus, afin de palier à cette perturbation mitochondriale, la

Résultats et Discussion

glycolyse serait augmentée³⁴²⁻³⁴⁴. En effet, une activation de HIF1 α , tout comme un accroissement de la transcription de ses gènes-cibles impliqués dans la glycolyse, a été observée suite au traitement par les TZD^{333,334}. En revanche, le Féno semble plutôt induire une diminution de la glycolyse, au profit de la β -oxydation des acides gras, notamment *via* une réduction de l'expression et de l'activité de HIF1 α ^{309,325,329}. Des essais préliminaires ont montré une acidification du milieu extracellulaire des cellules HT29 traitées par Pio et Δ Pio pendant 48 h. En revanche, de façon inattendue, l'acidification du milieu est également observée suite au traitement de ces cellules par Féno pendant 48 h (Résultats non présentés).

1. Augmentation du métabolisme glycolytique par les ligands de PPAR γ

Les taux de glucose et de lactate dans le milieu extracellulaire ont été mesurés, par des dosages colorimétriques, suite au traitement des cellules HT29 par Pio et Δ Pio pendant 48 h. Une augmentation de la consommation de glucose (Figure 102A), associée à un accroissement de la libération de lactate (Figure 102B), est observée suite à ces traitements. Ces résultats sont en relation avec l'acidification du milieu observée précédemment.

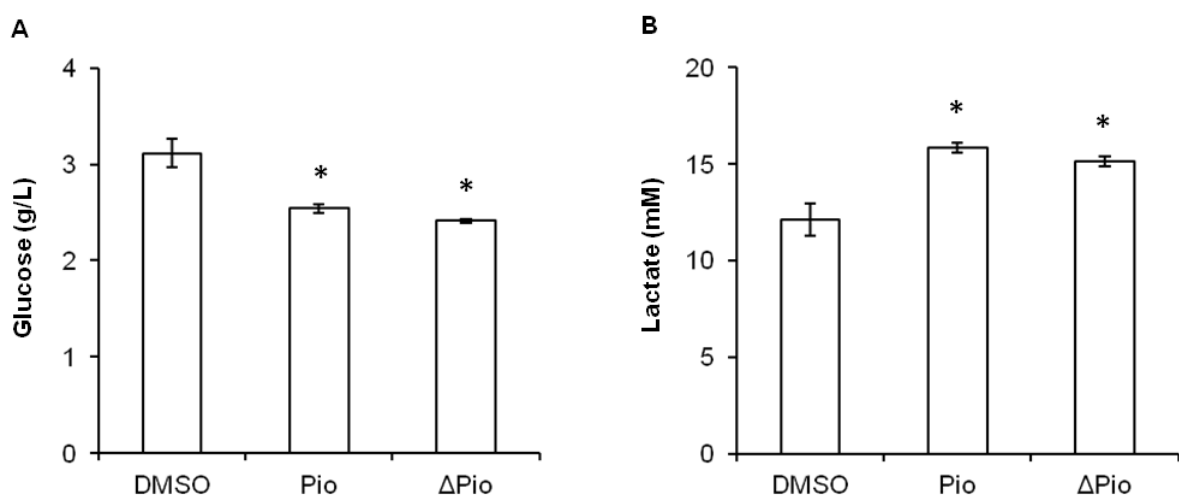


Figure 102 : Augmentation de la consommation de glucose et de la libération de lactate par les ligands de PPAR γ

(A et B) Les dosages du glucose (A) et du lactate (B) dans le milieu extracellulaire ont été effectués suite au traitement des cellules HT29 par 50 μ M de Pio et Δ Pio pendant 48h, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio et Δ Pio, et celles obtenues avec le DMSO.

Un dosage de l'activité LDH intracellulaire a montré que l'augmentation de la production et de la libération de lactate était corrélée à un accroissement de l'activité de cette enzyme dans les cellules traitées (Figure 103).

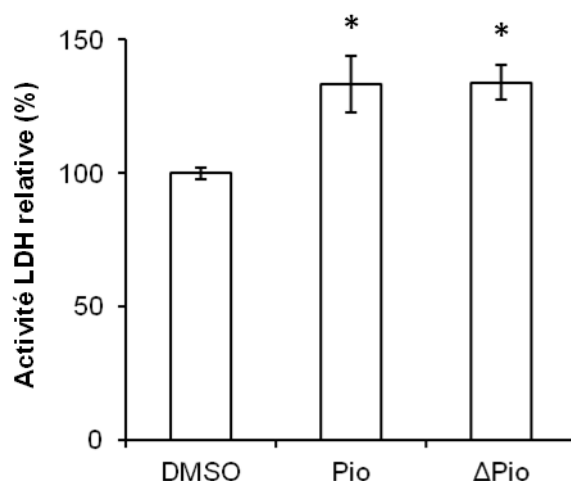


Figure 103 : Augmentation de l'activité LDH intracellulaire par les ligands de PPAR γ

L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée dans les cellules HT29 traitées pendant 48 h par 50 μ M de Pio ou Δ Pio, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Pio et Δ Pio, et celles obtenues avec le DMSO.

L'étude de l'expression d'une enzyme clé de la glycolyse, l'hexokinase 2, a ensuite été effectuée (Figure 104). Les traitements par Pio et Δ Pio induisent bien l'expression de cette protéine dans les cellules HT29 de manière progressive. Son expression étant augmentée sous l'action de HIF-1 α ³⁰⁵, l'expression de ce facteur de transcription a été évaluée suite au traitement par les ligands de PPAR γ (Figure 104). Pio induit l'expression de cette protéine dès 2 h de traitement et elle est maximale après 4 h. En revanche, Δ Pio n'induit son expression qu'à partir de 4 h et elle n'est maximale qu'après 6 h de traitement. Les effets étant identiques pour Pio et Δ Pio, il semblerait qu'ils soient indépendants de l'activation de PPAR γ . En revanche, Pino et *al.* ont montré que l'augmentation de l'expression des gènes-cibles de HIF-1 α , suite au traitement des adipocytes par la Troglitazone, était dépendante de PPAR γ ³³⁴.

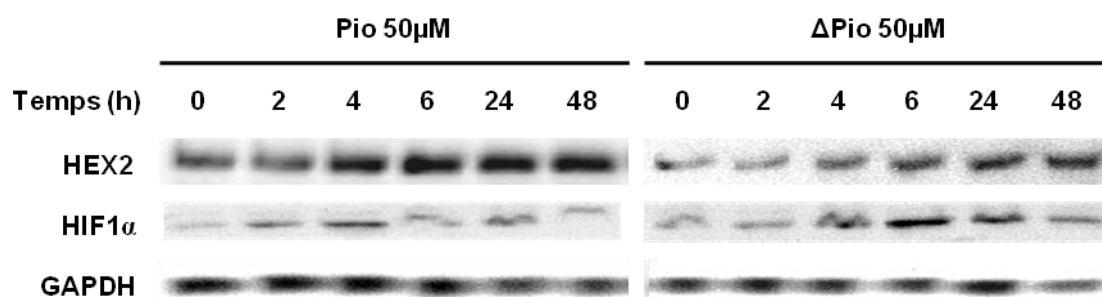


Figure 104 : Augmentation de l'expression de l'hexokinase 2 et de HIF1 α par les ligands de PPAR γ

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 2 h, 4 h, 6 h, 24 h et 48 h par 50 μ M de Pio ou Δ Pio. L'expression de l'hexokinase 2 (HEX2) et de HIF1 α est étudiée par immunoréplique, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

Résultats et Discussion

Les traitements par les ligands de PPAR γ semblent mimer des conditions hypoxiques en augmentant l'expression de HIF-1 α , ainsi que l'expression d'un de ses gènes-cibles, l'hexokinase 2. Cela a pour effet d'accentuer la glycolyse, effet visible par un accroissement de la consommation de glucose et de la libération de lactate dans le milieu extracellulaire. Cette accumulation du lactate est également corrélée à une hausse de l'activité de la LDH intracellulaire. Ces résultats sont cohérents avec l'augmentation de la glycolyse, induite par les ligands de PPAR γ , décrite dans la bibliographie³⁴²⁻³⁴⁴. L'induction de HIF-1 α , par Pio et Δ Pio, pourrait également être à l'origine du phénomène d'autophagie, comme cela a été montré avec la Troglitazone et la Rosiglitazone dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231³⁵⁶. Enfin, l'activation de la voie Nrf2/Keap1 par les ligands de PPAR γ pourrait être responsable de l'inhibition de différents gènes impliqués dans la lipogénèse (FAS, ACC, ...). En effet, cela a déjà été décrit dans le foie de souris traitées par le CDDO³⁷³. Paradoxalement, les TZD accroissent la synthèse des acides gras dans le foie et le tissu adipeux de rongeurs, notamment en provoquant une hausse de l'expression de la FAS^{340,341}.

2. Augmentation du métabolisme glycolytique par Féno

Comme précédemment, les taux de glucose et de lactate dans le milieu extracellulaire ont été mesurés, par des dosages colorimétriques, suite au traitement des cellules HT29 par 25 μ M et 50 μ M de Féno pendant 48 h (Figure 105).

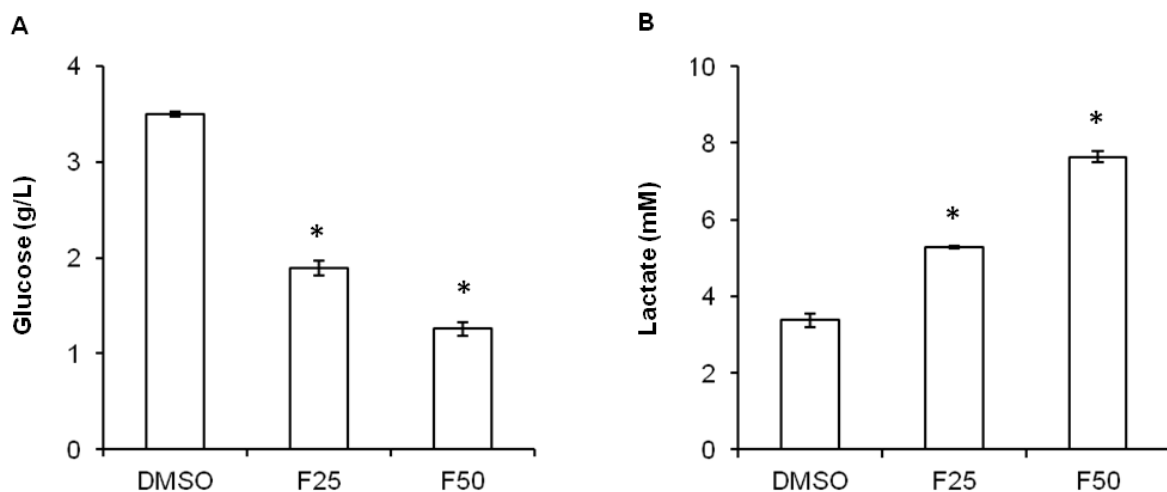


Figure 105 : Augmentation de la consommation de glucose et de la libération de lactate par Féno

(A et B) Les dosages du glucose (A) et du lactate (B) dans le milieu extracellulaire ont été effectués suite au traitement des cellules HT29 par 25 μ M et 50 μ M de Féno pendant 48 h, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues avec le DMSO.

Une hausse de la consommation de glucose (Figure 105A), associée à une hausse de la libération de lactate (Figure 105B), est observée suite à ces traitements. L'effet est plus marqué avec 50 μ M de Féno. Ces résultats correspondent à l'acidification du milieu observé précédemment.

Le dosage de l'activité LDH intracellulaire a également montré que l'accroissement de la production et de la libération de lactate était corrélé à une hausse de l'activité de cette enzyme dans les cellules traitées (Figure 106).

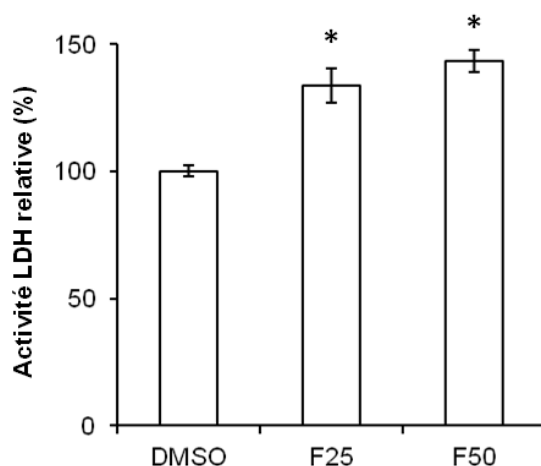


Figure 106 : Augmentation de l'activité LDH intracellulaire par Féno

L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée dans les cellules HT29 traitées pendant 48 h par 25 μ M ou 50 μ M de Féno, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par Féno, et celles obtenues avec le DMSO.

Enfin, les traitements par 25 μ M et 50 μ M de Féno induisent l'expression de l'hexokinase 2 dans les cellules HT29 dès 4 h de traitement (Figure 107). Cette induction s'accroît jusqu'à 6 h de traitement, avant de diminuer progressivement jusqu'à 48 h de traitement.

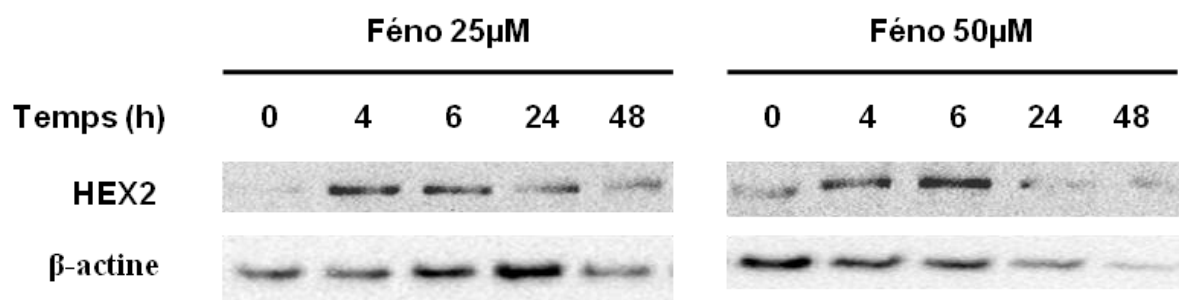


Figure 107 : Induction de l'expression de l'hexokinase 2 par Féno

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 4 h, 6 h, 24 h et 48 h par 50 μ M de Pio ou Δ Pio. L'expression de l'hexokinase 2 (HEX2) est étudiée par immunoréplique, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Résultats et Discussion

Néanmoins, cette réduction d'expression est également visible avec la β -actine après 48 h de traitement par 25 μ M de Féno et dès 24 h avec 50 μ M de Féno, ce qui complique l'analyse. L'étude de l'expression de HIF-1 α n'a pas encore été réalisée, mais il serait intéressant de vérifier l'impact du Féno sur l'expression de ce facteur de transcription.

Les traitements par Féno semblent induire l'expression de l'hexokinase 2, enzyme clé de la glycolyse. Cela a pour effet d'augmenter la consommation de glucose et la libération de lactate dans le milieu extracellulaire. Cette accumulation du lactate est corrélée à une hausse de l'activité de la LDH intracellulaire. Le Féno est donc responsable d'une augmentation de la glycolyse dans les cellules HT29. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus avec ce composé dans d'autres types cellulaires. En effet, le Féno est plutôt connu pour diminuer la glycolyse au profit de la β -oxydation des acides gras^{309,329}.

J. Conclusion

Pio et Δ Pio inhibent la croissance des cellules HT29 et HCT116. Cet arrêt de croissance est accompagné d'un arrêt du cycle cellulaire, qui n'induit pas de processus apoptotique. En revanche, ces molécules sont à l'origine d'une production d'espèces réactives. Ces dernières sont impliquées dans la diminution de prolifération observée et dans l'induction du processus d'autophagie (Figure 108).

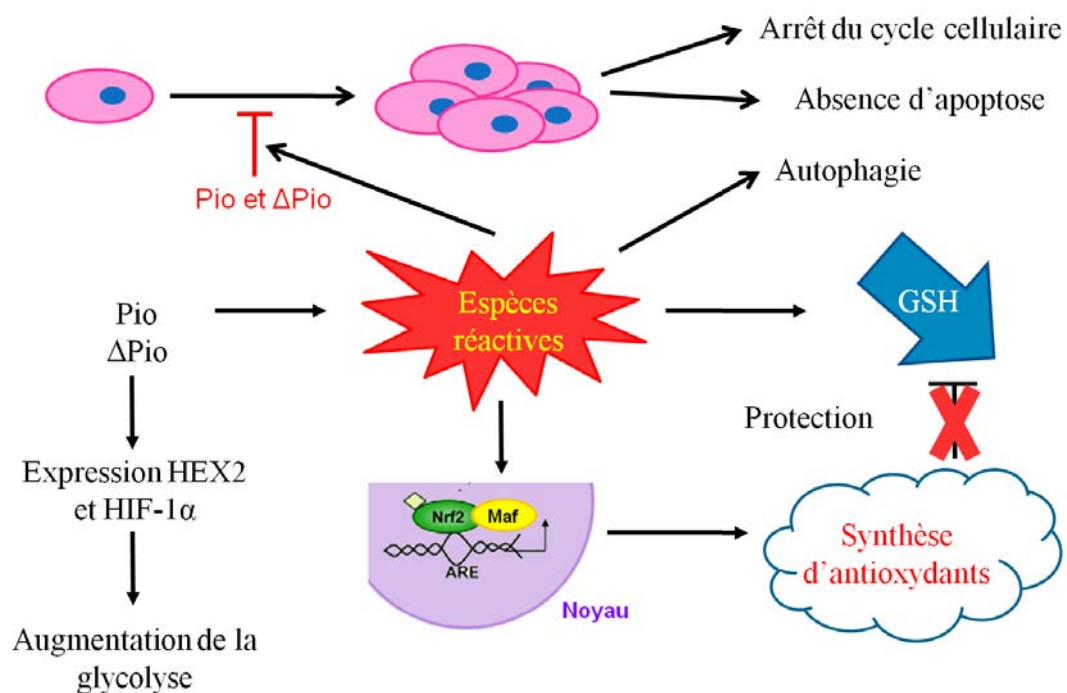


Figure 108 : Représentation schématique de l'action des ligands de PPAR γ sur les cellules cancéreuses coliques

Ce stress oxydant est également responsable d'une diminution du contenu en GSH et de l'activation de la voie Nrf2/Keap1. L'activation de cette dernière permet la synthèse de protéines antioxydantes, qui sont incapables de contrecarrer la baisse du GSH observée. En parallèle, ces composés augmentent l'expression de HIF-1 α et de HEX2, tout comme l'activité de la LDH, ce qui induit une augmentation du métabolisme glycolytique dans les cellules HT29 (Figure 108). A ce jour, il n'est pas possible de déterminer si cette augmentation de la glycolyse a un effet bénéfique ou délétère sur l'inhibition de la prolifération.

De manière similaire, Féno inhibe la croissance des cellules HT29 et HCT116, notamment par un arrêt du cycle cellulaire, qui n'est pas associé à un phénomène apoptotique (Figure 109). En revanche, ce traitement semble induire un phénomène autophagique. Ce composé est responsable de la production d'espèces réactives, impliquées dans la diminution de prolifération observée et dans la baisse limitée du contenu en GSH. Ces espèces réactives ne sont pas à l'origine de l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Aucune induction de l'expression d'enzymes antioxydantes n'est donc observée. En parallèle, Féno augmente l'expression de HEX2 et l'activité de la LDH, ce qui a pour conséquence une augmentation de la glycolyse dans les cellules HT29. Comme pour les ligands de PPAR γ , il n'est pas possible, à ce jour, de déterminer si cette augmentation de la glycolyse a un effet bénéfique ou délétère sur l'inhibition de la prolifération (Figure 109).

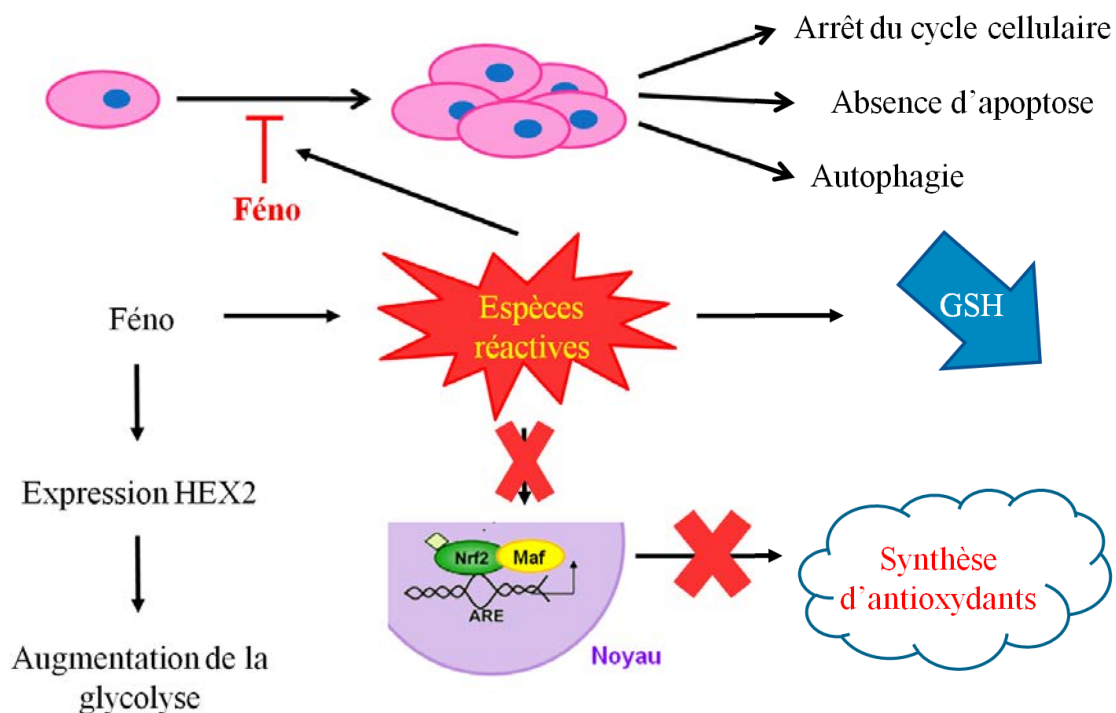


Figure 109 : Représentation schématique de l'action de Féno sur les cellules cancéreuses coliques

II. Activité anticancéreuse des dérivés 4-thiazolidinones

A. Etudes préliminaires

1. Criblage par MTT

Les dérivés 4-thiazolidinones ont été synthétisés par les chimistes du laboratoire. Ainsi, différents hétérocycles (Figure 110) ont été synthétisés et ont permis de moduler la position 2 du cycle thiazolidinone.

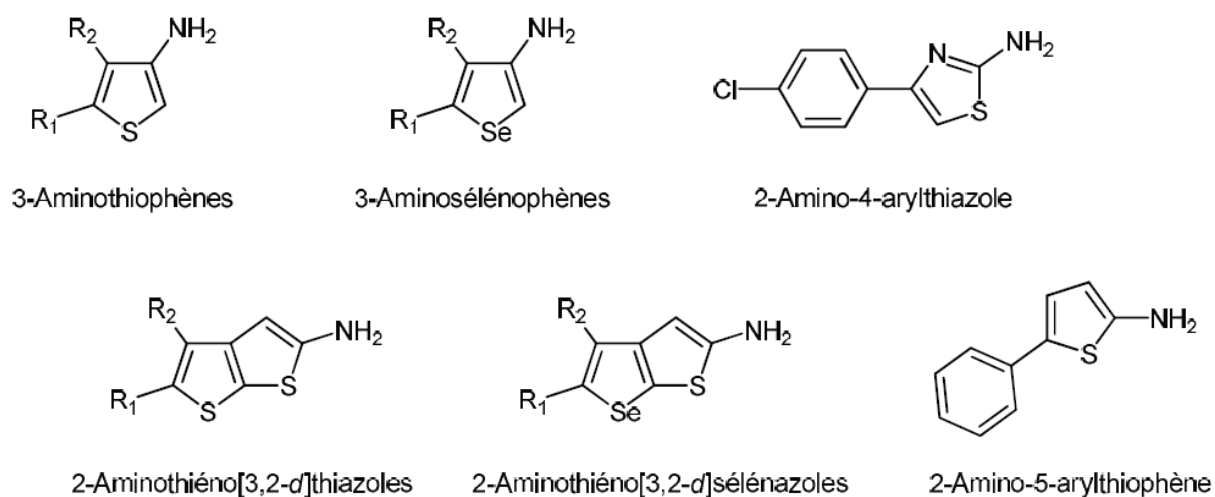


Figure 110 : Structure des différents hétérocycles

Ce dernier a ensuite été fonctionnalisé au niveau des positions 3 et 5 afin d'obtenir 37 dérivés de thiazolidinones présentant trois sites de variations (position A, B et C ; Figure 111).

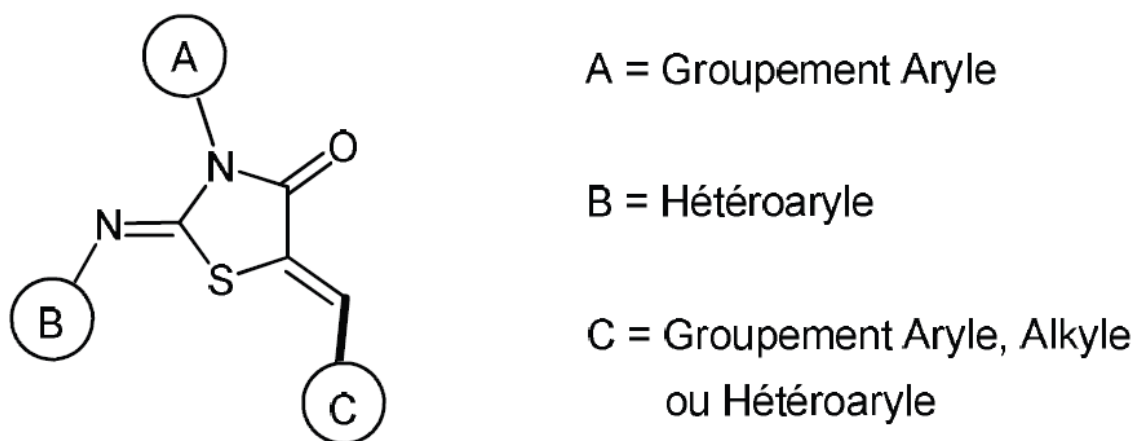


Figure 111 : Trois sites de variation des dérivés 4-thiazolidinones

Une étude préliminaire effectuée au laboratoire a permis de déterminer la capacité anticancéreuse de ces molécules sur différentes cellules cancéreuses coliques (HT29, HCT116 et SW620) ou mammaires (MCF7 et MDA-MB231) par un test MTT. A la suite de ce premier criblage, 19 composés (en gris dans le Tableau 16), ayant une IC₅₀ inférieure à 15µM pour les cellules HT29, ont été sélectionnés. Leur structure est détaillée à la Figure 112.

	HT29	HCT116	SW620	MCF7	MDA-MB231
GR088	11,7 ± 1,1	2,66 ± 0,05	3,5 ± 0,1	1,9 ± 0,4	2,7 ± 0,2
GR090	38,3 ± 7,7	ND	ND	ND	ND
GR091	> 50	ND	ND	> 50	ND
GR092	> 50	ND	ND	ND	ND
GR115	> 50	ND	>50	> 50	ND
GR121	10,5 ± 5,8	11,2 ± 2,2	> 50	> 50	18,0 ± 1,8
GR122	3,8 ± 0,9	1,3 ± 0,1	28,1 ± 12,4	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,2
GR123	6,4 ± 1,5	1,0 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,04
GR124	2,8 ± 2,0	11,6 ± 3,4	4,6 ± 0,7	6,7 ± 0,3	6,4 ± 0,3
GR125	1,5 ± 1,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,05	0,8 ± 0,01
GR127	2,0 ± 1,5	3,3 ± 0,1	0,7 ± 0,6	2,5 ± 0,3	3,5 ± 0,2
GR128	> 50	ND	ND	> 50	ND
GR130	3,7 ± 3,1	3,0 ± 0,6	> 50	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1
GR132	33,5 ± 4,4	ND	ND	> 50	ND
GR133	11,5 ± 7,0	21,6 ± 1,1	> 50	30,2 ± 6,5	10,9 ± 0,5

Tableau 16 : IC₅₀ des dérivés 4-thiazolidinones synthétisées

Les composés ont été testés par MTT, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**, afin de déterminer leurs IC₅₀ sur chacune des 5 lignées cellulaires. Les résultats sont exprimés sous la forme Moyenne ± écart-type après la réalisation de 3 expériences indépendantes. ND = Non Déterminé.

	HT29	HCT116	SW620	MCF7	MDA-MB231
GR134	10,9 ± 3,1	1,7 ± 0,2	> 50	7,6 ± 0,7	1,9 ± 0,1
GR188	> 50	ND	ND	> 50	ND
GR198	4,1 ± 0,6	7,4 ± 0,7	8,7 ± 1,6	3,7 ± 0,7	4,4 ± 0,3
GR223	13,6 ± 1,2	14,5 ± 4,4	16,8 ± 1,0	12,4 ± 1,6	18,8 ± 0,4
GR226	42,4 ± 2,2	43,8 ± 4,6	ND	21,8 ± 1,0	35,6 ± 1,9
GR265	> 50	ND	ND	> 50	ND
GR269	8,9 ± 2,1	23,8 ± 6,8	>50	> 50	> 50
GR274	0,5 ± 0,1	0,2 ± 0,02	0,20 ± 0,1	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,002
GR276	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,89 ± 0,1	0,4 ± 0,05	0,8 ± 0,1
GR277	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,03	0,05 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,03
GR280	2,9 ± 0,7	7,5 ± 4,3	> 50	>50	> 50
GR281	1,8 ± 0,3	1,2 ± 0,03	20,3 ± 2,8	0,3 ± 0,1	0,9 ± 0,05
GR293	> 50	ND	ND	15,2 ± 1,7	> 50
GR294	> 50	ND	ND	21,0 ± 0,4	24,7 ± 0,6
GR295	10,3 ± 2,0	9,2 ± 0,3	18,4 ± 4,4	5,1 ± 1,9	8,4 ± 0,2
GR296	45,5 ± 5,8	ND	ND	3,3 ± 0,2	22,8 ± 0,2
GR297	> 50	ND	ND	> 50	ND
GR298	> 50	ND	ND	ND	ND
GR308	36,6 ± 3,9	ND	> 50	>50	ND
GR309	41,4 ± 7,4	ND	ND	> 50	ND
GR310	28,9 ± 8,6	ND	>50	> 50	ND
GR311	29,2 ± 4,3	ND	ND	> 50	ND

Tableau 16 (Suite) : IC₅₀ des dérivés 4-thiazolidinones synthétisées

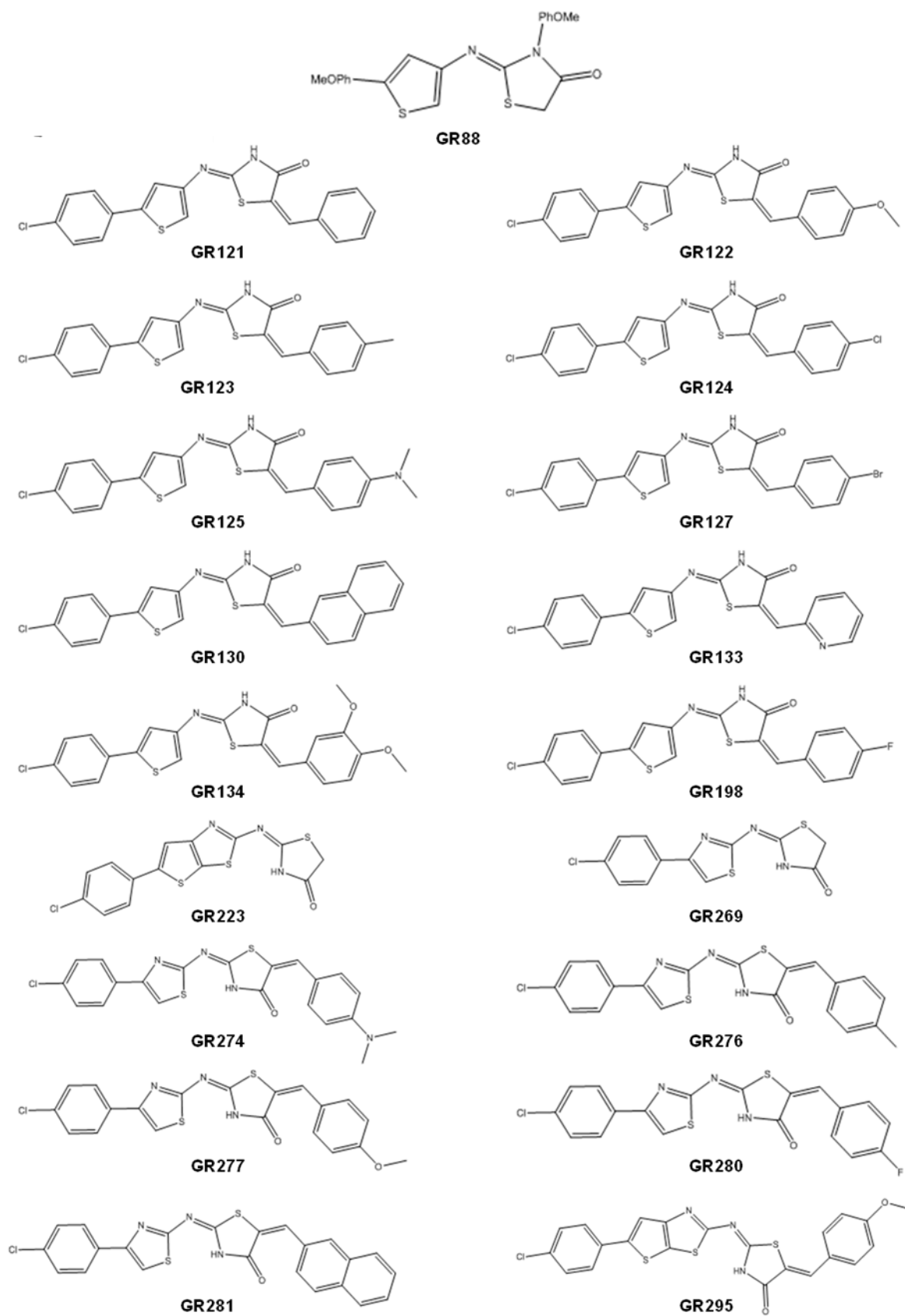


Figure 112 : Structure des dérivés 4-thiazolidinones sélectionnés

2. Criblage par comptage au bleu Trypan

La prolifération des cellules HT29 a été étudiée suite à un traitement quotidien pendant 3 jours par les 4-thiazolidinones sélectionnées (Figure 113). Pour chaque molécule, la concentration utilisée correspond à l'IC₅₀ obtenue avec les cellules HT29. Dans ces conditions, les GR280, GR277, GR223 et GR269 n'induisent aucune diminution de la prolifération des cellules HT29 (en gris sur la Figure 113), c'est pourquoi les investigations n'ont pas été prolongées. Les GR121, GR198, GR274, GR127, GR276, GR124, GR295 et GR281 réduisent, quant à elles, la prolifération cellulaire de manière modérée (respectivement 12%, 18%, 18%, 22%, 23%, 24%, 26% et 28% d'inhibition). De plus, les GR133, GR88 et GR130 entraînent une baisse importante du nombre de cellules après 3 jours de traitement (respectivement 40%, 44% et 52% d'inhibition). Enfin, les GR122, GR134, GR125 et GR123 inhibent fortement la prolifération des cellules HT29 (entre 90 et 95% d'inhibition).

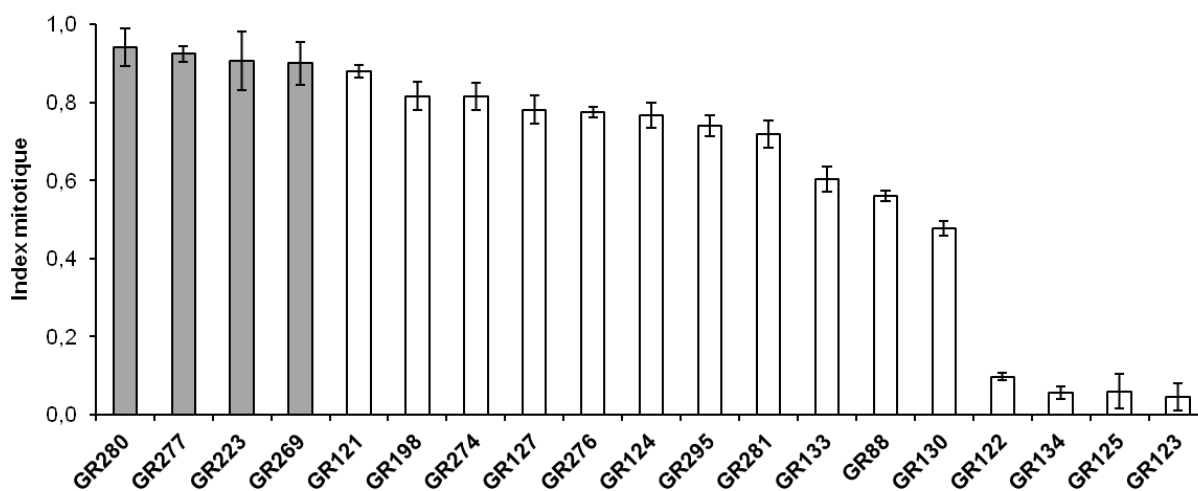


Figure 113 : Effet des 4-thiazolidinones sur la prolifération des cellules HT29

Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par différentes thiazolidinones à la concentration correspondant à leur IC₅₀. Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par les dérivés 4-thiazolidinones au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO.

En blanc, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Etant donné que les cellules étaient traitées à l'IC₅₀, une inhibition de croissance de 50% après 3 jours était attendue pour tous les composés. Or, pour certains d'entre eux, l'inhibition de croissance était inexistante ou au contraire elle était largement supérieure à 50%. Ces différences pourraient être dues au fait que, lors du test MTT, les cellules sont traitées durant 3 jours sans renouvellement du milieu, tandis que le milieu est renouvelé tous les jours, lors du comptage au bleu Trypan. Elles pourraient aussi être provoquées par une modification de

l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale par les différents traitements, ce qui biaiserait l'extrapolation de cette activité au nombre de cellules vivantes.

3. Conclusion des essais préliminaires

A la suite des essais préliminaires, les GR122, GR123, GR125, GR134, appartenant à la série thiophénique, ont été sélectionnées pour approfondir leur mode de fonctionnement. En effet, ces dernières font partie des molécules les plus efficaces pour inhiber la prolifération des cellules HT29, avec des IC_{50} basses, et elles ont des structures similaires. En revanche, les GR274, GR276 et GR277, appartenant à la série thiazolique, ne sont pas très efficaces, mais leurs IC_{50} , déterminées par MTT, sont très basses ($0,5\mu\text{M}$). Des tests avec des concentrations plus importantes ont donc été effectués (Figure 114).

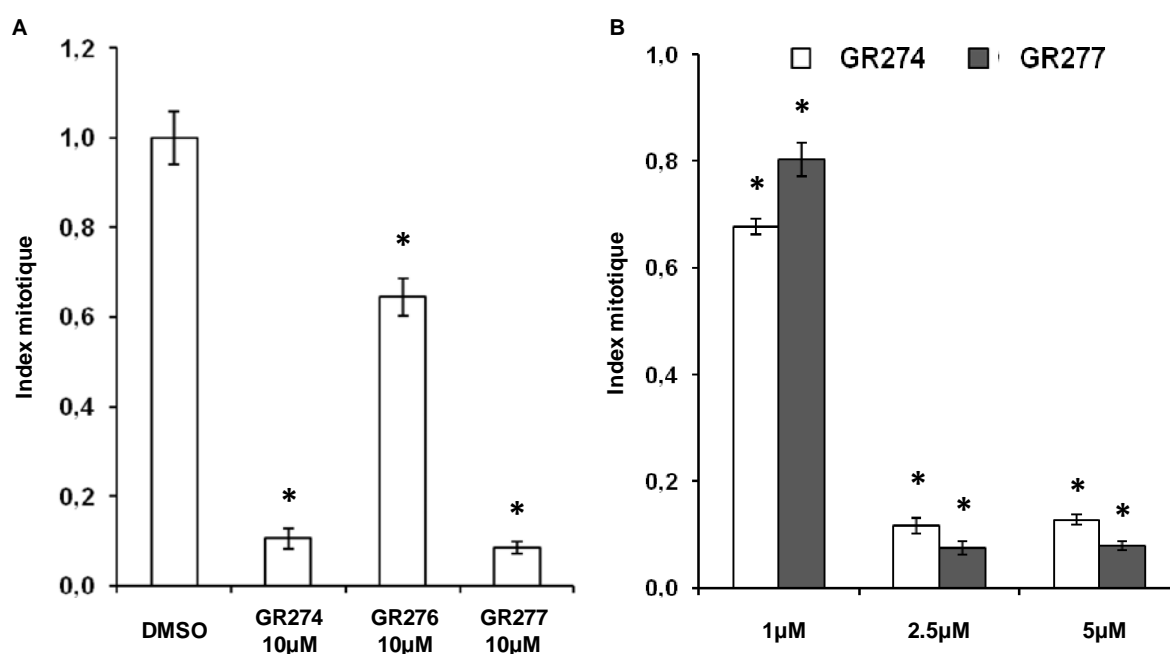


Figure 114 : Effet dose des GR274, GR276 et GR277 sur la prolifération des cellules HT29

(A et B) Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par $10\mu\text{M}$ de GR274, GR276 et GR277 (A) ou par des concentrations croissantes ($1\mu\text{M}$, $2,5\mu\text{M}$ et $5\mu\text{M}$) de GR274 et GR277 (B). Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par les dérivés 4-thiazolidinones au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Un premier essai a été réalisé à $10\mu\text{M}$ (Figure 114A). Dans ce cas, la GR276 induit une baisse du nombre de cellules d'environ 35% après 3 jours de traitement, tandis que les GR274 et GR277 induisent une diminution de plus de 90% (Figure 114A). Pour ces dernières, une gamme de concentrations, allant de $1\mu\text{M}$ à $5\mu\text{M}$, a donc été testée (Figure 114B). Les traitements par $1\mu\text{M}$ réduisent la prolifération cellulaire d'environ 30% pour la GR274 et 20%

Résultats et Discussion

pour la GR277. En revanche, à 2,5 μ M, cette baisse est d'environ 90% pour les deux composés. Elle est, d'ailleurs, égale à celle observée suite au traitement par 5 μ M et 10 μ M (Figure 114A et B). Les cellules seront donc traitées par 2,5 μ M de GR274 ou GR277 pour la suite des expériences.

B. Etude approfondie des effets des dérivés 4-thiazolidinones sélectionnés

1. Effets des dérivés de la série thiophénique

a. Diminution de la prolifération cellulaire

Les GR122, GR123, GR125 et GR134 réduisent très significativement le nombre de cellules dès le 1^{er} jour de traitement (40% - 60% d'inhibition) et ce nombre diminue encore jusqu'au 3^e jour (environ 90% d'inhibition le 2^e jour et 95% le 3^e jour ; Figure 115).

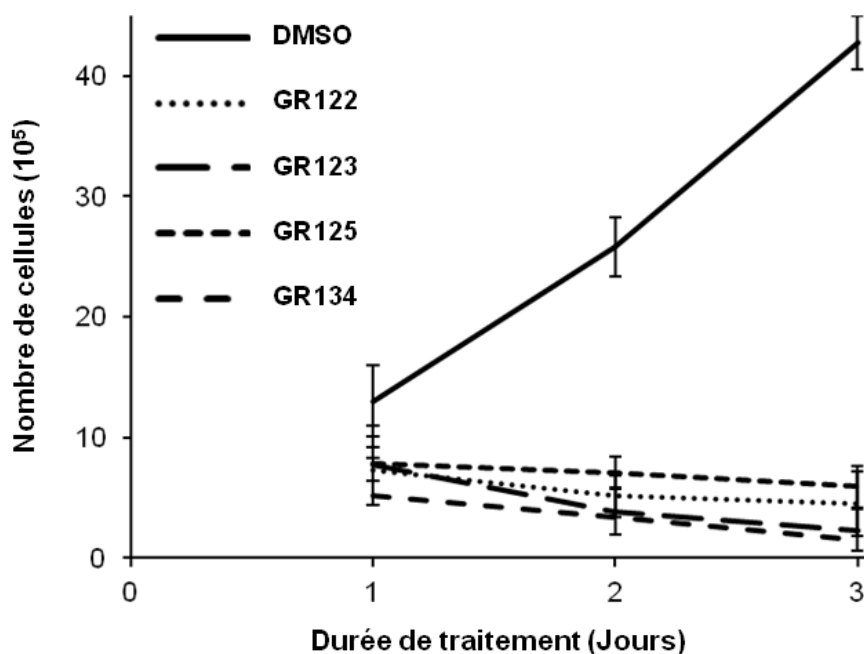


Figure 115 : Diminution de la prolifération cellulaire par les GR122, GR123, GR125 et GR134

Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement pendant 3 jours par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀. Chaque jour, un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Toutes les valeurs sont significatives au test t de student ($p < 0,05$).

Cette baisse de prolifération est également associée à une diminution de la capacité des cellules à former des colonies (Figure 116). Effectivement, après 7 jours de traitement, aucune colonie n'est observée avec les GR122, GR125 et GR134. En revanche, des colonies résiduelles sont observées suite au traitement par la GR123.

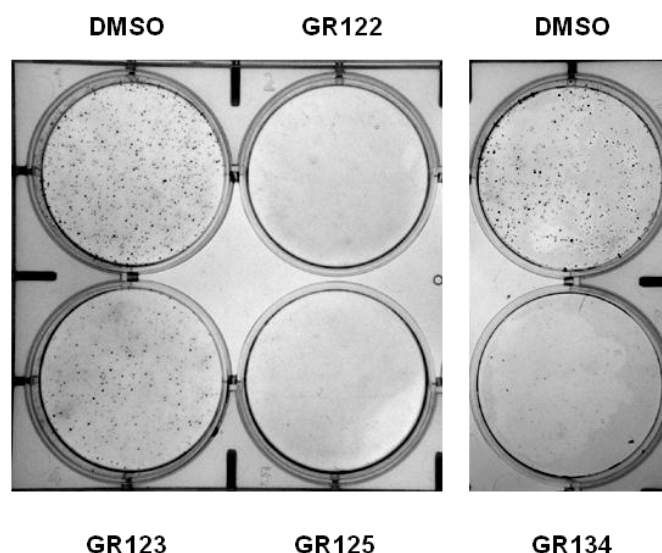


Figure 116 : Diminution de la formation de colonies par les GR122, GR123, GR125 et GR134

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 7 jours par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀, sans changement de milieu. Les colonies sont alors marquées par le bleu de toluidine, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Cette réduction du nombre de cellules pourrait être causée par un arrêt du cycle cellulaire, c'est pourquoi la répartition des cellules dans le cycle a été étudiée (Tableau 17). Les quatre composés induisent une accumulation très importante des cellules en phase G2/M. Ils entraînent aussi une hausse conséquente de la proportion de cellules en phase sub-G1, ce qui sous-entend un phénomène apoptotique.

Traitement	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
DMSO	6.9 ± 2.0	46.1 ± 0.4	23.9 ± 0.3	30.0 ± 0.5
GR122	21.6 ± 2.4	1.2 ± 0.4	18.2 ± 1.6	80.6 ± 1.2
GR123	21.5 ± 1.8	1.2 ± 0.2	14.8 ± 2.0	84.0 ± 1.8
GR125	29.0 ± 1.9	1.5 ± 0.2	14.8 ± 0.7	83.7 ± 0.7
GR134	20.6 ± 2.2	2.3 ± 0.9	11.3 ± 0.9	86.4 ± 0.6

Tableau 17 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par les GR122, GR123, GR125 et GR134

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 24 h par 0,1% (v/v) de DMSO et par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, sub-G1, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes. **En gras**, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les GR122, GR123, GR125 ou GR134, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

b. Diminution de la viabilité cellulaire

Une baisse de la proportion des cellules viables, c'est-à-dire négatives à l'IP, est observée suite au traitement de 24 h par les GR122, GR123, GR125 et GR134. Il est à noter que, pour

Résultats et Discussion

ce temps de traitement, cette diminution est nettement moins prononcée avec la GR122. Après 48 h de traitement, cette proportion s'amenuit encore, notamment pour la GR122 (Figure 117). Ces quatre composés diminuent donc la viabilité cellulaire.

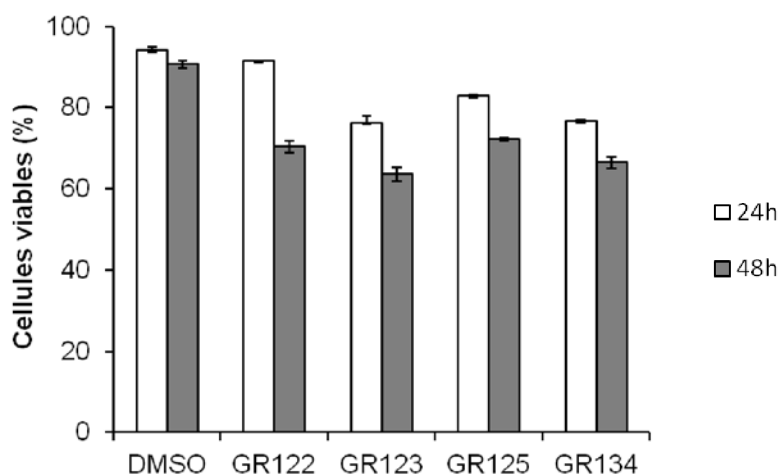


Figure 117 : Diminution de la viabilité cellulaire par les GR122, GR123, GR125 et GR134

La viabilité cellulaire a été évaluée, comme précédemment (Figure 67), après traitement des cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀ pendant 24 h et 48 h. Toutes les conditions présentent une différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

De plus, la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire, indicateurs d'apoptose, sont observées suite aux traitements de 24 h par les GR122, GR123, GR125 et GR134 (Figure 119A). Néanmoins, ce phénomène est moins marqué avec la GR122. Ces résultats sont corrélés à la présence de nombreuses cellules en phase sub-G1 (Tableau 17). Ces composés induisent également une dépolarisation de la membrane mitochondriale, qui peut constituer les prémices d'un processus apoptotique (Figure 119B). Cependant, le clivage de la protéine PARP-1, marqueur d'apoptose, n'est retrouvé que suite aux traitements de 24 h par les GR125 et GR134 (Figure 118).

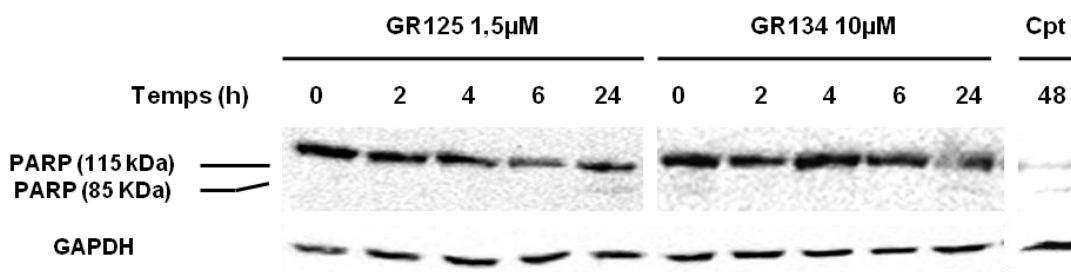


Figure 118 : Clivage de la protéine PARP-1 par les GR125 et GR134

Les cellules HT29 et HCT116 ont été traitées en cinétique (2 h, 4 h, 6 h et 24 h) par 1,5µM de GR125 ou 10µM de GR134. Le traitement de 48 h par 20µM camptothécine (Cpt) est utilisé comme témoin positif. L'expression de la protéine PARP-1 sous sa forme non clivée (115kDa) ou clivée (85kDa) est analysée par immunoréplique. Elle est réalisée, à partir de 25 µg de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Néanmoins, le marquage de la protéine PARP-1 clivée est très faible. Peut être que ce clivage est présent suite aux traitements par les GR122 et GR123, mais qu'il n'a pas été suffisamment mis en évidence par le marquage (Résultats non présentés).

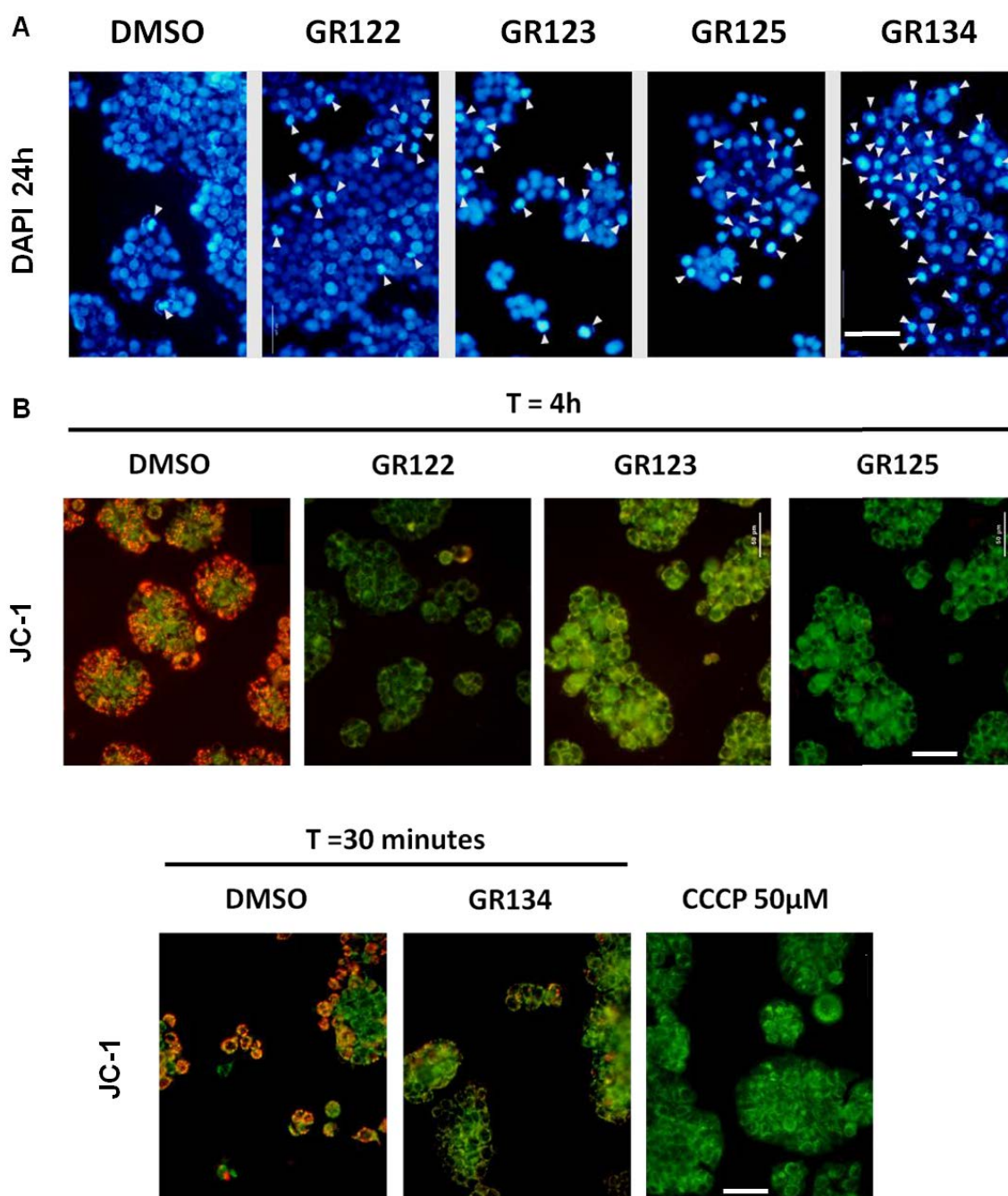


Figure 119 : Induction de l'apoptose des cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134

(A) Mise en évidence des noyaux par DAPI, après traitement des cellules par le DMSO ou par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀ pendant 24 h. Le marquage par DAPI montre une condensation de la chromatine et des noyaux fragmentés suite aux traitements par les différentes molécules. La barre d'échelle correspond à 50µm.

(B) Mise en évidence de la présence du potentiel membranaire mitochondrial (Ψ_m) par JC-1, lors du traitement des cellules HT29 par DMSO ou par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀. La fluorescence orange indique la présence de Ψ_m , absent lors du traitement des cellules par 50µM de CCCP, un agent bloquant la génération du potentiel Ψ_m . Les barres d'échelle représentent 50 µm.

c. Induction du phénomène d'autophagie

L'apparition de vésicules acides est visible, en microscopie, dès le 1^{er} jour de traitement pour les GR122, GR123 et GR125 et à partir du 3^e jour pour la GR134 (Figure 120A). L'étude de l'apparition de ces vésicules acides a également été effectuée par cytométrie en flux après 48 h de traitement et elle confirme les résultats observés en microscopie (Figure 120B).

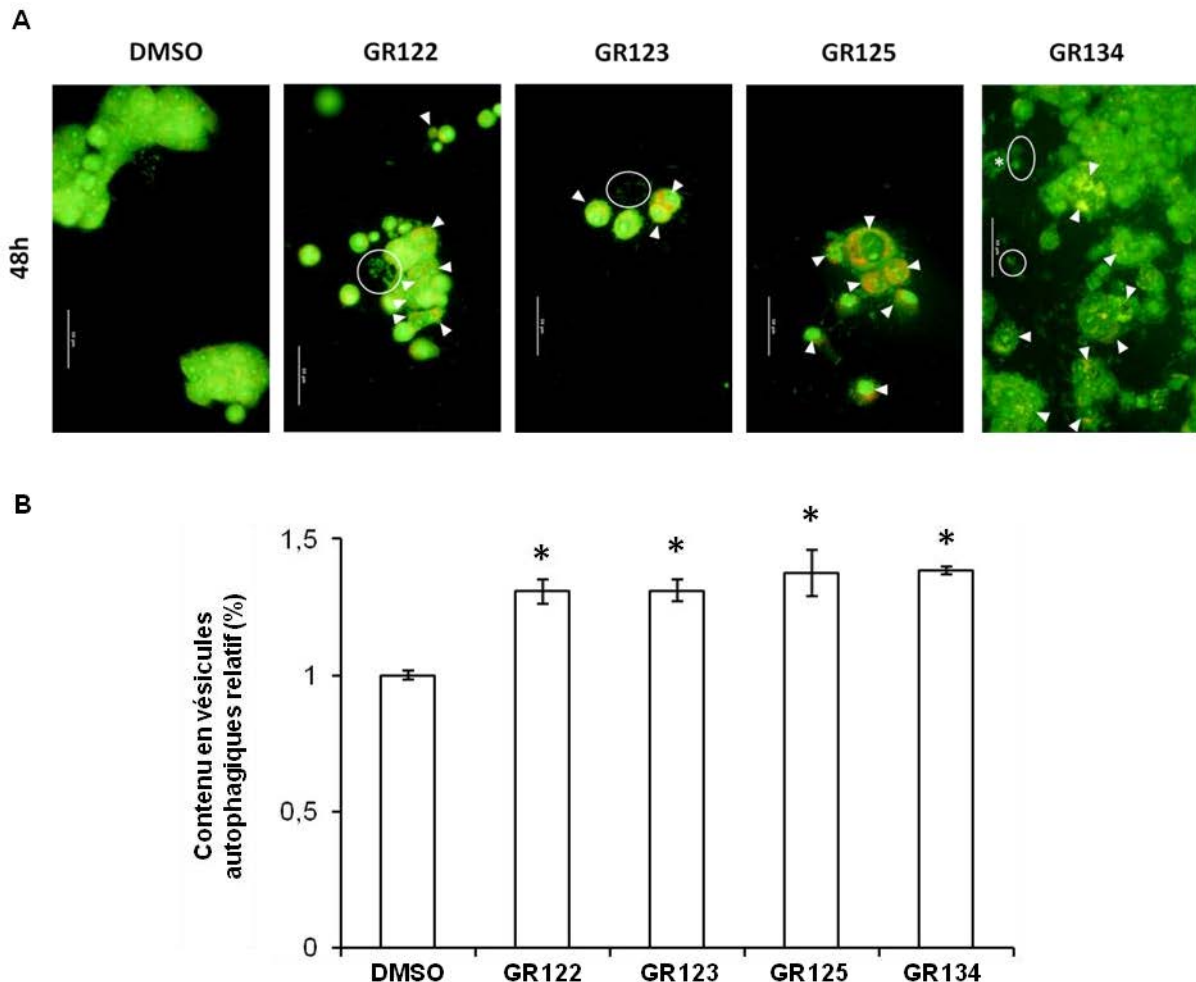


Figure 120 : Induction de la formation de vésicules acides dans les cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134

(A) Les cellules HT29 ont été traitées par 0.1% de DMSO ou par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀ pendant 48 h. Après traitement, 1 µg/ml d'acridine orange a été ajouté au milieu de culture, pendant 15 min, avant l'analyse par microscopie à fluorescence. Les flèches indiquent les cellules présentant des vésicules acides orange, vraisemblablement d'autophagie. Les cercles indiquent des débris cellulaires.

(B) Pour l'analyse en cytométrie en flux, les cellules HT29 ont été traitées de la même manière pendant 48 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage et représentent le rapport entre la fluorescence orange détectée dans les cellules traitées par les dérivés 4-thiazolidinones et celle obtenue lorsque les cellules sont traitées par le DMSO. Les résultats ont été obtenus sur 3 séries indépendantes, pour un total de 6 échantillons par traitement.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Ces vésicules acides pourraient être des vésicules autophagiques. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression de Beclin-1 a été étudiée suite à ces traitements. L'expression de Beclin-1 est bien visible après 48 h de traitement par ces 4 composés (Figure 121).

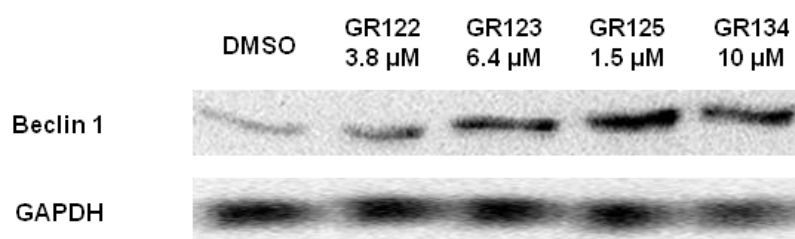


Figure 121 : Induction de l'expression de Beclin-1 dans les cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134

Les cellules HT29 ont été traitées par 0.1% de DMSO ou par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀ pendant 48 h. L'expression de Beclin-1 est étudiée par immunoréplique selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

d. Induction d'un stress oxydant

Le stress oxydant pouvant être à l'origine du phénomène d'autophagie, il a été évalué suite aux traitements par ces 4 composés. Les GR122 et GR123 génèrent un stress oxydant modéré dès 30 min de traitement (Figure 122). Ce dernier augmente légèrement après 1 h de traitement avant d'être progressivement réduit jusqu'à 2 h. Cette diminution est, d'ailleurs, plus marquée avec la GR122. Ensuite, le taux de ROS remonte progressivement jusqu'à 4 h de traitement, avant de rediminuer après 6 h. Pour tous les temps de traitement, le taux de ROS reste supérieur au taux initial, que ce soit avec la GR122 ou la GR123.

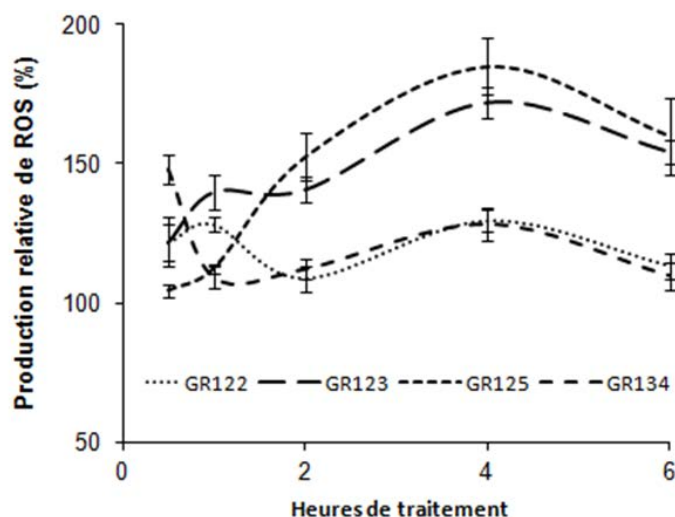


Figure 122 : Production de ROS par les GR122, GR123, GR125 et GR134

La génération d'espèces réactives oxygénées a été mesurée après traitement des cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀, pour des temps variant jusqu'à 6 h. La génération de ROS a été mise en évidence par une technique de cytométrie en flux, en utilisant la sonde DCF-DA, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes. Toutes les valeurs sont significatives au test t de student ($p < 0,05$), hormis le traitement par la GR125 pendant 30 min et le traitement par la GR134 pendant 1 h.

Résultats et Discussion

En revanche, la GR125 n'induit pas de stress oxydant après 30 min de traitement. Mais à partir de 1 h, le taux de ROS accroit graduellement pour atteindre son maximum après 4 h de traitement. Il s'en suit une légère diminution jusqu'à 6 h (Figure 122). La GR134 présente, quant à elle, un profil différent. En effet, elle induit une forte production de ROS dès 30 min de traitement. Ce taux de ROS baisse ensuite rapidement pour atteindre, après 1 h de traitement, un taux relatif au taux initial. Il s'en suit une hausse progressive jusqu'à 4 h de traitement, à nouveau suivie d'une légère baisse après 6 h (Figure 122). Il est à noter qu'entre 2 h et 6 h de traitement par la GR134, le taux de ROS est supérieur à celui observé initialement. Les GR123 et GR125 sont donc les deux molécules qui induisent le plus de ROS dans les cellules HT29.

De plus, ces dérivés induisent la formation de RNS après 24 h de traitement (Figure 123). Cette production est très faible avec la GR134, plus accentuée avec les GR122 et GR123, et très prononcée avec la GR125. Cependant, le marquage des cellules par la DHR, en cytométrie en flux, a montré que ces molécules n'entraînaient aucune production de peroxyde nitrique (Figure 123).

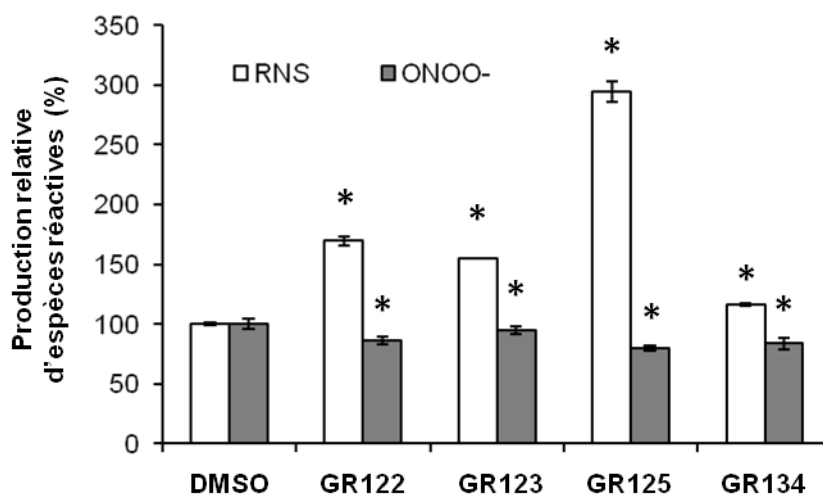


Figure 123 : Evaluation de la production de NO et de ONOO- par les GR122, GR123, GR125 et GR134, par cytométrie en flux

La génération de RNS et de ONOO- a été mesurée après traitement des cellules HT29 par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀ pendant 24 h. Cette mesure a été réalisée par une technique de cytométrie en flux, en utilisant les sondes DAF-2DA et DHR, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons, de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

L'absence de production de peroxyde nitrique a été vérifiée en microscopie (Figure 124). Ces quatre molécules n'induiraient donc que du NO.

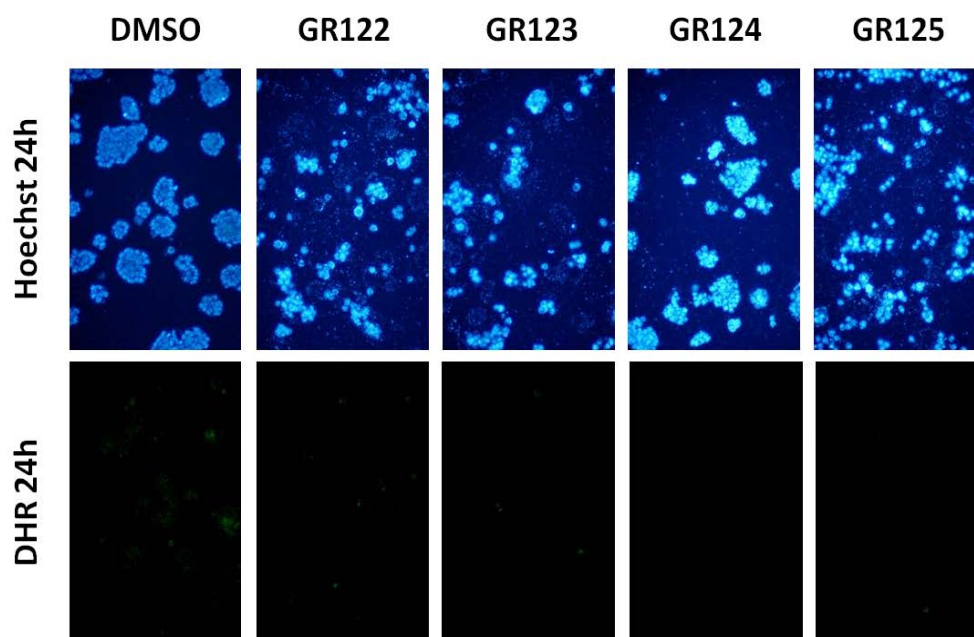


Figure 124 : Absence de production de ONOO- par les GR122, GR123, GR125 et GR134, observée par microscopie

Mise en évidence, de la génération de ONOO⁻ dans les cellules HT29, après 24 h de traitement par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀, grâce la sonde DHR (en vert). Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342 (en bleu).

e. Modification du taux de GSH

Les GR122, GR123 et GR125 réduisent le contenu en GSH après 24 h de traitement, tandis que la GR134 n'a aucun effet sur ce contenu (Figure 125).

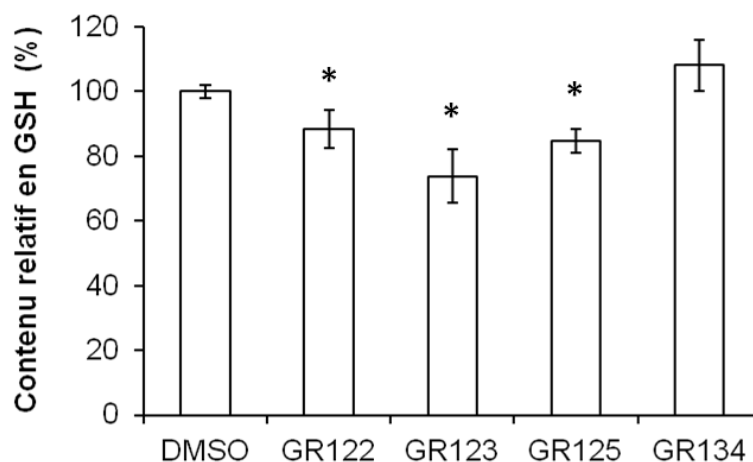


Figure 125 : Effet des GR122, GR123, GR125 et GR134 sur le taux de GSH des cellules HT29

Le contenu en GSH a été mesuré après traitement des cellules HT29 pendant 24 h par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC₅₀. Le contenu en GSH a été mesuré sur trois échantillons, de trois séries indépendantes, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont rapportés au contenu en GSH des cellules traitées par le DMSO et exprimés en pourcentage.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

f. Absence d'impact du stress oxydant sur la croissance cellulaire

Le stress oxydant pouvant être à l'origine d'un arrêt de la prolifération cellulaire, son implication a été évaluée suite aux traitements par les GR122, GR123, GR125 et GR134 (Figure 126).

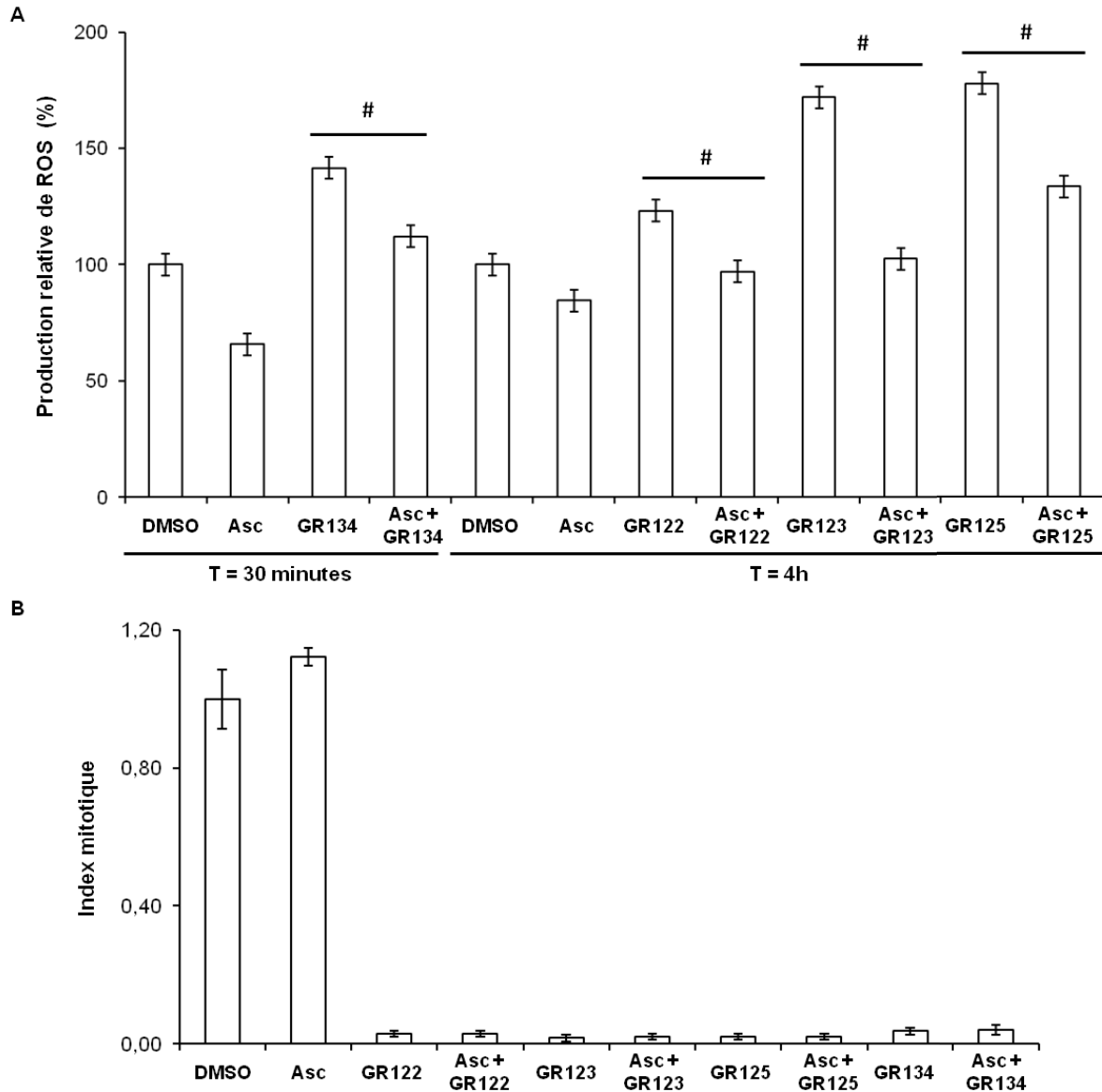


Figure 126 : Absence d'effet de l'acide ascorbique sur la diminution du nombre de cellules HT29 induite par les GR122, GR123, GR125 et GR134

(A) La génération de ROS a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 suite à un prétraitement d'une heure par 1mM d'acide ascorbique, puis traitées par la GR134 pendant 30 min ou par les GR122, GR123 et GR125 pendant 4 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

(B) Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement, pendant 3 jours, par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondant à leur IC₅₀, en association ou non avec 1mM d'acide ascorbique. Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par les dérivés 4-thiazolidinones, en association ou non avec Asc, au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les différents dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque ces traitements sont associés à l'acide ascorbique.

Au préalable, il a été vérifié que l'acide ascorbique était bien capable de diminuer les ROS induits par ces différents dérivés (Figure 126A). Cependant, il n'est pas capable de contrecarrer la réduction de prolifération induite après 3 jours de traitement (Figure 126B), ni la condensation de la chromatine observée après 48 h (Résultats non présentés). Le stress oxydant ne serait donc pas impliqué dans la baisse de la prolifération des cellules HT29 induite par les GR122, GR123, GR125 et GR134, ni dans l'induction de leur apoptose.

g. Absence d'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1

La présence d'espèces réactives pouvant être à l'origine de l'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1, cette dernière a été étudiée suite aux traitements par les GR122, GR123, GR125 et GR134. Ces dernières ne provoquent aucune translocation nucléaire de Nrf2 (Figure 127). Ces molécules, bien que responsables de la production d'espèces réactives, n'activent donc pas la voie antioxydante Nrf2/Keap1.

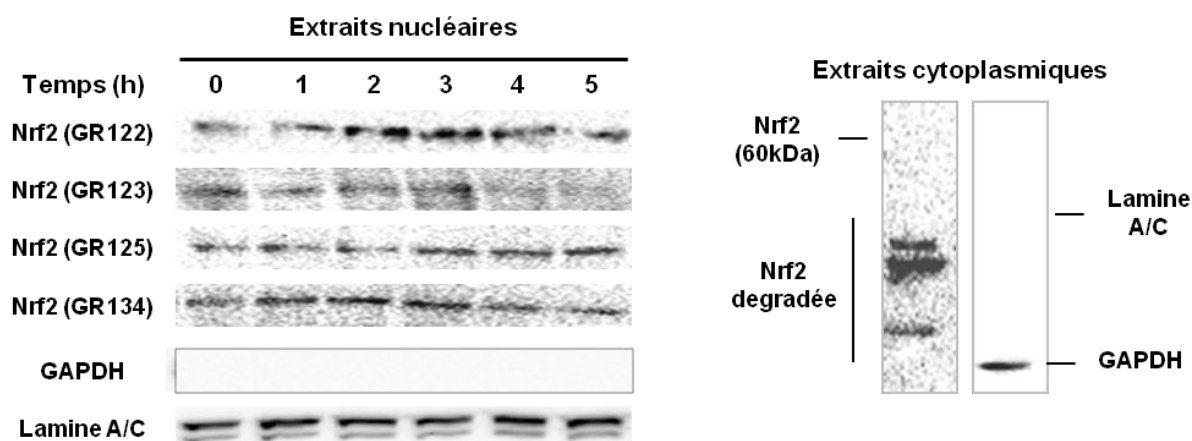


Figure 127 : Absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1 par les GR122, GR123, GR125 et GR134

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5h par les GR122, GR123, GR125 et GR134 à la concentration correspondante à leur IC_{50} . Après incubation, les extraits cytoplasmiques et nucléaires sont préparés, puis analysés par immunoréplique, selon le protocole décrit dans la section **Matériel et Méthodes**. Une bande, estimée à 60 kDa, est détectée dans les extraits de protéines nucléaires. Plusieurs bandes sont détectées dans les extraits cytoplasmiques, préparés à partir de cellules non traitées. Elles correspondent à la protéine Nrf2 dégradée. La qualité des extraits est vérifiée, par immunoréplique, en utilisant une solution d'anticorps dirigés contre la GAPDH, localisée uniquement dans le cytoplasme, et la lamine A/C, protéine exclusivement nucléaire.

Ces résultats coïncident avec l'absence d'induction de l'expression de HO-1, le gène-cible principal de cette voie de signalisation (Figure 128A-D). En revanche, malgré l'absence d'activation de la voie Nrf2, certaines molécules haussent l'expression d'autres protéines antioxydantes, telles que GCL et NQO1. Ces dernières peuvent être exprimées suite à l'activation de la voie Nrf2, mais également suite à l'action d'autres voies de signalisation. En effet, l'expression de NQO1 peut être induite par le facteur de transcription AP-2 (pour *Activating Protein 2*)³⁷⁴ et l'expression de la GCL par la voie PI3K/Akt³⁷⁵. Ainsi, la GR123

Résultats et Discussion

augmente l'expression de NQO1 et GCL dès 2 h de traitement, expression qui s'accroît jusqu'à 4 h de traitement, avant de revenir à son état initial après 24 h de traitement (Figure 128B). La GR122 accroît, quant à elle, l'expression de la GCL dès 2 h de traitement (Figure 128A), tandis que l'effet de la GR125 sur cette même protéine n'est visible qu'après 24 h de traitement (Figure 128C).

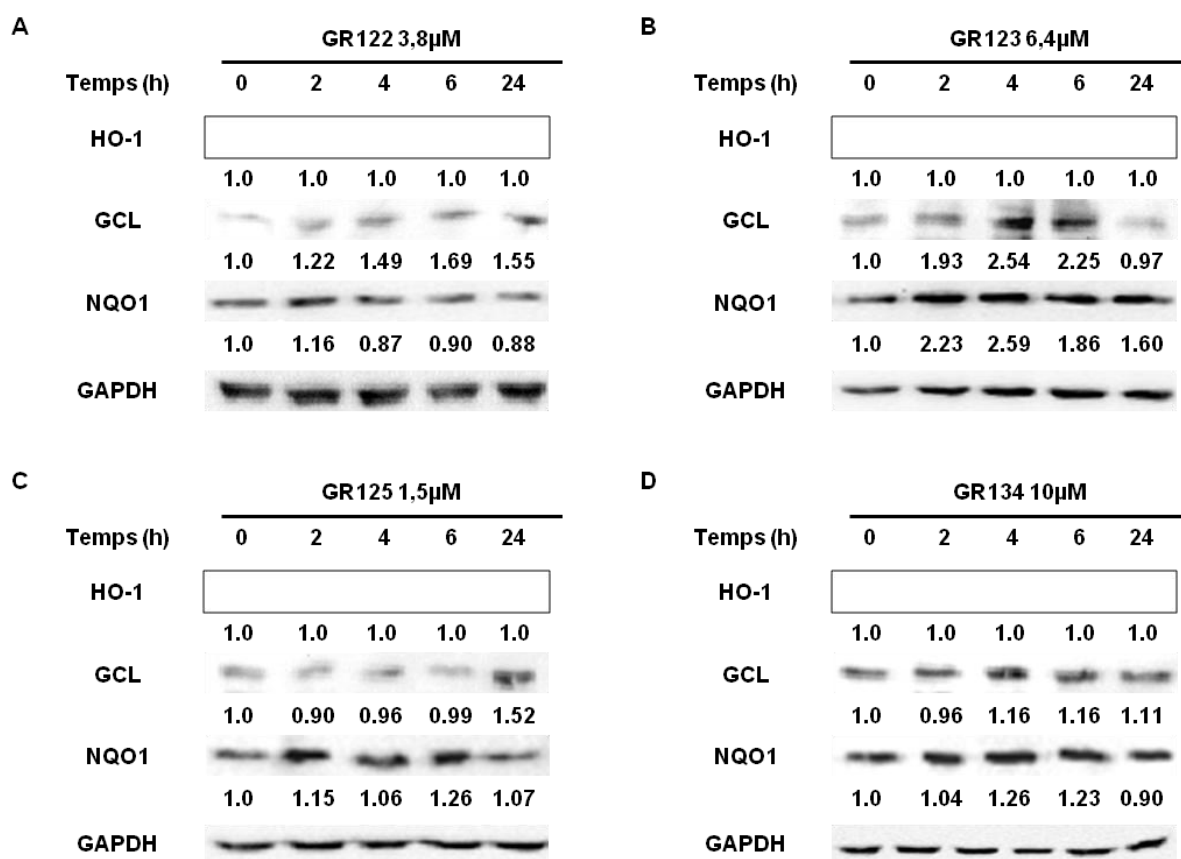


Figure 128 : Effet des GR122, GR123, GR125 et GR134 sur l'expression des gènes-cibles de la voie Nrf2/Keap1

(A - D) Les cellules HT29 ont été traitées pendant 2 h, 4 h, 6 h et 24 h par les GR122 (A), GR123 (B), GR125 (C) et GR134 (D) à la concentration correspondante à leur IC₅₀. Les expressions de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1), de la Glutamate Cystéine Ligase (GCL) et de la NAD(P)H déhydrogénase quinone 1 (NQO1) sont étudiées par immunoréplique. Elle est réalisée à partir de 25 µg de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expression de chaque protéine a été rapportée à celle de la GAPDH, pour chaque condition, puis comparée à celle obtenue dans les cellules non traitées. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

2. Effets des dérivés de la série thiazolique

a. Diminution de la prolifération cellulaire

Les GR274 et GR277 baissent très significativement le nombre de cellules dès le 1^{er} jour de traitement (30% - 40% d'inhibition) et ce nombre diminue encore jusqu'au 3^e jour (environ 80% d'inhibition le 2^e jour et 90% le 3^e jour ; Figure 129).

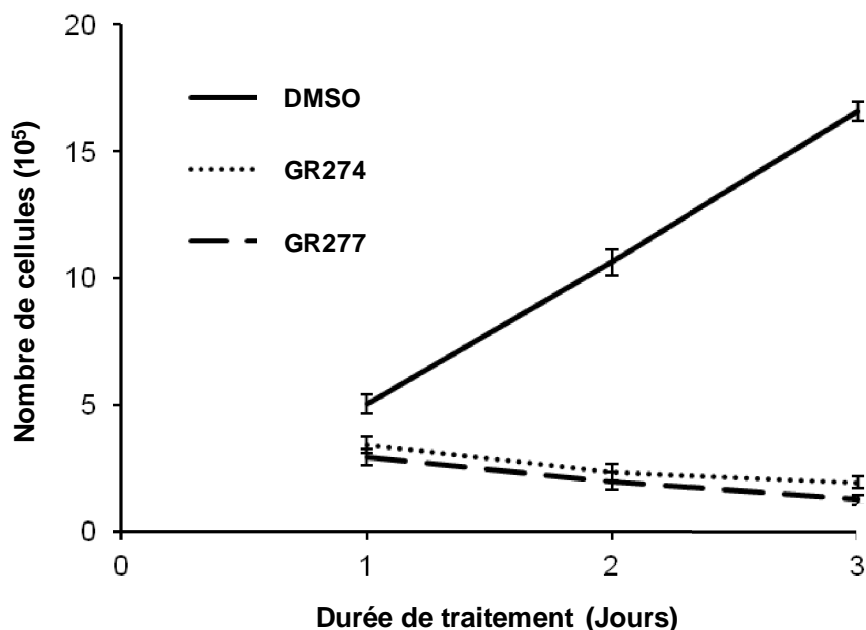


Figure 129 : Inhibition de la prolifération des cellules HT29 par les GR274 et GR277

Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement, pendant 3 jours, par 2,5 μ M de GR274 et GR277. Chaque jour, un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Toutes les valeurs sont significatives au test t de student ($p < 0,05$).

Cette réduction de la prolifération est également associée à une réduction de la capacité des cellules à former des colonies (Figure 130). En effet, après 7 jours de traitement, aucune colonie n'est observée suite aux traitements par les GR274 et GR277.

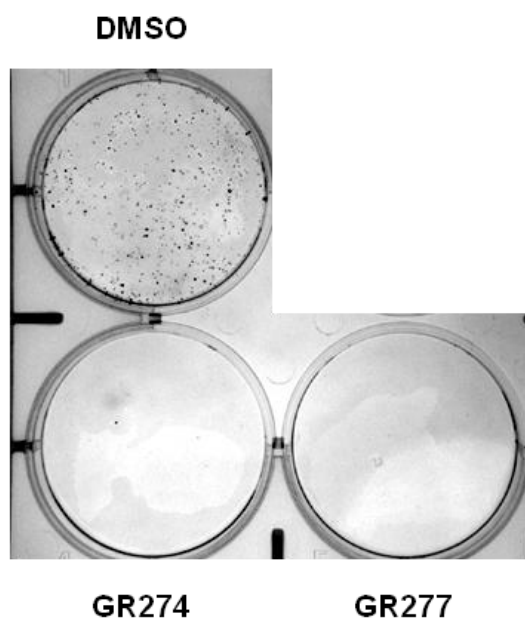


Figure 130 : Diminution de la formation de colonies par les GR274 et GR277

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 7 jours par 2,5 μ M de GR274 et GR277, sans changement de milieu. Les colonies sont alors marquées par le bleu de toluidine, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**.

Résultats et Discussion

L'inhibition de la prolifération cellulaire, observée précédemment, peut être provoquée par un arrêt du cycle cellulaire. L'impact sur ce dernier a donc été étudié suite aux traitements par 2,5µM de GR274 ou GR277 (Tableau 18). Après 24 h, les cellules s'accumulent, de façon modérée, en phase G2/M au détriment de la phase G0/G1. Une hausse significative du nombre de cellules en phase sub-G1 est également observée. Néanmoins, cette augmentation est plus modérée avec la GR274 (Tableau 18).

HT29	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
DMSO	2.3 ± 0.1	67,68 ± 0,52	21,06 ± 1,48	11,27 ± 0,95
GR274	16.2 ± 0.7	60,62 ± 0,04	20,70 ± 1,98	18,69 ± 0,93
GR277	21.0 ± 1.4	58,75 ± 0,42	17,20 ± 1,25	24,07 ± 0,84

Tableau 18: Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par les GR274 et GR277

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 24 h par 0.1% (v/v) DMSO et 2,5µM de GR274 ou GR277. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, sub-G1, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage et a été analysée sur trois échantillons de 3 séries indépendantes. **En gras**, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par GR274 ou GR277, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

b. Diminution de la viabilité cellulaire

L'étude de la viabilité a montré une baisse de la proportion des cellules viables, c'est à dire négatives à l'IP, suite au traitement de 24 h par les GR274 et GR277. Cette proportion s'amenuit suite aux traitements de 48 h (Figure 131).

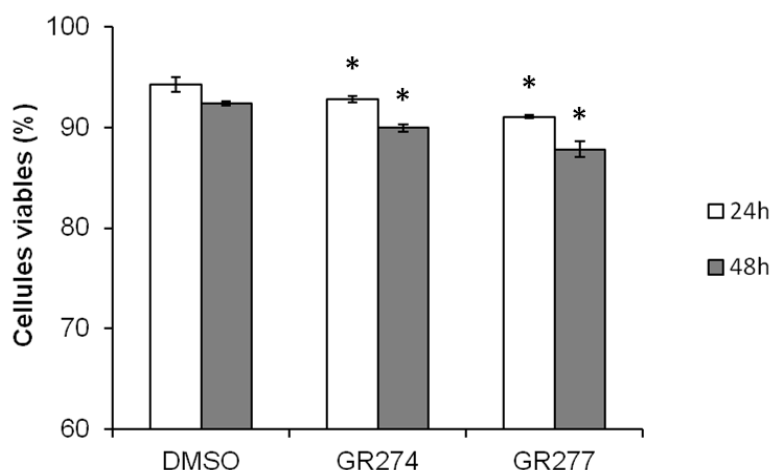


Figure 131 : Diminution de la viabilité cellulaire par les GR274 et GR277

La viabilité cellulaire a été évaluée, comme précédemment (Figure 67), après traitement des cellules HT29 par 2,5µM de GR274 et GR277 pendant 24 h et 48 h.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues avec les GR274 et GR277, et celles obtenues avec le DMSO.

Il est à noter qu'en présence de la GR274, les cellules positives à l'IP restent positives au DCF-DA. Elle pourrait donc posséder une fluorescence propre. L'analyse par microscopie à fluorescence a montré que la GR274 émettait bien une fluorescence verte (Résultat non présenté).

De plus, la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire, marqueurs d'apoptose, sont observées suite aux traitements de 48 h par les GR274 et GR277 (Figure 132A). Ces résultats sont corrélés à l'accumulation de cellules en phase sub-G1, observée précédemment (Tableau 18). En revanche, la dépolarisation de la membrane mitochondriale n'est pas observée, ou elle être trop faible pour être visible en microscopie (Figure 132B).

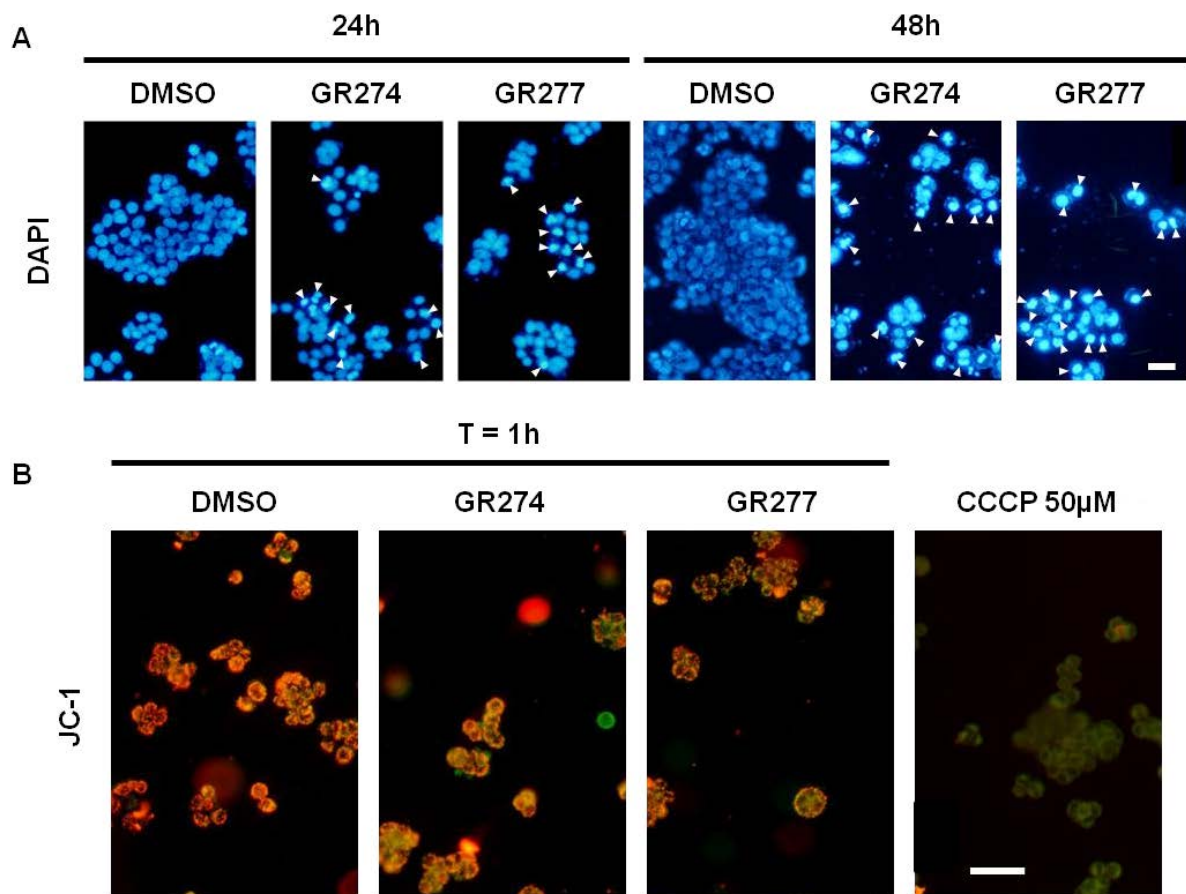


Figure 132 : Induction de l'apoptose des cellules HT29 par les GR274 et GR277

(A) Mise en évidence des noyaux par DAPI, après traitement des cellules par 0,1% (v/v) de DMSO ou par 2,5μM de GR274 ou GR277 pendant 24 h et 48 h. Le marquage par DAPI montre une condensation de la chromatine suite aux traitements par ces deux molécules.

(B) Mise en évidence de la présence du potentiel membranaire mitochondrial (Ψ_m) par JC-1, lors du traitement des cellules HT29 par 0,1% (v/v) de DMSO ou par 2,5μM de GR274 ou GR277 pendant 1 h. La fluorescence orange indique la présence de Ψ_m , absent lors du traitement des cellules par 50 μM de CCCP, un agent bloquant la génération du potentiel Ψ_m .

Les barres d'échelle représentent 50 μm.

Résultats et Discussion

Enfin, le clivage de la protéine PARP-1 n'est retrouvé que suite aux traitements de 48 h par les GR274 et GR277 (Figure 133).

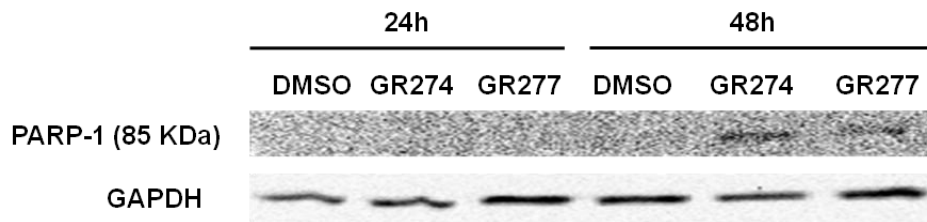


Figure 133 : Induction du clivage de PARP-1 par les GR274 et GR277 dans les cellules HT29

Les cellules HT29 ont été traitées pendant 24 h et 48 h par 2,5 μ M de GR274 ou GR277. Le clivage de la protéine PARP-1 est étudié par immunoréplique, selon la procédure décrite dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

c. Induction du phénomène d'autophagie

La formation de vésicules acides a été observée par microscopie après 48 h de traitement par les GR274 et GR277 (Figure 134A). Leur apparition a aussi été évaluée par cytométrie en flux (Figure 134B).

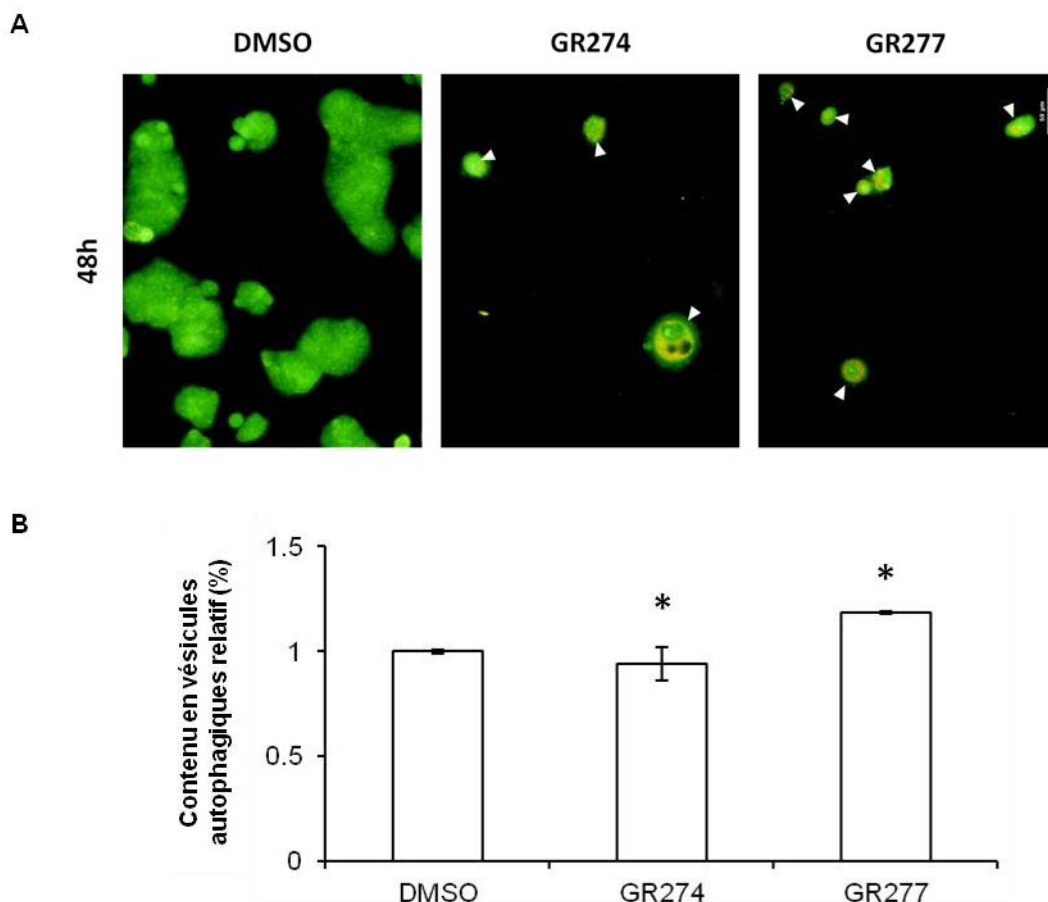


Figure 134 : Induction de la formation de vésicules acides dans les cellules HT29 par les GR274 et GR277

(A et B) La formation de vésicules acides a été étudiée par microscopie (A) et par cytométrie en flux (B), comme précédemment (Figure 120), dans les cellules HT29 traitées par 2,5 μ M de GR274 ou GR277 pendant 48 h.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$); comparaison entre les valeurs obtenues quand les cellules sont traitées par les GR274 et GR277, et celles obtenues avec le DMSO.

Afin de vérifier si ces vésicules acides sont bien des vésicules autophagiques, l'expression de Beclin-1 a été étudiée suite à ces traitements (Figure 135). Beclin-1 est bien exprimée après 48 h de traitement.

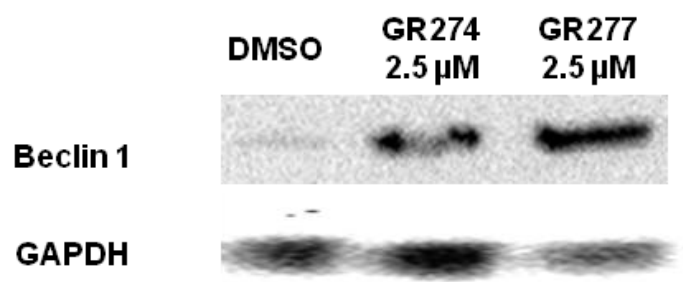


Figure 135 : Induction de l'expression de Beclin-1 par les GR274 et GR277

Les cellules HT29 ont été traitées par 0.1% de DMSO ou par 2,5μM de GR274 et GR277 pendant 48 h. L'expression de Beclin-1 est étudiée par immunoréplique, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

d. Impact sur le stress oxydant

Toutes les expériences effectuées avec la GR274, par cytométrie en flux, ont été réalisées avec et sans la sonde fluorescente, afin de soustraire la fluorescence propre à cette molécule. Ainsi, ce traitement induit une production de ROS dès 1 h de traitement, qui s'accroît après 3 h, avant de diminuer après 6 h de traitement (Figure 136). En revanche, la GR277 n'entraîne aucune formation de ROS, quelque soit le temps de traitement (Figure 136).

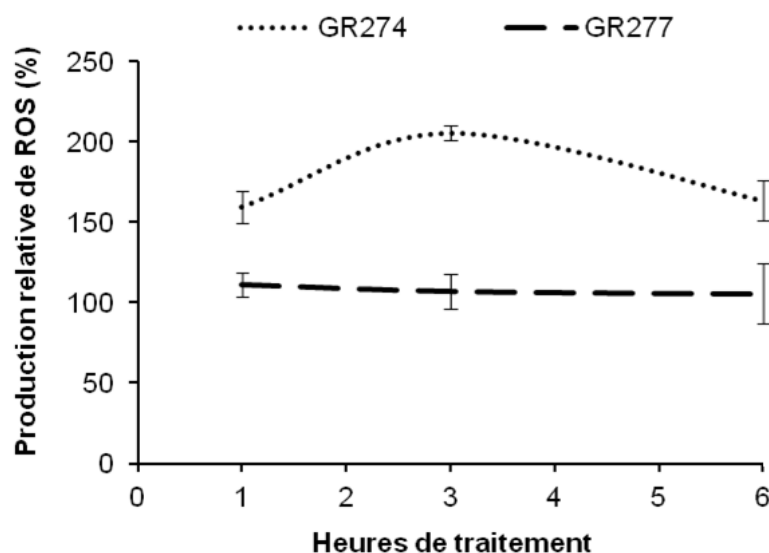


Figure 136 : Production de ROS par les GR274 et GR277

La génération d'espèces réactives oxygénées a été mesurée après traitement des cellules HT29 par 2,5μM de GR274 et GR277, pour des temps variant jusqu'à 6 h. La génération de ROS a été mise en évidence par une technique de cytométrie en flux, en utilisant la sonde DCF-DA, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes. Toutes les valeurs relatives au traitement par la GR274 sont significatives au test t de student ($p < 0,05$).

Résultats et Discussion

De plus, ces molécules provoquent la génération de RNS après 24 h de traitement (Figure 137A). Néanmoins, l'effet est nettement moins marqué avec la GR277. Le marquage des cellules par la DHR, en cytométrie en flux (Figure 137A) et en microscopie (Figure 137B), a montré que la GR274 entraînait une formation modérée de peroxyde nitrique, tandis que la GR277 semblait réduire son taux. Cela sous entend que la GR274 induirait à la fois la formation de NO et de ONOO-, tandis que la GR277 n'induirait que peu de NO.

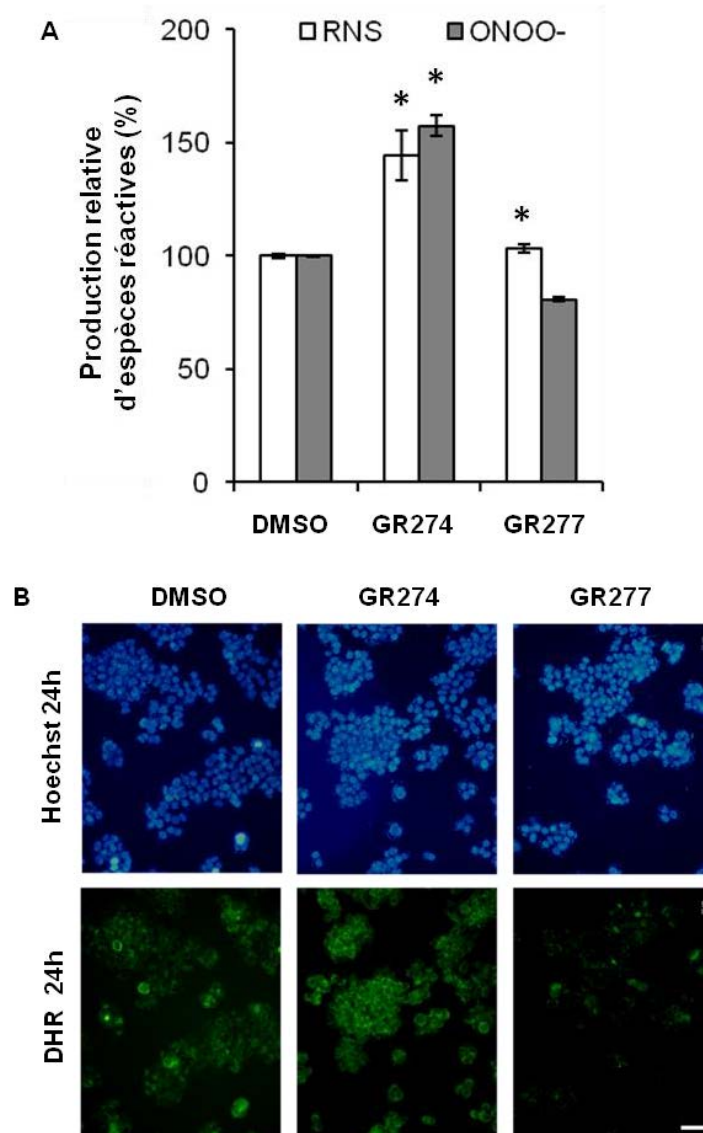


Figure 137 : Production de RNS par les GR274 et GR277

(A) La génération de RNS et de ONOO- a été mesurée, comme précédemment (Figure 76 et Figure 77), dans les cellules HT29 traitées par 2,5 μ M de GR274 et GR277 pendant 24 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes. *, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les dérivés 4-thiazolidinones, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

(B) Mise en évidence, de la génération de ONOO- dans les cellules HT29, après 24h de traitement par 2,5 μ M de GR274 et GR277, grâce la sonde DHR (en vert). Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342 (en bleu). La barre d'échelle correspond à 50 μ m.

e. Absence de modification du taux de GSH

Bien que les traitements par 2,5µM GR274 et GR277 génèrent des espèces réactives, ils n'ont aucune influence sur le contenu en GSH, quelque soit le temps de traitement (Figure 138).

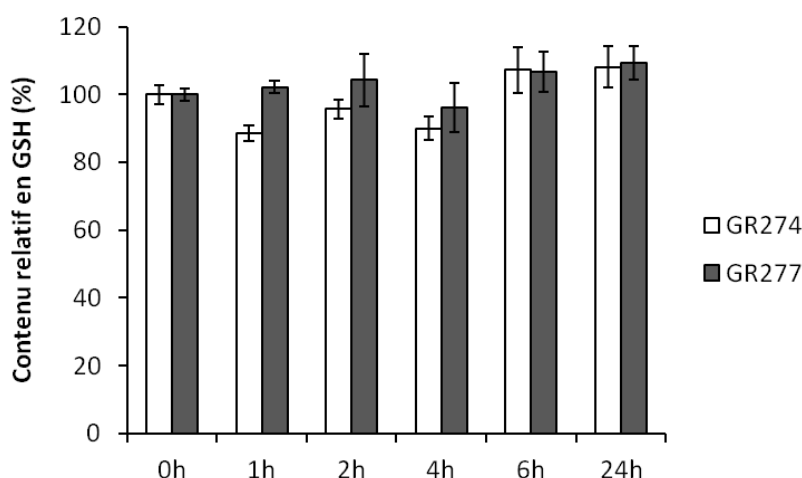


Figure 138 : Absence de modification du contenu en GSH par les GR274 et GR277

Le contenu en GSH à été mesuré, comme précédemment (Figure 88), dans les cellules HT29 traitées en cinétique (0 h, 2 h, 4 h, 6 h et 24 h) par 2,5µM de GR274 et GR277.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les GR274 et GR277, et celles obtenues lorsque les cellules ne sont pas traitées.

f. Absence d'impact du stress oxydant sur la croissance cellulaire

L'impact du stress oxydant sur la diminution de la prolifération induite par la GR274 a ensuite été évalué. Comme précédemment, la capacité de l'acide ascorbique à réduire les ROS induits par cette molécule a été vérifiée, au préalable (Figure 139A).

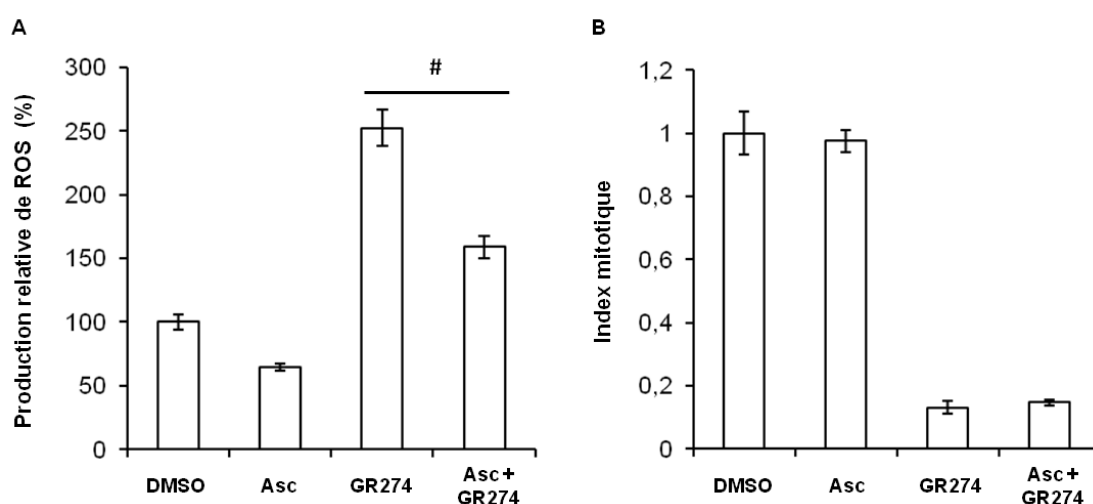


Figure 139 : Absence d'effet de l'acide ascorbique sur la diminution du nombre de cellules HT29 induite par la GR274

(A) La génération de ROS a été mesurée, comme précédemment (Figure 75), dans les cellules HT29 prétraitées 1 h par 1mM d'acide ascorbique (Asc), puis traitées pendant 3 h par 2,5µM de GR274.

(B) Les cellules HT29 ont été traitées quotidiennement, pendant 3 jours, par 2,5µM de GR274, en association ou non avec 1mM d'Asc. Le comptage des cellules vivantes a été effectué comme précédemment (Figure 126).

#, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par la GR274, et celles obtenues lorsque ce traitement est associé à l'acide ascorbique.

Résultats et Discussion

Cependant, l'acide ascorbique n'est pas capable de contrecarrer la réduction de prolifération induite par ce composé, après 3 jours de traitement (Figure 139B). Le stress oxydant ne serait donc pas impliqué dans l'inhibition de la prolifération des cellules HT29 induite par la GR274. L'acide ascorbique n'est pas non plus capable de contrecarrer la condensation de la chromatine observée avec la GR274 (Résultats non présentés). Le stress oxydant ne serait donc pas impliqué dans l'induction de l'apoptose. L'implication du stress oxydant n'a pas été évaluée avec la GR277, étant donné le peu d'espèces réactives générées par ce composé.

g. Absence d'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1

Bien que la GR274 produise des espèces réactives, elle ne provoque aucune translocation nucléaire de Nrf2 (Figure 140A). Afin de vérifier l'absence d'activation de la voie par un autre mécanisme, cette expérience a également été réalisée avec la GR277. Comme attendu, elle n'induit aucune activation de la voie Nrf2 (Figure 140A). Ces résultats coïncident avec l'absence d'expression de HO-1, le gène-cible principal de cette voie de signalisation (Figure 140B et C). Ces composés ne modifient pas non plus l'expression de la GCL. Une diminution de l'expression de NQO1 avec la GR274 est même observée (Figure 140B et C).

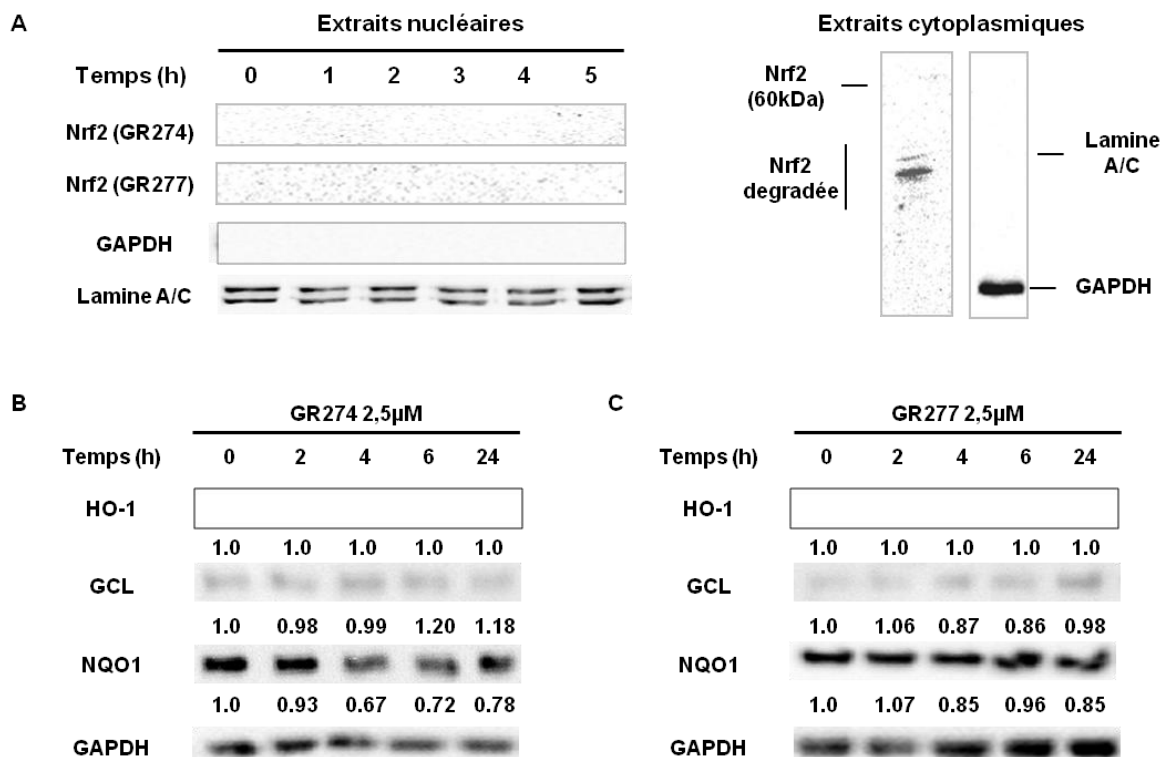


Figure 140 : Absence d'activation de la voie Nrf2/Keap1 par les GR274 et GR277

(A) Les cellules HT29 ont été traitées pendant 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h par 2,5µM de GR274 et GR277. La translocation nucléaire de Nrf2 est étudiée comme précédemment (Figure 127).

(B et C) Les cellules HT29 ont été traitées pendant 2 h, 4 h, 6 h et 24 h par 2,5µM de GR274 (A) et GR277 (B). Les expressions de l'Hème Oxygénase 1 (HO-1), de la Glutamate Cystéine Ligase (GCL) et de la NAD(P)H déhydrogénase quinone 1 (NQO1) sont étudiées par immunoréplique, comme précédemment (Figure 128).

C. Conclusion

Les six dérivés 4-thiazolidinones sélectionnés inhibent la croissance des cellules HT29 (Figure 141). Cet arrêt de croissance est accompagné d'un arrêt du cycle cellulaire, d'un processus apoptotique et d'une autophagie. Tous ces composés, hormis la GR277, sont à l'origine d'une production d'espèces réactives. Cependant, ces dernières ne sont pas impliquées dans la diminution de prolifération observée. Ce stress oxydant peut également être à l'origine d'une diminution du contenu en GSH, pour les GR122, GR123 et GR125, mais ne permet pas l'activation de la voie Nrf2/Keap1. Les dérivés 4-thiazolidinones n'induisent donc pas l'expression de protéines antioxydantes (Figure 141).

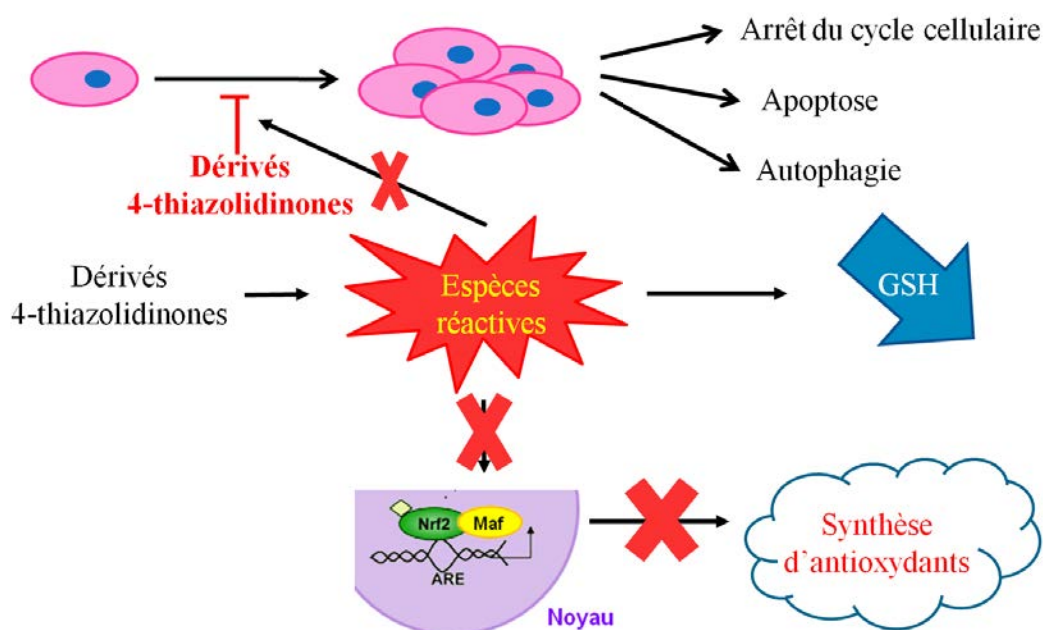


Figure 141 : Représentation schématique de l'action des dérivés 4-thiazolidinones sur les cellules cancéreuses coliques HT29

III. Inhibition de la phosphatase CDC25A par les 4-thiazolidinones

Les phosphatases CDC25 (pour *Cell Division Cycle 25*) sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire *via* la déphosphorylation des protéines Cdk. Cette déphosphorylation, associée à la formation du complexe Cdk/cycline, permet l'activation des Cdk et donc du cycle cellulaire. Il existe 3 isoformes de CDC25 : CDC25A, CDC25B et CDC25C. Chacun de ses isoformes est spécifique d'un ou plusieurs complexes Cdk/cyclines particuliers, agissant à divers moments du cycle cellulaire. L'inhibition des CDC25 peut donc constituer une stratégie thérapeutique pour contrer la prolifération accrue des cellules cancéreuses. Un brevet concernant une série de composés associant un cycle pyrazolique et une thiazolidinedione (Figure 142), présentant un potentiel inhibiteur de la phosphatase CDC25B, a d'ores et déjà été déposé³⁷⁶.

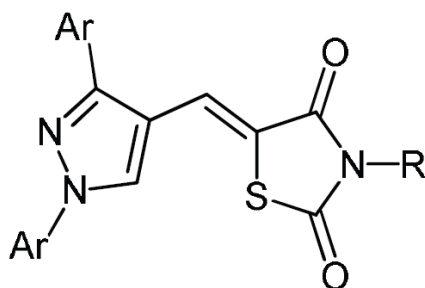


Figure 142 : Dérivés 4-thiazolidinones inhibiteurs de CDC25B

De plus, la recherche de nouveaux inhibiteurs de CDC25 est effectuée en routine au laboratoire, c'est pourquoi la capacité des dérivés 4-thiazolidinones à inhiber cette cible a été étudiée. Il est à noter que Pio, Δ Pio et Féno sont incapables d'inhiber efficacement les CDC25s (Résultats non présentés).

A. Inhibition de l'activité des CDC25 *in vitro*

Le test d'inhibition *in vitro* des CDC25 est réalisé avec des protéines recombinantes purifiées par chromatographie d'affinité et selon la méthode décrite précédemment³⁷⁷. En résumé, la déphosphorylation de l'OMFP (3-O-méthylfluoresceine phosphate) en OMF (3-O-méthylfluoresceine), par l'activité des CDC25, émet une fluorescence. Cette dernière est mesurée par spectrofluorimétrie. Les 19 composés, sélectionnés suite au test MTT, ont été testés lors d'un essai préliminaire à 10 μ M sur CDC25A. Quatre composés (GR293, GR294, GR295 et GR296 ; Structure détaillée à la Figure 143) sont très efficaces à cette concentration (Résultats non présentés).

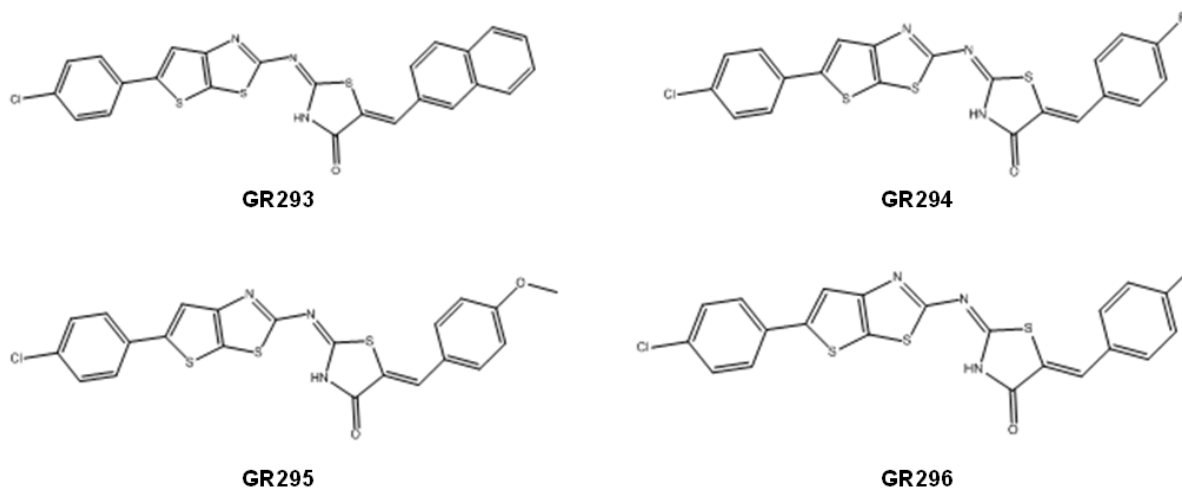


Figure 143 : Structure des GR293, GR294, GR295 et GR296

Leur IC₅₀, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50% de l'activité enzymatique, a ensuite été déterminée. Elle est inférieure à 10 μ M sur CDC25A, ce qui permet de les considérer comme des inhibiteurs intéressants (Tableau 19). Ils ont également été testés avec CDC25C, mais il s'avère qu'ils sont moins efficaces sur cet isoforme (Tableau 19).

	IC ₅₀ CDC25A (μM)	IC ₅₀ CDC25C (μM)
GR293	7,01 ± 0,71	> 10μM
GR294	7,59 ± 1,07	> 10μM
GR295	5,62 ± 0,15	> 10μM
GR296	7,82 ± 1,47	> 10μM

Tableau 19 : Inhibition de CDC25 *in vitro* par les 4-thiazolidinones

Afin de connaître le mode de liaison de ces molécules sur CDC25A, un test par spectrométrie de masse a été réalisé, selon la méthode décrite précédemment³⁷⁸. En résumé, il s'agit d'effectuer un spectre de masse par MALDI-TOF (pour *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight mass spectrometry*) du composé seul ou après incubation avec CDC25A. Si la liaison est réversible, le laser est capable de rompre cette liaison et le pic correspondant à l'ion [M + H⁺] du composé est retrouvé. Si ce pic n'est pas retrouvé, soit il n'y a aucune liaison, soit elle est irréversible. Dans notre cas, il s'est avéré que ces quatre composés se liaient à CDC25A de manière réversible. En effet, le pic correspondant à chacun d'eux est retrouvé après incubation avec la protéine (Figure 144).

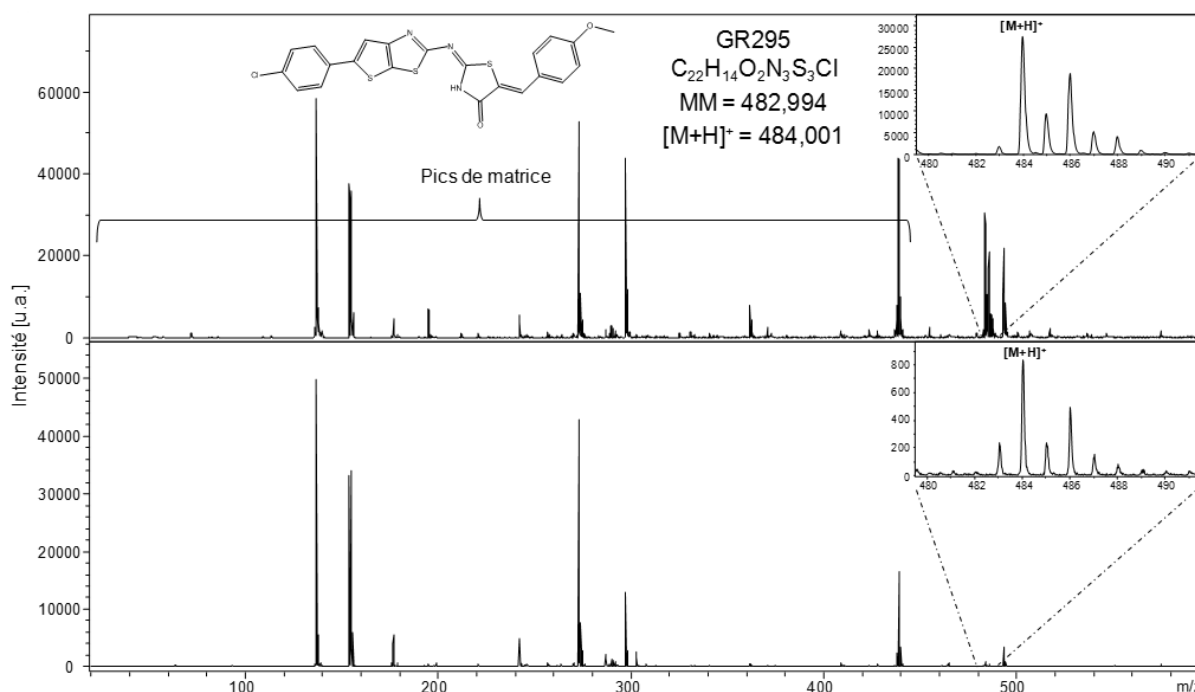


Figure 144: Détermination du mode de liaison de GR295 à CDC25A par spectrométrie de masse

Spectre de masse par MALDI-TOF (mode reflectron) de la GR295 (matrice DHB, C = 2.10⁻⁴M) dans la fenêtre supérieure, et CDC25A incubée avec la GR295 dans la fenêtre inférieure. L'ion [M + H⁺] de la GR295 est observé à m/z 484,00. Des résultats similaires sont observés avec les GR293, GR294 et GR296.

B. Inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires

Les quatre composés, capables d'inhiber l'activité de CDC25A *in vitro*, ne sont pas en mesure de réduire efficacement la prolifération des cellules cancéreuses coliques (Tableau 16 et Figure 113 ; p.132-133 et 136). En revanche, ils semblent plus efficaces sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB231 (Tableau 16 ; p.132-133). Les tests MTT montraient que la GR295 était efficace à la fois sur les cellules MCF7 ($IC_{50} = 5,1\mu M$) et MDA-MB231 ($IC_{50} = 8,4\mu M$). En revanche, la GR296 est efficace sur les cellules MCF7 ($IC_{50} = 3,3\mu M$), mais nettement moins sur les cellules MDA-MB231 ($IC_{50} = 22,8\mu M$). Enfin, les GR293 et GR294 sont très peu efficaces sur les deux lignées cellulaires (Tableau 16 ; p.132-133). L'effet de ces composés, sur la prolifération cellulaire, a ensuite été vérifié par un comptage au bleu Trypan. Les concentrations correspondantes à leur IC_{50} , déterminée par MTT pour chaque lignée, ont été utilisées (Figure 145).

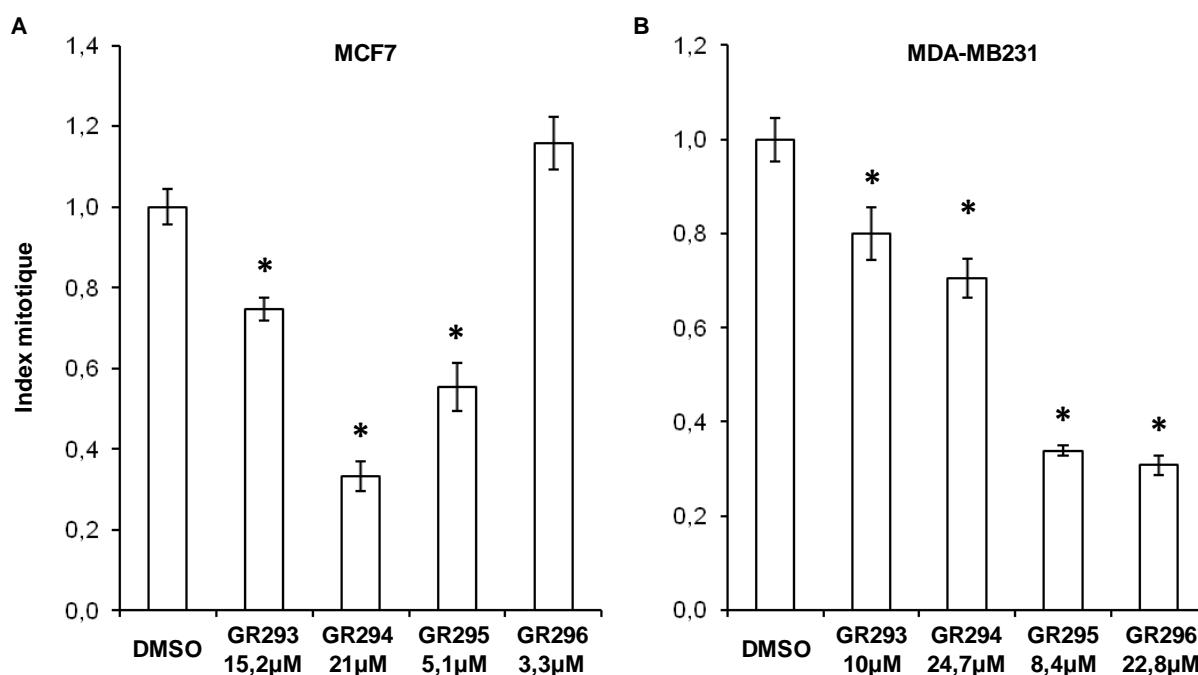


Figure 145 : Effet des inhibiteurs de CDC25A sur la prolifération des cellules MCF7 et MDA-MB231

Les cellules MCF7 et MDA-MB231 ont été traitées quotidiennement, pendant 3 jours, par les différents inhibiteurs de CDC25A à la concentration correspondante à leur IC_{50} , déterminée par MTT pour chaque lignée. Un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'index mitotique est calculé en rapportant le nombre de cellules traitées par les inhibiteurs de CDC25A au nombre de cellules témoins traitées par le DMSO.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par les inhibiteurs de CDC25A, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Bien que sa concentration soit élevée ($15,2\mu M$), la GR293 ne réduit que légèrement la prolifération des cellules MCF7, tandis que la GR296 ne la modifie pas du tout

(Figure 145A). La concentration de cette dernière étant basse (3,3 μ M), un essai avec une concentration de 10 μ M a été effectué. Même dans ces conditions, la prolifération n'est pas diminuée de moitié (Résultats non présentés). En revanche, la GR294 baisse considérablement la prolifération des cellules MCF7 (environ -70% ; Figure 145A), mais la concentration utilisée est très importante (21 μ M). Un essai à 10 μ M a donc été réalisé et dans ce cas, la prolifération ne réduit que de 40% (Résultats non présentés).

La GR295 diminue, quant à elle, la prolifération des cellules MCF7 d'environ 50% et celle des cellules MDA-MB231 d'environ 70 %, pour des concentrations relativement basses (5 μ M et 8,4 μ M, respectivement ; Figure 145A et B). La GR296 réduit également d'environ 70% la prolifération des cellules MDA-MB231, mais avec une concentration nettement supérieure (22,8 μ M ; Figure 145B). En revanche, cette baisse est inférieure à 50% lorsqu'elle est utilisée à 10 μ M (Résultats non présentés). La GR294 diminue très légèrement la prolifération des cellules MDA-MB231, bien que la concentration utilisée soit très importante (24,7 μ M ; Figure 145B). Enfin, l'IC₅₀ de la GR293 sur les cellules MDA-MB231 n'étant pas déterminée précisément, car supérieure à 50 μ M, un essai à 10 μ M a été réalisé. A cette concentration, elle ne réduit la prolifération que de 20% environ (Figure 145B).

Suite à ces résultats, les investigations ne sont poursuivies qu'avec la GR295. Effectivement, elle est la seule à inhiber significativement la prolifération des cellules MCF7 et MDA-MB231, à des concentrations inférieures à 10 μ M. L'effet de la GR295 sur la prolifération cellulaire a donc été étudié en cinétique (Figure 146).

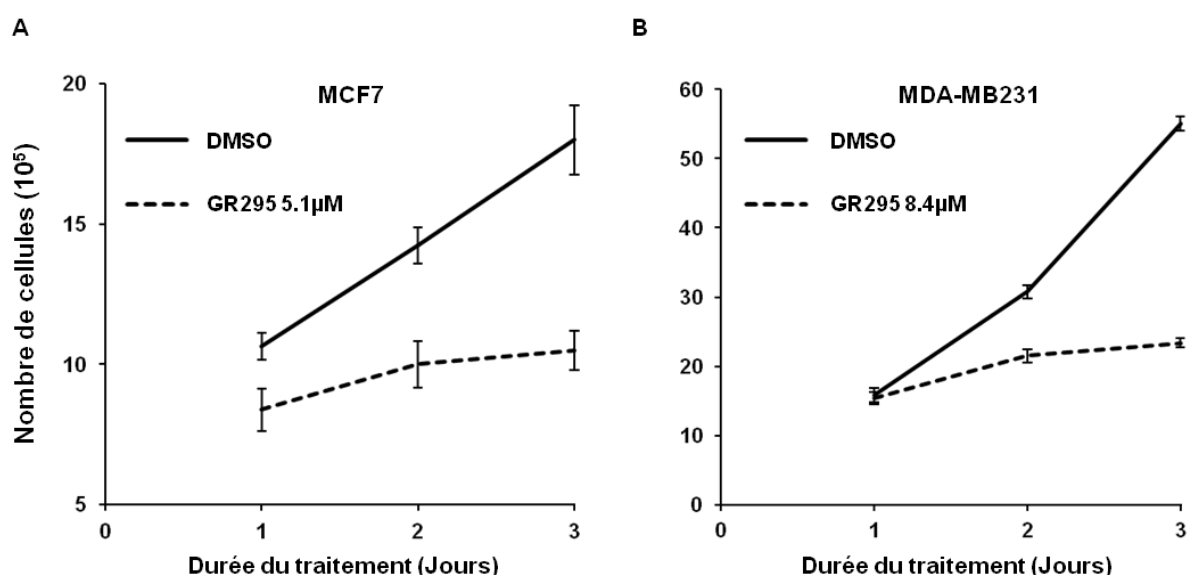


Figure 146 : Inhibition de la prolifération des cellules MCF7 et MDA-MB231 par la GR295

(A et B) Les cellules MCF7 (A) et MDA-MB231 (B) ont été traitées quotidiennement, pendant 3 jours, respectivement, par 5,1 μ M ou 8,4 μ M de GR295. Chaque jour, un comptage des cellules vivantes est effectué, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. Toutes les valeurs sont significatives au test t de student ($p < 0,05$), hormis le premier jour de traitement des cellules MDA-MB231.

C. Arrêt du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire a été étudié suite au traitement des cellules MCF7 et MDA-MB231 par la GR295 pendant 24 h (Figure 147). Une légère accumulation des cellules en phase S est alors observée dans les deux lignées cellulaires (Figure 147A et B). De plus, ces traitements n'induisent aucune augmentation du nombre de cellules en phase sub-G1 (Figure 147A et B).

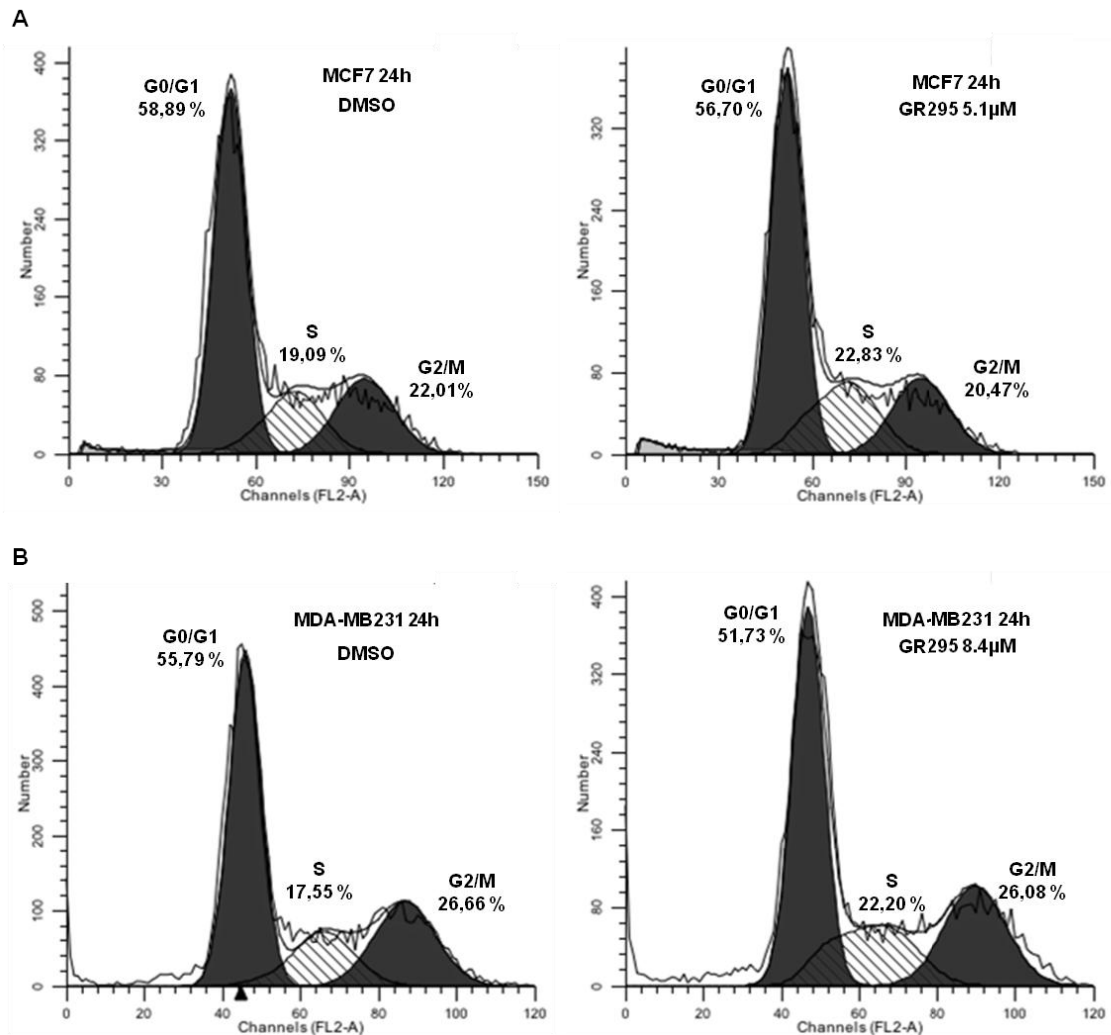


Figure 147 : Induction de l'arrêt du cycle cellulaire par la GR295

(A – B) Les cellules MCF7 (A) et MDA-MB231 (B) ont été traitées pendant 24 h, respectivement, par 5,1µM ou 8,4µM de GR295. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie en flux, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. La distribution des cellules dans les différentes phases du cycle, G0/G1, S et G2/M, est exprimée en pourcentage.

D. Inhibition de l'activité des CDC25 *in cellulo*

La mesure directe de l'activité des CDC25 n'est pas possible *in cellulo*. Une méthode indirecte est donc utilisée pour évaluer cette activité. Pour cela, l'état de phosphorylation de ses substrats, les protéines Cdk1/2, est étudié suite au traitement des cellules MCF7 et MDA-MB231 par la GR295 (Figure 148). La cible principale de CDC25A est la Cdk2, c'est

pourquoi son niveau de phosphorylation a été étudié en priorité. Le traitement par la GR295 entraîne une légère hausse de la phosphorylation de Cdk2 après 4 h de traitement (Figure 148A). De plus, ce traitement semble induire une hausse plus prononcée de la phosphorylation de Cdk2 dans les cellules MDA-MB231 à partir de 6 h (Figure 148B). Le niveau de phosphorylation de Cdk1 a également été étudié dans les deux lignées cellulaires, mais la GR295 ne semble pas avoir de réel impact sur ce dernier (Résultats non présentés).

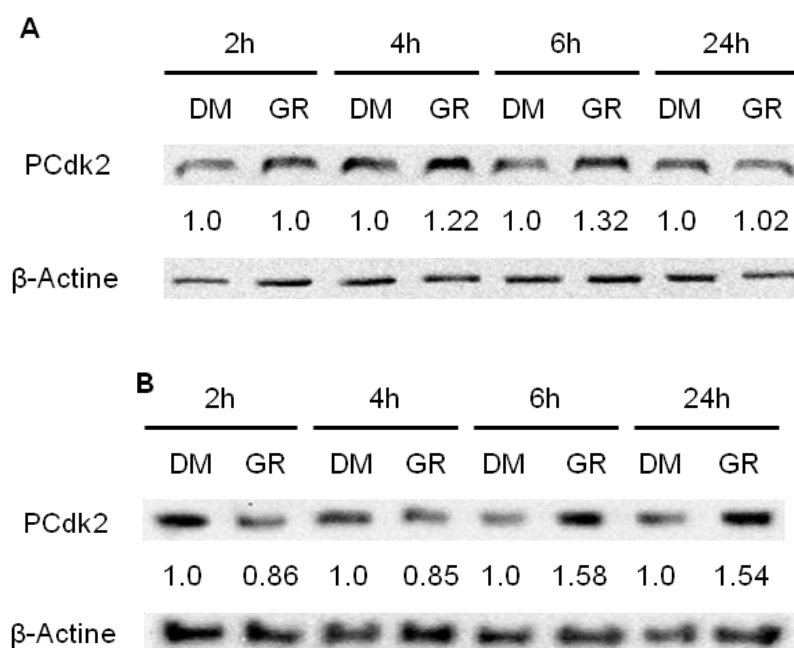


Figure 148 : Augmentation de la phosphorylation de Cdk2 par la GR295

(A - B) Les cellules MCF7 (A) ont été traitées par 5,1 μ M de GR295, tandis que les cellules MDA-MB231 (B) ont été traitées par 8,4 μ M de GR295 pendant 2 h, 4 h, 6 h et 24 h. L'expression de la phospho-Cdk2 (PCdk2 ; A et B) est étudiée par immunoréplique. Elle est réalisée à partir de 50 μ g de protéines totales, selon la procédure décrite dans la section **Matériel et Méthodes**. L'expression de chaque protéine a été rapportée à celle de la β -actine, pour chaque condition, puis comparée à celle obtenue dans les cellules traitées avec le DMSO. Les résultats présentés sont représentatifs de 3 séries indépendantes.

La hausse de la phosphorylation de Cdk2 est une preuve indirecte de l'inhibition de l'activité des CDC25. La GR295 entraîne donc bien une inhibition des CDC25 *in cellulo*, ce qui pourrait être à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S, observé précédemment. En effet, le complexe Cdk2/CyclineA contrôle la progression au sein de la phase S du cycle cellulaire.

E. Absence de modification de la viabilité cellulaire

Le traitement par la GR295 ne provoque aucune modification de la viabilité cellulaire, qu'il s'agisse des cellules MCF7 ou MDA-MB231 (Figure 149A et B).

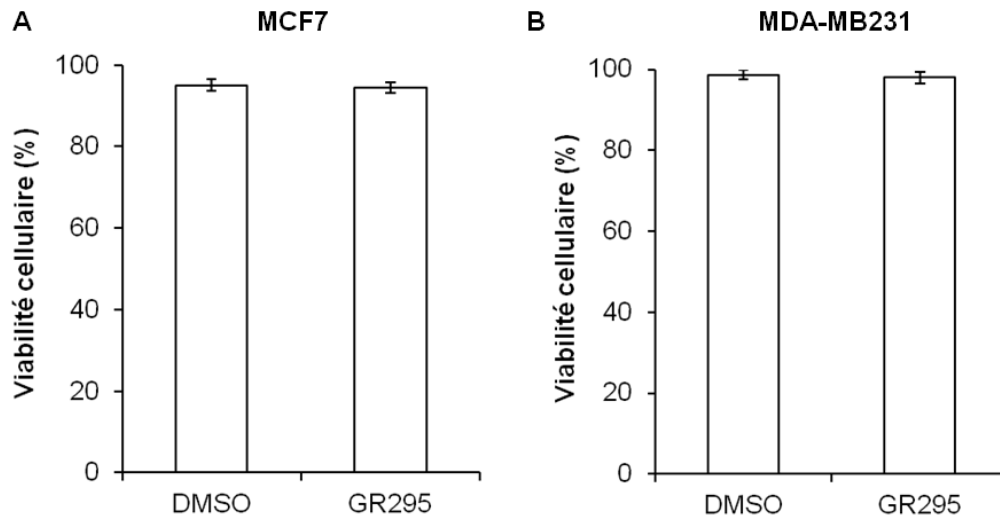


Figure 149 : Absence de modification de la viabilité des cellules MCF7 et MDA-MB231 par la GR295

(A et B) La viabilité cellulaire a été évaluée, comme précédemment (Figure 67), dans les cellules MCF7 (A) traitées par 5,1 μ M de GR295 ou dans les cellules MDA-MB231 (B) traitées par 8,4 μ M de GR295 pendant 48 h. Aucune différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par la GR295, et celles obtenues avec le DMSO.

Ce résultat est confirmé par une absence de condensation de la chromatine, observée suite à des traitements de 24 h ou 48 h (Figure 150). L'effet de la GR295 est donc plutôt cyostatique.

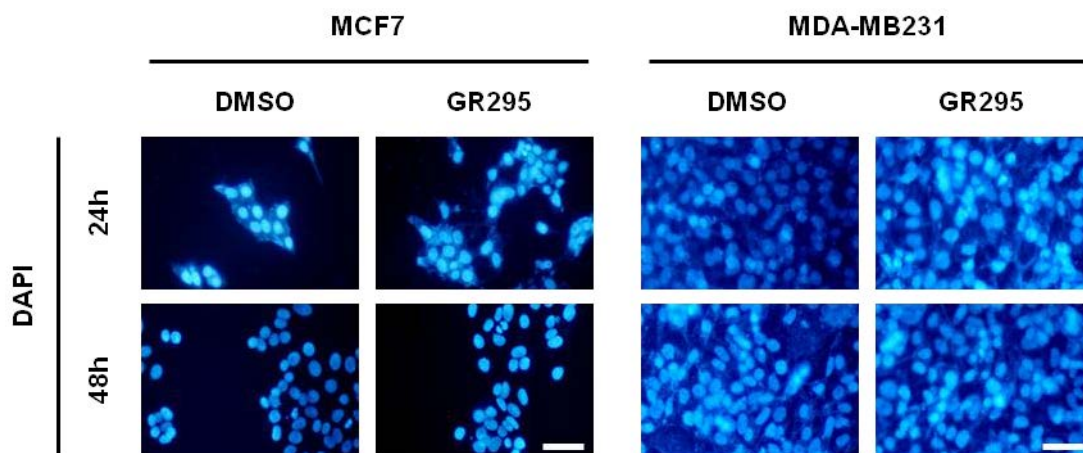


Figure 150 : Absence de condensation de la chromatine dans les cellules MCF7 et MDA-MB231 traitées par la GR295

Mise en évidence des noyaux par DAPI, après traitement des cellules MCF7 et MDA-MB231, respectivement, par 5,1 μ M ou 8,4 μ M de GR295 pendant 24 h et 48 h. La barre d'échelle correspond à 50 μ m.

F. Absence d'induction de l'autophagie

L'utilisation de l'acridine orange, par cytométrie en flux, n'a pas mis en évidence la présence de vésicules acides dans les cellules MCF7 ou MDA-MB231, suite au traitement par la GR295 (Figure 151A et B). Ce phénomène ne serait donc pas impliqué dans l'inhibition de la prolifération observée.

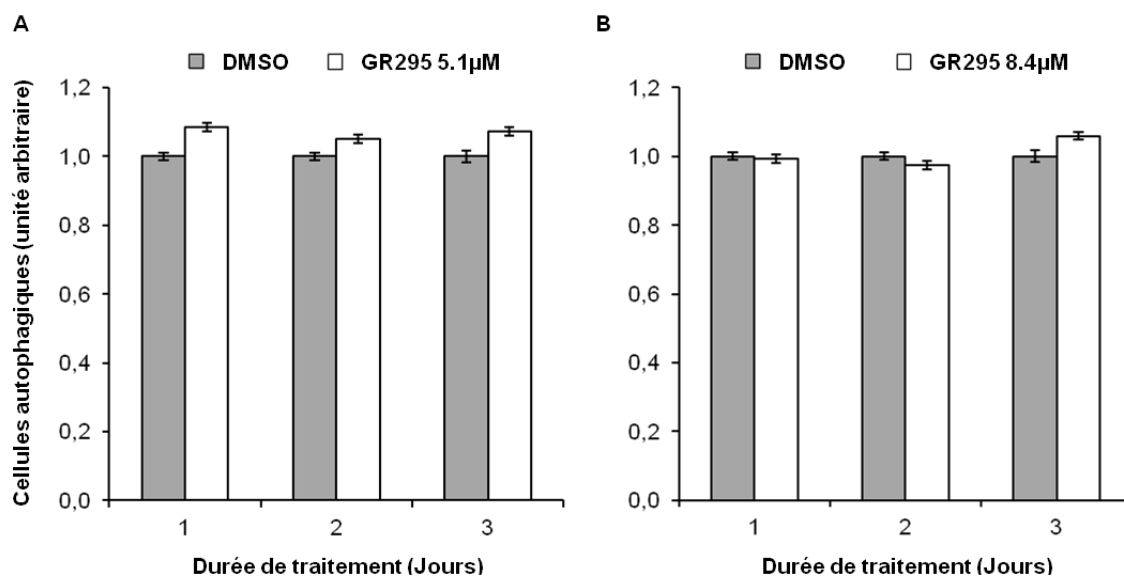


Figure 151 : Absence d'induction de vésicules acides par la GR295 dans les cellules MCF7 et MDA-MB231

(A et B) Les cellules MCF7 (A) et MDA-MB231 (B) ont été traitées, respectivement par 5,1µM et 8,4µM de GR295 pendant 24 h, 48 h et 72 h. La formation de vésicules acides a été étudiée, comme précédemment (Figure 72). *, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues avec les cellules traitées par la GR295, et celles obtenues avec le DMSO.

G. Production d'un stress oxydant

Le stress pouvant être impliqué dans l'inhibition des CDC25 *in cellulo*, la production d'espèces réactives a été étudiée suite au traitement par la GR295. Cette dernière n'entraîne aucune formation de ROS dans les deux lignées cellulaires (Figure 152).

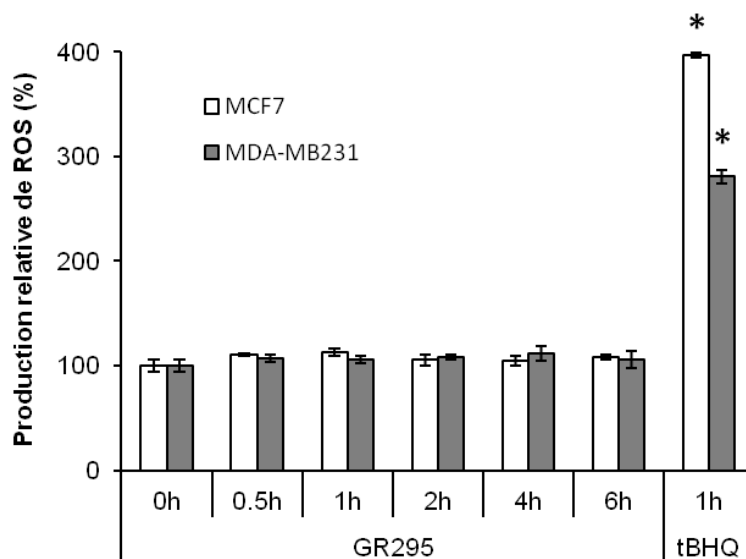


Figure 152 : Absence de production de ROS par la GR295

La génération de ROS a été mesurée après traitement des cellules MCF7 et MDA-MB231, respectivement, par 5,1µM et 8,4µM de GR295, pour des temps variant jusqu'à 6 h. Le traitement de 1 h par 1mM de *tert*-butylhydroquinone (tBHQ) est utilisé en tant que témoin positif. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes. *, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par la GR295, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

Résultats et Discussion

En revanche, elle induit une production modérée de RNS dans les cellules MCF7 et MDA-MB231 (Figure 153), dont une partie correspond à du peroxyde nitrique (Figure 153).

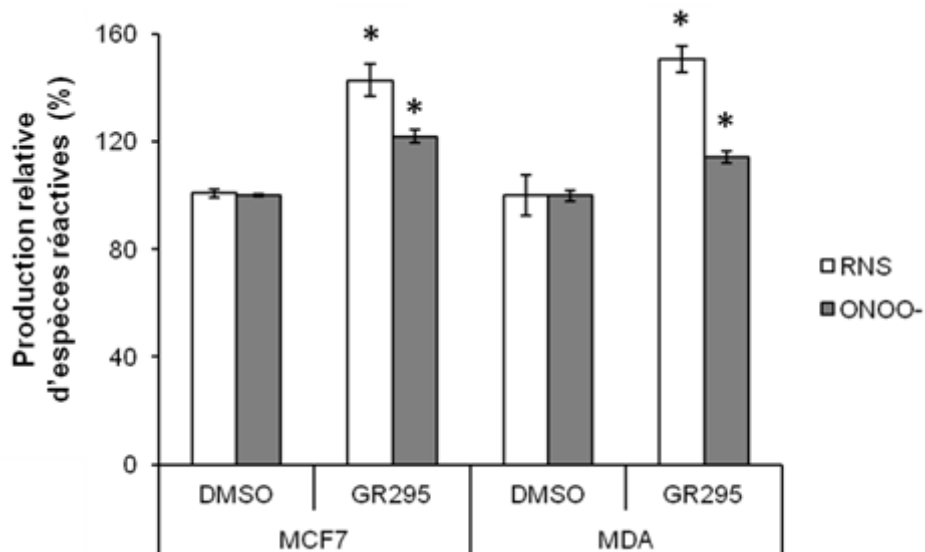


Figure 153 : Production de RNS par la GR295

La génération de RNS et de ONOO⁻ a été mesurée après traitement des cellules MCF7 par 5,1 μ M de GR295 ou des cellules MDA-MB231 par 8,4 μ M de GR295 pendant 24 h.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux cellules témoins traitées par le DMSO. L'expérience a été réalisée sur 3 échantillons de 3 séries indépendantes.

*, différence significative au test t de Student ($p < 0,05$) ; comparaison entre les valeurs obtenues lorsque les cellules sont traitées par la GR295, et celles obtenues lorsque les cellules sont traitées par le DMSO.

La production de peroxyde nitrique a été confirmée par microscopie (Figure 154).

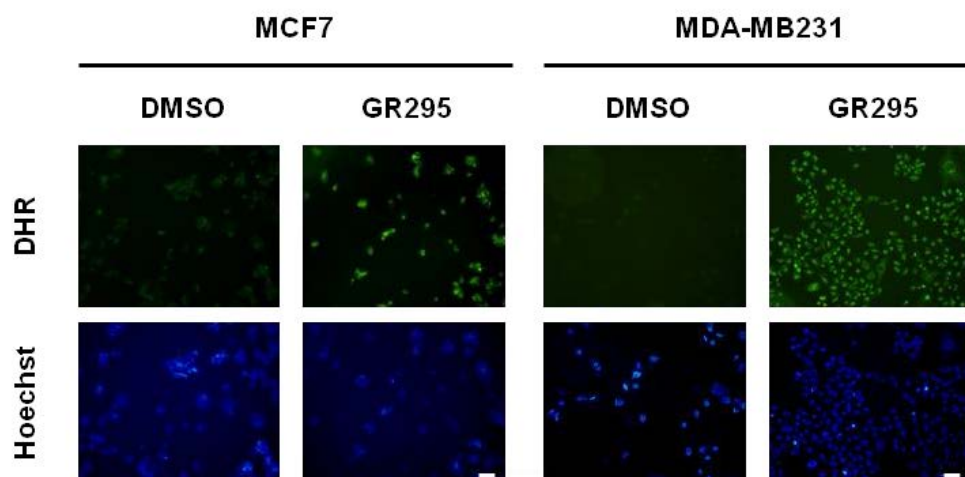


Figure 154 : Production de peroxyde nitrique par la GR295, observée par microscopie

Mise en évidence, de la génération de ONOO⁻ après 24 h de traitement des cellules MCF7 et MDA-MB231, respectivement, par 5,1 μ M et 8,4 μ M de GR295, grâce la sonde DHR (en vert). Les noyaux sont mis en évidence par une coloration avec Hoechst 33342 (en bleu). La barre d'échelle correspond à 50 μ m.

Le stress oxydant généré étant très limité, il semblerait que la GR295 inhibe la CDC25A uniquement grâce à la liaison réversible qu'elle est capable de réaliser avec cette dernière.

Conclusion et Perspectives

I. Impact des ligands de PPAR sur les cellules cancéreuses coliques

La Pio est utilisée pour le traitement du diabète de type II, mais présente des effets indésirables (prise de poids, ostéoporose...). En France, elle a même été suspendue en juin 2011, car une augmentation de l'incidence des cancers de la vessie était suspectée, chez les patients traités⁴⁵. En revanche, son action anti-cancéreuse, vérifiée *in vitro* et *in vivo* sur différents modèles cellulaires, semble être indépendante de l'activation de PPAR γ , notamment grâce à la production d'un stress oxydant. L'analogue de la Pio, la Δ Pio, se lie au récepteur PPAR γ , mais empêche son activation⁴³. Son utilisation éventuelle en thérapeutique pourrait permettre de conserver les effets anticancéreux de la Pio, tout en éliminant ses effets indésirables liés à l'activation de PPAR γ . Le Féno présente également un intérêt thérapeutique puisqu'il est efficace contre différents types de cellules cancéreuses^{83,84,87,88} et qu'aucune toxicité n'a été, à ce jour, décrite chez l'Homme.

Dans cette étude, les ligands de PPAR γ , Pio et Δ Pio, et le ligand de PPAR α , Féno, diminuent efficacement la croissance des cellules cancéreuses coliques HT29 et HCT116, conformément à d'autres études menées, avec les TZD et les fibrates, sur les cellules cancéreuses coliques^{78-81,169,174} ou d'autres modèles cellulaires^{77,82,129}. Cet effet est indépendant de l'activation du récepteur, ce qui confirme des résultats obtenus dans d'autres études^{55,87}. Cette réduction de prolifération est associée à un arrêt du cycle cellulaire, mais elle n'est pas reliée à l'induction d'un phénomène apoptotique. L'arrêt du cycle cellulaire a déjà été observé avec les TZD et les fibrates^{87,88,355}. Cependant, l'absence d'apoptose observée diffère des résultats obtenus avec ces composés sur d'autres modèles cancéreux^{43,55,83,84,131,133-135,354}. Néanmoins, une diminution de la viabilité est observée suite au traitement des cellules HT29 par Féno. L'autophagie pouvant être un mécanisme alternatif de mort cellulaire³⁵⁶, ce phénomène a été étudié suite aux traitements par les ligands de PPAR. Ils induisent bien de l'autophagie dans les cellules HT29 et HCT116, résultat en accord avec de précédentes études^{160,356,358}.

L'inhibition de la croissance cellulaire pouvant être provoquée par un stress oxydant, tout comme l'induction de l'autophagie^{55,205}, la capacité de ces composés à induire des espèces réactives a été évaluée. Effectivement, ils génèrent des ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) et des RNS (NO et ONOO $^{\cdot}$). D'ailleurs, la capacité oxydante des TZD et des fibrates est largement décrite dans la bibliographie^{55,69,239,241,242,359,360}. Ces espèces réactives sont issues de l'activité mitochondriale, mais également de l'activité des enzymes COX2 et iNOS. L'implication d'autres enzymes oxydases pourrait également être étudiée, notamment la POX dont l'activité semble être reliée au stress oxydant induit par les TZD^{269,270}. La production de ces espèces

Conclusion et Perspectives

réactives est indépendante de l'activation de PPAR, conformément à d'autres études ^{33,55,238,239}. De plus, elle est à l'origine d'une diminution du contenu en GSH. Cette réduction a déjà été décrite en présence d'un stress oxydant généré par les TZD ou par Féno ^{239,240,360}. Cette baisse pourrait également être provoquée par une conjugaison des composés avec le GSH, comme cela a déjà été montré avec les TZD et la Δ PGJ2 ^{271,273}.

Ce stress oxydant généré par les ligands de PPAR γ est responsable de l'activation de la voie antioxydante Nrf2/Keap1 et de l'induction de ses deux gènes-cibles principaux, HO-1 et NQO1. La transcription de HO-1 pouvant également être induite par les voies de signalisation PPAR γ ²⁴⁷ ou AP-1 ³⁶⁸, il a été vérifié qu'elle était bien dépendante du stress oxydant et indépendante de l'activation du récepteur PPAR γ . L'activation de la voie Nrf2 peut limiter l'efficacité des drogues thérapeutiques ²²⁶, notamment en inhibant la mort cellulaire par autophagie ²²⁴. Dans notre cas, il semblerait que ce ne soit pas le cas. En effet, l'inhibition de Nrf2 par la Trigonelline ^{369,370} ne modifie pas la croissance des cellules traitées par Pio et Δ Pio. Ces résultats sont néanmoins préliminaires et devront être confirmés. L'utilisation de siRNA dirigés contre Nrf2 pourrait aussi permettre de vérifier l'effet protecteur de cette voie. En revanche, Féno n'induit pas l'activation de cette voie antioxydante, bien qu'il induise des espèces réactives. Il est tout de même capable d'induire la transcription de deux de ses gènes-cibles (HO-1 et GST π), mais il semblerait que d'autres voies de signalisation en soient à l'origine ²⁴⁷. Enfin, le stress oxydant induit par les ligands de PPAR est, en partie, impliqué dans la diminution de prolifération observée, résultat déjà décrit par d'autres équipes ^{33,55,238-240}. Il joue aussi un rôle important dans l'induction du phénomène d'autophagie par les ligands de PPAR γ .

La modification du métabolisme glycolytique pouvant être à l'origine d'une inhibition de la prolifération cellulaire ³⁰⁵, l'impact des ligands de PPAR sur cette voie métabolique a été étudié. Ces composés augmentent la glycolyse dans les cellules HT29. Il en résulte une augmentation de la consommation de glucose et une acidification du milieu extracellulaire, par une libération accrue de lactate. Cette hausse de la glycolyse serait provoquée par une augmentation de l'expression de HIF-1 α suite aux traitements par Pio et Δ Pio. L'impact du Féno sur l'expression de cette protéine devra encore être étudié, tout comme l'effet de ces ligands sur le métabolisme glycolytique des cellules HCT116. Un accroissement de la glycolyse, notamment par une activation de HIF-1 α , a déjà été montré suite au traitement par les TZD ^{333,334,342-344}. En revanche, les études menées avec Féno ont plutôt mis en évidence une diminution de la glycolyse, au profit de la β -oxydation des acides gras, grâce à une

réduction de l'expression et de l'activité de HIF-1 α ^{309,325,329}. Il conviendrait de déterminer si cette augmentation de la glycolyse a un effet bénéfique ou délétère sur la diminution de prolifération induite par les ligands de PPAR, en utilisant des inhibiteurs de la glycolyse. Une analyse du métabolome par chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse (LC-MS) permettrait, quant à elle, d'étudier l'impact des ligands de PPAR sur les voies du métabolisme oxydatif, notamment au niveau du taux relatif des intermédiaires du cycle de Krebs et de la β -oxydation des acides gras. Enfin, la protéine HIF-1 α pouvant être exprimée en présence d'un stress oxydant³¹⁷, il serait aussi intéressant de vérifier l'impact de ce stress sur son expression suite aux traitements par les ligands de PPAR.

Dans les tumeurs solides, les cellules au centre de la tumeur sont généralement en conditions hypoxiques et ne présentent pas la même sensibilité aux agents anticancéreux que les cellules en prolifération au bord de la tumeur³¹³. Il est donc également prévu de tester l'efficacité de ces différents composés en conditions hypoxiques, en utilisant une chambre hypoxique ou le chlorure de cobalt, qui mime ces conditions³¹⁵. Des résultats préliminaires, obtenus en cotraitant les cellules avec du chlorure de cobalt, semblent montrer que les ligands de PPAR restent efficaces en conditions hypoxiques. Il serait alors intéressant d'étudier l'impact de l'hypoxie sur les réponses induites par ces composés, notamment au niveau de la production d'espèces réactives et du métabolisme glycolytique.

L'évaluation de l'efficacité de Pio et Féno *in vivo* a déjà été réalisée au laboratoire. Les traitements de souris xénogreffées avec des cellules HT29, pendant 8 semaines, par ces composés diminuent considérablement le volume tumoral. En revanche, le traitement de ces souris par Pio, avant la greffe des cellules cancéreuses, inhibe totalement la formation tumorale³⁷⁹. De plus, aucune toxicité aiguë n'est reliée aux traitements par Pio et Féno. L'efficacité *in vivo* de Δ Pio pourra aussi être évaluée. Néanmoins, sa toxicité devra être préalablement examinée sur des cellules saines humaines (coliques, fibroblastes...) ou sur des couples tissu tumoral / tissu sain.

II. Impact des dérivés 4-thiazolidinones sur les cellules cancéreuses

Une activité anticancéreuse a déjà été décrite pour les dérivés 4-thiazolidinones^{275–279,283}. La présence d'une seule fonction cétone au niveau du cycle thiazolidine empêcherait l'activation du récepteur PPAR γ et donc les effets indésirables qui y sont liés. Néanmoins, aucune information sur leur efficacité ou sur leur toxicité *in vivo* n'est disponible.

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, l'absence d'activation de PPAR γ par les dérivés 4-thiazolidinones n'a pas encore été vérifiée. En revanche, il a été montré que certains d'entre eux réduisent la croissance des cellules cancéreuses coliques HT29 en induisant un phénomène apoptotique (GR122, GR123, GR125, GR134, GR274 et GR277). Nos dérivés 4-thiazolidinones génèrent également des espèces réactives, même si leur implication dans la baisse de la prolifération n'a pas été mise en évidence. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans d'autres études. Effectivement, d'autres dérivés ont été décrits comme inhibiteurs des COX ou de ALR2, ce qui leur confèreraient plutôt des capacités antioxydantes²⁸⁷⁻²⁸⁹.

Il a été montré que ces dérivés pouvaient inhiber de nombreuses tyrosine kinases²⁸³ ou phosphatases, notamment PTP1B, LMW-PTP et SHP2^{281,283}. Les structures thiophéniques, de certains de nos dérivés, peuvent aussi inhiber PTP1B³⁸⁰. Il serait donc intéressant de tester ces différents composés sur les kinases et les phosphatases qui jouent un rôle important dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses. Les cibles cellulaires de ces composés pourraient ainsi être mises en évidence. Dans cette étude, il a, d'ores et déjà, été montré que certains de ces dérivés inhibent l'activité de la phosphatase CDC25A *in vitro* (GR293, GR294, GR295 et GR296). Les dérivés en question étant inefficaces sur les cellules cancéreuses coliques, ils ont été testés sur les cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB231. Seule la GR295 semble diminuer efficacement la prolifération de ces cellules. En effet, elle provoque un arrêt du cycle cellulaire, notamment par l'inhibition de CDC25A *in cellulo*. Enfin, cet effet n'est pas associée à une mort cellulaire, ni à une modification du statut redox. Comme pour les ligands de PPAR, il conviendrait d'étudier la toxicité de ces différents composés sur les cellules saines avant d'envisager une étude *in vivo*.

Bibliographie

1. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chemico-biological interactions* **160**, 1–40 (2006).
2. Binder-Foucard, F. et al. *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides*. Saint-Maurice (Fra) : Institut de veille sanitaire 1–122 (2013).
3. Bouvier, A. . *Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000, Colon rectum*. Institut de veille sanitaire 2003 53–59 (2003).
4. Krause, W. F. & DuBois, R. N. *The molecular basis for prevention of colorectal cancer*. *Clinical colorectal cancer* **1**, 47–54 (2001).
5. Kim, K.-A. *Mitogenic Influence of Human R-Spondin1 on the Intestinal Epithelium*. *Science* **309**, 1256–1259 (2005).
6. Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. *Lessons from hereditary colorectal cancer*. *Cell* **87**, 159–70 (1996).
7. Reddy, B. S. & Sugie, S. *Effect of different levels of omega-3 and omega-6 fatty acids on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats*. *Cancer research* **48**, 6642–7 (1988).
8. Wasan, H. S., Novelli, M., Bee, J. & Bodmer, W. F. *Dietary fat influences on polyp phenotype in multiple intestinal neoplasia mice*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3308–13 (1997).
9. Moser, A. R. et al. *ApcMin: a mouse model for intestinal and mammary tumorigenesis*. *European journal of cancer* **31A**, 1061–4 (1990).
10. Oshima, M. et al. *Effects of docosahexaenoic acid (DHA) on intestinal polyp development in Apc delta 716 knockout mice*. *Carcinogenesis* **16**, 2605–7 (1995).
11. Michalik, L., Desvergne, B. & Wahli, W. *Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories*. *Nature reviews. Cancer* **4**, 61–70 (2004).
12. Desvergne, B. & Wahli, W. *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. *Endocrine reviews* **20**, 649–88 (1999).
13. Barak, Y. et al. *Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 303–8 (2002).

Bibliographie

14. Nadra, K. et al. *Differentiation of trophoblast giant cells and their metabolic functions are dependent on peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta*. *Molecular and cellular biology* **26**, 3266–81 (2006).
15. Tachibana, K., Yamasaki, D., Ishimoto, K. & Doi, T. *The Role of PPARs in Cancer*. *PPAR research* **2008**, 1–15 (2008).
16. Fiatte, C. et al. *Genetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor γ 1 splice variants in human colorectal cell lines*. *International Journal of Oncology* **29**, 1601–1610 (2006).
17. Koeffler, H. P. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers*. *Clinical cancer research* **9**, 1–9 (2003).
18. Barak, Y. et al. *PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development*. *Molecular cell* **4**, 585–95 (1999).
19. Kubota, N. et al. *PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance*. *Molecular cell* **4**, 597–609 (1999).
20. Wendling, O., Chambon, P. & Mark, M. *Retinoid X receptors are essential for early mouse development and placentogenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 547–51 (1999).
21. Fournier, T., Tsatsaris, V., Handschuh, K. & Evain-Brion, D. *PPARs and the placenta*. *Placenta* **28**, 65–76 (2007).
22. Chui, P. C., Guan, H.-P., Lehrke, M. & Lazar, M. A. *PPARgamma regulates adipocyte cholesterol metabolism via oxidized LDL receptor 1*. *The Journal of clinical investigation* **115**, 2244–56 (2005).
23. Dowell, P. et al. *p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. *The Journal of biological chemistry* **272**, 33435–43 (1997).
24. Gelman, L. et al. *p300 interacts with the N- and C-terminal part of PPARgamma2 in a ligand-independent and -dependent manner, respectively*. *The Journal of biological chemistry* **274**, 7681–8 (1999).
25. Yang, W., Rachez, C. & Freedman, L. P. *Discrete roles for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor in recruiting nuclear receptor coactivators*. *Molecular and cellular biology* **20**, 8008–17 (2000).
26. Guan, H.-P., Ishizuka, T., Chui, P. C., Lehrke, M. & Lazar, M. A. *Corepressors selectively control the transcriptional activity of PPARgamma in adipocytes*. *Genes & development* **19**, 453–61 (2005).

27. Vega, R. B., Huss, J. M. & Kelly, D. P. *The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.* Molecular and cellular biology **20**, 1868–76 (2000).
28. Ahmadian, M. et al. *PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future.* Nature Medicine **99**, 557–566 (2013).
29. Burns, K. a & Vanden Heuvel, J. P. *Modulation of PPAR activity via phosphorylation.* Biochimica et biophysica acta **1771**, 952–60 (2007).
30. Choi, J. H. et al. *Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR γ by Cdk5.* Nature **466**, 451–6 (2010).
31. Pascual, G. et al. *A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ .* Nature **437**, 759–63 (2005).
32. Panigrahy, D. et al. *PPAR α agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition.* PNAS **105**, 985–990 (2008).
33. Scatena, R., Bottoni, P. & Giardina, B. *Mitochondria, PPARs, and Cancer: Is Receptor-Independent Action of PPAR Agonists a Key?* PPAR research **2008**, 256251 (2008).
34. Schoonjans, K., Staels, B., Grimaldi, P. & Auwerx, J. *Acyl-CoA synthetase mRNA expression is controlled by fibric-acid derivatives, feeding and liver proliferation.* European journal of biochemistry **216**, 615–22 (1993).
35. Frick, M. H. et al. *Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease.* The New England journal of medicine **317**, 1237–45 (1987).
36. Vu-dac, N. et al. *Fibrates Increase Human Apolipoprotein A-II Expression through Activation of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor.* The journal of Clinical Investigation **96**, 741–750 (1995).
37. *Schéma de la beta oxydation des acides gras.* at <http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.108.b3/content/_zoom.htm?images/08_06A_b-oxydation_peroxisomale_xl.jpg+1013+626>
38. Kim, E.-H. & Surh, Y.-J. *15-deoxy-Delta^{12,14}-prostaglandin J₂ as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors.* Biochemical pharmacology **72**, 1516–28 (2006).

Bibliographie

39. Uchida, K. & Shibata, T. *15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2: an electrophilic trigger of cellular responses*. *Chemical research in toxicology* **21**, 138–44 (2008).
40. Grau, R., Iñiguez, M. A. & Fresno, M. *Inhibition of activator protein 1 activation, vascular endothelial growth factor, and cyclooxygenase-2 expression by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in colon carcinoma cells: evidence for a redox-sensitive peroxisome proliferator-activated receptor-g*. *Cancer research* **64**, 5162–71 (2004).
41. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. *The dual role of sirtuins in cancer*. *Genes & cancer* **2**, 648–62 (2011).
42. de Jong, E., Winkel, P., Poelstra, K. & Prakash, J. *Anticancer effects of 15d-prostaglandin-J2 in wild-type and doxorubicin-resistant ovarian cancer cells: novel actions on SIRT1 and HDAC*. *PloS one* **6**, e25192 (2011).
43. Shiau, C.-W. et al. *Thiazolidenediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma*. *Cancer research* **65**, 1561–9 (2005).
44. Jain, V. S., Vora, D. K. & Ramaa, C. S. *Thiazolidine-2,4-diones: Progress towards multifarious applications*. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 1599–1620 (2013).
45. Azoulay, L. et al. *The use of pioglitazone and the risk of bladder cancer in people with type 2 diabetes: nested case-control study*. *BMJ (Clinical research ed.)* **344**, e3645 (2012).
46. Sato, K. et al. *Suppressive effects of acid-forming diet against the tumorigenic potential of pioglitazone hydrochloride in the urinary bladder of male rats*. *Toxicology and applied pharmacology* **251**, 234–44 (2011).
47. Suzuki, S. et al. *Effects of pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, on the urine and urothelium of the rat*. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **113**, 349–57 (2010).
48. Tseng, C.-H. *Pioglitazone and bladder cancer: a population-based study of Taiwanese*. *Diabetes care* **35**, 278–80 (2012).
49. Chang, C.-H. et al. *Association of thiazolidinediones with liver cancer and colorectal cancer in type 2 diabetes mellitus*. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **55**, 1462–72 (2012).
50. Cheatham, W. W. *Peroxisome proliferator-activated receptor translational research and and clinical experience*. *American Journal of Clinical Nutrition* **91**, 262–266 (2010).

51. Bazelier, M. T. et al. *Risk of fracture with thiazolidinediones: an individual patient data meta-analysis*. *Frontiers in endocrinology* **4**, 11 (2013).
52. Colhoun, H. M. et al. *Hospitalised hip fracture risk with rosiglitazone and pioglitazone use compared with other glucose-lowering drugs*. *Diabetologia* **55**, 2929–37 (2012).
53. Bray, G. A. et al. *Effect of pioglitazone on body composition and bone density in subjects with prediabetes in the ACT NOW trial*. *Diabetes, obesity & metabolism* (2013).
54. Taygerly, J. P. et al. *Discovery of INT131: a selective PPAR γ modulator that enhances insulin sensitivity*. *Bioorganic & medicinal chemistry* **21**, 979–92 (2013).
55. Feinstein, D. L. et al. *Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: is mitochondrial function the key?* *Biochemical pharmacology* **70**, 177–88 (2005).
56. Mueller, C., Weaver, V., Vanden Heuvel, J. P., August, A. & Cantorna, M. T. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma*. *Archives of biochemistry and biophysics* **418**, 186–96 (2003).
57. Takaki, K., Mitsuyama, K., Tsuruta, O., Toyonaga, A. & Sata, M. *Attenuation of experimental colonic injury by thiazolidinedione agents*. *Inflammation research: official journal of the European Histamine Research Society* **55**, 10–5 (2006).
58. Zhang, H.-F. et al. *PPAR- γ agonist pioglitazone prevents apoptosis of endothelial progenitor cells from rat bone marrow*. *Cell biology international* **37**, 430–5 (2013).
59. Kehrer, J. P. et al. *Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR) α by MK886*. *The Biochemical journal* **356**, 899–906 (2001).
60. Xu, H. E. et al. *Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPAR α* . *Nature* **415**, 813–7 (2002).
61. Leesnitzer, L. M. et al. *Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662*. *Biochemistry* **41**, 6640–50 (2002).
62. Lee, G. et al. *T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities*. *The Journal of biological chemistry* **277**, 19649–57 (2002).

Bibliographie

63. Rieusset, J. et al. *A new selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma antagonist with antiobesity and antidiabetic activity*. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.) **16**, 2628–44 (2002).
64. Wright, H. M. et al. *A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation*. *The Journal of biological chemistry* **275**, 1873–7 (2000).
65. Nakamuta, M. et al. *Bisphenol a diglycidyl ether (BADGE) suppresses tumor necrosis factor-alpha production as a PPARgamma agonist in the murine macrophage-like cell line, RAW 264.7*. *Cell biology international* **26**, 235–41 (2002).
66. Fehlberg, S., Trautwein, S., Göke, A. & Göke, R. *Bisphenol A diglycidyl ether induces apoptosis in tumour cells independently of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, in caspase-dependent and -independent manners*. *The Biochemical journal* **362**, 573–8 (2002).
67. Ramilo, G., Valverde, I., Lago, J., Vieites, J. M. & Cabado, A. G. *Cytotoxic effects of BADGE (bisphenol A diglycidyl ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl ether) on Caco-2 cells in vitro*. *Archives of toxicology* **80**, 748–55 (2006).
68. Ye, F. et al. *The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPARgamma: bioassay with molecular modeling simulation*. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* **7**, 74–82 (2006).
69. Corton, J. C., Lapinskas, P. J. & Gonzalez, F. J. *Central role of PPARalpha in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators*. *Mutation research* **448**, 139–51 (2000).
70. Gonzalez, F. J., Peters, J. M. & Cattley, R. C. *Mechanism of Action of the Nongenotoxic Peroxisome Proliferators: Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α* . *Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1702–1709 (1998).
71. Peters, J. M., Cattley, R. C. & Gonzalez, F. J. *Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643*. *Carcinogenesis* **18**, 2029–33 (1997).
72. Lauer, C., Völkl, A., Riedl, S., Fahimi, H. D. & Beier, K. *Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma*. *Carcinogenesis* **20**, 985–9 (1999).
73. Park, J.-I. & Kwak, J.-Y. *The role of peroxisome proliferator-activated receptors in colorectal cancer*. *PPAR research* **2012**, 876418 (2012).

74. Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Raucy, J. L. & Johnson, E. F. Peroxisome proliferator activated receptor- α expression in human liver. *Molecular pharmacology* **53**, 14–22 (1998).
75. Yang, Q. et al. The PPAR α -Humanized Mouse: A Model to Investigate Species Differences in Liver Toxicity Mediated by PPAR α . *Toxicological Sciences* **101**, 132–139 (2008).
76. Oshio, H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor α activates cyclooxygenase-2 gene transcription through bile acid transport in human colorectal cancer cell lines. *Journal of gastroenterology* **43**, 538–49 (2008).
77. Chang, N. W. et al. Fenofibrate exhibits a high potential to suppress the formation of squamous cell carcinoma in an oral-specific 4-nitroquinoline 1-oxide/arecoline mouse model. *Biochimica et biophysica acta* **1812**, 558–64 (2011).
78. Tanaka, T. et al. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and γ inhibit chemically induced colitis and formation of aberrant crypt foci in rats. *Cancer research* **61**, 2424–8 (2001).
79. Kohno, H., Suzuki, R., Sugie, S. & Tanaka, T. Suppression of colitis-related mouse colon carcinogenesis by a COX-2 inhibitor and PPAR ligands. *BMC cancer* **5**, 46 (2005).
80. Niho, N. et al. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation in *Apc*-deficient mice by peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *Cancer research* **63**, 6090–5 (2003).
81. Mutoh, M., Niho, N. & Wakabayashi, K. Concomitant suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by increasing lipoprotein lipase activity in *Apc*-deficient mice. *Biological chemistry* **387**, 381–5 (2006).
82. Thuillier, P. et al. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor- α partially inhibit mouse skin tumor promotion. *Molecular carcinogenesis* **29**, 134–42 (2000).
83. Urbanska, K. et al. Activation of PPAR α inhibits IGF-I-mediated growth and survival responses in medulloblastoma cell lines. *International journal of cancer* **123**, 1015–1024 (2011).
84. Wilk, A. et al. Fenofibrate-induced nuclear translocation of FoxO3A triggers Bim-mediated apoptosis in glioblastoma cells in vitro. **11**, 2660–2671 (2012).

Bibliographie

85. *Martinasso, G. et al. Involvement of PPARs in Cell Proliferation and Apoptosis in Human Colon Cancer Specimens and in Normal and Cancer Cell Lines. PPAR research* **2007**, 93416 (2007).
86. *Tong, J. L. et al. MicroRNA 506 regulates expression of PPAR alpha in hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cells. FEBS letters* **585**, 3560–8 (2011).
87. *Yamasaki, D. et al. Fenofibrate suppresses growth of the human hepatocellular carcinoma cell via PPAR α -independent mechanisms. European journal of cell biology* **90**, 657–64 (2011).
88. *Saidi, S. a, Holland, C. M., Charnock-Jones, D. S. & Smith, S. K. In vitro and in vivo effects of the PPAR-alpha agonists fenofibrate and retinoic acid in endometrial cancer. Molecular cancer* **5**, 13 (2006).
89. *Grabacka, M. et al. Inhibition of melanoma metastases by fenofibrate. Archives of dermatological research* **296**, 54–8 (2004).
90. *Grabacka, M., Plonka, P. M., Urbanska, K. & Reiss, K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation decreases metastatic potential of melanoma cells in vitro via down-regulation of Akt. Clinical cancer research* **12**, 3028–36 (2006).
91. *Varet, J. et al. Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**, 810–9 (2003).
92. *Drukala, J. et al. ROS accumulation and IGF-IR inhibition contribute to fenofibrate / PPAR α -mediated inhibition of Glioma cell motility in vitro. Molecular Cancer* **9**, 1–15 (2010).
93. *Pozzi, A. et al. Peroxisomal proliferator-activated receptor-alpha-dependent inhibition of endothelial cell proliferation and tumorigenesis. The Journal of biological chemistry* **282**, 17685–95 (2007).
94. *Yokoyama, Y. et al. Clofibrilic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligand, inhibits growth of human ovarian cancer. Molecular cancer therapeutics* **6**, 1379–86 (2007).
95. *Ramanan, S., Kooshki, M., Zhao, W., Hsu, F. & Mike, E. PPAR α ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF- κ B and AP-1 pathways. Free Radical Biology & Medicine* **45**, 1695–1704 (2009).

96. Gupta, R. a et al. *Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**, 13275–80 (2000).
97. Takayama, O. et al. *Expression of PPARdelta in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology*. British journal of cancer **95**, 889–95 (2006).
98. He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. *PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*. Cell **99**, 335–45 (1999).
99. Reed, K. R. et al. *PPARdelta status and Apc-mediated tumourigenesis in the mouse intestine*. Oncogene **23**, 8992–6 (2004).
100. Wu, K. K. & Liou, J.-Y. *Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis Via PPARdelta --> 14-3-3epsilon pathway*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **512**, 295–307 (2009).
101. Park, B. H., Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. *Genetic disruption of PPARdelta decreases the tumorigenicity of human colon cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 2598–603 (2001).
102. Gupta, R. A. et al. *Activation of nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated receptor-delta accelerates intestinal adenoma growth*. Nature medicine **10**, 245–7 (2004).
103. Ouyang, N., Williams, J. L. & Rigas, B. *NO-donating aspirin isomers downregulate peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)delta expression in APC(min/+) mice proportionally to their tumor inhibitory effect: Implications for the role of PPARdelta in carcinogenesis*. Carcinogenesis **27**, 232–9 (2006).
104. Shao, J., Sheng, H. & DuBois, R. N. *Peroxisome proliferator-activated receptors modulate K-Ras-mediated transformation of intestinal epithelial cells*. Cancer research **62**, 3282–8 (2002).
105. Daikoku, T. et al. *Extracellular signal-regulated kinase is a target of cyclooxygenase-1-peroxisome proliferator-activated receptor-delta signaling in epithelial ovarian cancer*. Cancer research **67**, 5285–92 (2007).
106. Glinghammar, B., Skogsberg, J., Hamsten, A. & Ehrenborg, E. *PPAR activation induces COX-2 gene expression and cell proliferation in human hepatocellular carcinoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications **308**, 361–368 (2003).

Bibliographie

107. Xu, L., Han, C., Lim, K. & Wu, T. *Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and cytosolic phospholipase A(2)alpha/cyclooxygenase-2/prostaglandin E(2) signaling pathways in human hepatocellular carcinoma cells.* *Cancer research* **66**, 11859–68 (2006).
108. Stephen, R. L. et al. *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta stimulates the proliferation of human breast and prostate cancer cell lines.* *Cancer research* **64**, 3162–70 (2004).
109. Yin, Y. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor delta and gamma agonists differentially alter tumor differentiation and progression during mammary carcinogenesis.* *Cancer research* **65**, 3950–7 (2005).
110. Wang, D. et al. *Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor delta and VEGF stimulates cancer progression.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19069–74 (2006).
111. Abdollahi, A. et al. *Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 12890–5 (2007).
112. Kwak, H. et al. *Modulation of transcription by the peroxisome proliferator-activated receptor delta--binding RNA aptamer in colon cancer cells.* *Molecular cancer therapeutics* **8**, 2664–73 (2009).
113. Marin, H. E. et al. *Ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor beta inhibits colon carcinogenesis.* *Cancer research* **66**, 4394–401 (2006).
114. Harman, F. S. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis.* *Nature medicine* **10**, 481–3 (2004).
115. Yang, L. et al. *Knockdown of peroxisome proliferator-activated receptor-beta induces less differentiation and enhances cell-fibronectin adhesion of colon cancer cells.* *Oncogene* **29**, 516–26 (2010).
116. Kim, D. J. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor beta (delta)-dependent regulation of ubiquitin C expression contributes to attenuation of skin carcinogenesis.* *The Journal of biological chemistry* **279**, 23719–27 (2004).
117. Di-Poi, N., Tan, N. S., Michalik, L., Wahli, W. & Desvergne, B. *Antiapoptotic role of PPARbeta in keratinocytes via transcriptional control of the Akt1 signaling pathway.* *Molecular cell* **10**, 721–33 (2002).

118. Sarraf, P. et al. *Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma*. *Nature medicine* **4**, 1046–52 (1998).
119. DuBois, R. N. et al. *The nuclear eicosanoid receptor, PPARgamma, is aberrantly expressed in colonic cancers*. *Carcinogenesis* **19**, 49–53 (1998).
120. Jansson, E. Å. et al. *The Wnt-βcatenin signaling pathway targets PPARγ activity in colon cancer cells*. **102**, 1–6 (2005).
121. Sabatino, L. et al. *UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression*. *Oncogene* **31**, 5061–5072 (2012).
122. Sarraf, P. et al. *Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer*. *Molecular cell* **3**, 799–804 (1999).
123. Ikezoe, T. et al. *Mutational analysis of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in human malignancies*. *Cancer research* **61**, 5307–10 (2001).
124. Saez, E. et al. *Activators of the nuclear receptor PPARgamma enhance colon polyp formation*. *Nature medicine* **4**, 1058–61 (1998).
125. McAlpine, C. a, Barak, Y., Matise, I. & Cormier, R. T. *Intestinal-specific PPARgamma deficiency enhances tumorigenesis in ApcMin/+ mice*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **119**, 2339–46 (2006).
126. Choi, I. K., Kim, Y. H., Kim, J. S. & Seo, J. H. *PPAR-gamma ligand promotes the growth of APC-mutated HT-29 human colon cancer cells in vitro and in vivo*. *Investigational new drugs* **26**, 283–8 (2008).
127. Dai, Y. et al. *Loss of XIAP sensitizes rosiglitazone-induced growth inhibition of colon cancer in vivo*. *International journal of cancer* **122**, 2858–63 (2008).
128. Osawa, E. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress colon carcinogenesis induced by azoxymethane in mice*. *Gastroenterology* **124**, 361–7 (2003).
129. Elrod, H. a & Sun, S.-Y. *PPARgamma and Apoptosis in Cancer*. *PPAR research* **2008**, 704165 (2008).
130. Rodway, H. A., Hunt, A. N., Kohler, J. A., Postle, A. D. & Lillycrop, K. A. *Lysophosphatidic acid attenuates the cytotoxic effects and degree of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induced by 15-deoxyDelta12,14-prostaglandin J2 in neuroblastoma cells*. *The Biochemical journal* **382**, 83–91 (2004).

Bibliographie

131. Cekanova, M., Lee, S.-H., McEntee, M. F. & Baek, S. J. *MCC-555-induced NAG-1 expression is mediated in part by KLF4*. *European journal of pharmacology* **637**, 30–7 (2010).
132. Chen, Z. Y. & Tseng, C.-C. *15-deoxy-Delta12,14 prostaglandin J2 up-regulates Kruppel-like factor 4 expression independently of peroxisome proliferator-activated receptor gamma by activating the mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase signal tra*. *Molecular pharmacology* **68**, 1203–13 (2005).
133. Chen, G. G. et al. *Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and Nf-kB in human colon cancer*. *Life Sciences* **70**, 2631–2646 (2002).
134. Cerbone, A. et al. *4-Hydroxynonenal and PPARgamma ligands affect proliferation, differentiation, and apoptosis in colon cancer cells*. *Free radical biology & medicine* **42**, 1661–70 (2007).
135. Lee, C. J. et al. *Pioglitazone, a synthetic ligand for PPARgamma, induces apoptosis in RB-deficient human colorectal cancer cells*. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **11**, 401–11 (2006).
136. Hazra, S. et al. *Pioglitazone and rosiglitazone decrease prostaglandin E2 in non-small-cell lung cancer cells by up-regulating 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase*. *Molecular pharmacology* **71**, 1715–20 (2007).
137. Gottfried, E. et al. *Pioglitazone modulates tumor cell metabolism and proliferation in multicellular tumor spheroids*. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **67**, 117–26 (2011).
138. Rageul, J. et al. *KLF4-dependent, PPARgamma-induced expression of GPA33 in colon cancer cell lines*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **125**, 2802–9 (2009).
139. Yoshizumi, T. et al. *Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects*. *International journal of oncology* **25**, 631–9 (2004).
140. Gupta, R. a et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and transforming growth factor-beta pathways inhibit intestinal epithelial cell growth by regulating levels of TSC-22*. *The Journal of biological chemistry* **278**, 7431–8 (2003).

141. Borbath, I., Leclercq, I., Moulin, P., Sempoux, C. & Horsmans, Y. *The PPARgamma agonist pioglitazone inhibits early neoplastic occurrence in the rat liver*. *European journal of cancer* **43**, 1755–63 (2007).
142. Chen, F. & Harrison, L. E. *Ciglitazone-induced cellular anti-proliferation increases p27kip1 protein levels through both increased transcriptional activity and inhibition of proteasome degradation*. *Cellular signalling* **17**, 809–16 (2005).
143. Chen, F., Kim, E., Wang, C.-C. & Harrison, L. E. *Ciglitazone-induced p27 gene transcriptional activity is mediated through Sp1 and is negatively regulated by the MAPK signaling pathway*. *Cellular signalling* **17**, 1572–7 (2005).
144. Kitamura, S. et al. *PPARgamma agonists inhibit cell growth and suppress the expression of cyclin D1 and EGF-like growth factors in ras-transformed rat intestinal epithelial cells*. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **94**, 335–42 (2001).
145. Ban, J. O. et al. *Suppression of NF-kappaB and GSK-3beta is involved in colon cancer cell growth inhibition by the PPAR agonist troglitazone*. *Chemico-biological interactions* **188**, 75–85 (2010).
146. Fujisawa, T. et al. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ (PPAR γ) Suppresses Colonic Epithelial Cell Turnover and Colon Carcinogenesis Through Inhibition of the β -Catenin / T Cell Factor (TCF) Pathway*. *Journal of Pharmacological Sciences* **106**, 627–638 (2008).
147. Lu, D. & Carson, D. *a Repression of beta-catenin signaling by PPAR gamma ligands*. *European journal of pharmacology* **636**, 198–202 (2010).
148. Toaldo, C. et al. *PPARgamma ligands inhibit telomerase activity and hTERT expression through modulation of the Myc/Mad/Max network in colon cancer cells*. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**, 1347–57 (2010).
149. Keshamouni, V. G. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer*. *Oncogene* **23**, 100–8 (2004).
150. Palakurthi, S. S., Aktas, H., Grubissich, L. M., Mortensen, R. M. & Halperin, J. A. *Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation*. *Cancer research* **61**, 6213–8 (2001).

Bibliographie

151. Kim, E., Chen, F., Wang, C.-C. & Harrison, L. E. *CDK5 is a novel regulatory protein in PPARgamma ligand-induced antiproliferation*. International journal of oncology **28**, 191–4 (2006).
152. Brockman, J. A., Gupta, R. A. & Dubois, R. N. *Activation of PPARgamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells*. Gastroenterology **115**, 1049–55 (1998).
153. Fajas, L. et al. *PPARgamma controls cell proliferation and apoptosis in an RB-dependent manner*. Oncogene **22**, 4186–93 (2003).
154. Altioek, S., Xu, M. & Spiegelman, B. M. *PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A*. Genes & development **11**, 1987–98 (1997).
155. Gupta, R. a, Brockman, J. a, Sarraf, P., Willson, T. M. & DuBois, R. N. *Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells*. The Journal of biological chemistry **276**, 29681–7 (2001).
156. Wei, S., Kulp, S. K. & Chen, C.-S. *Energy restriction as an antitumor target of thiazolidinediones*. The Journal of biological chemistry **285**, 9780–91 (2010).
157. Qin, C. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells*. Cancer research **63**, 958–64 (2003).
158. Jiang, S., Wang, W., Miner, J. & Fromm, M. *Cross Regulation of Sirtuin 1, AMPK, and PPARγ in Conjugated Linoleic Acid Treated Adipocytes*. PloS one **7**, e48874 (2012).
159. Yan, J. et al. *Autophagy augmented by troglitazone is independent of EGFR transactivation and correlated with AMP-activated protein kinase signaling*. Autophagy **6**, 67–73 (2010).
160. Cerquetti, L. et al. *Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells*. Experimental cell research **317**, 1397–410 (2011).
161. Lee, I. H. et al. *A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**, 3374–9 (2008).
162. Rajendran, R., Garva, R., Krstic-Demonacos, M. & Demonacos, C. *Sirtuins: molecular traffic lights in the crossroad of oxidative stress, chromatin remodeling, and transcription*. Journal of biomedicine & biotechnology **2011**, 368276 (2011).

163. Kitamura, S. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells*. Japanese journal of cancer research **90**, 75–80 (1999).
164. Kohno, H. et al. *Troglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, inhibits chemically-induced aberrant crypt foci in rats*. Japanese journal of cancer research : Gann **92**, 396–403 (2001).
165. Gupta, R. a et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated differentiation: a mutation in colon cancer cells reveals divergent and cell type-specific mechanisms*. The Journal of biological chemistry **278**, 22669–77 (2003).
166. Liu, X. et al. *Discovery and SAR of thiazolidine-2,4-dione analogues as insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) inhibitors via hierarchical virtual screening*. Journal of medicinal chemistry **53**, 2661–5 (2010).
167. Liu, K. et al. *3,5-Disubstituted-thiazolidine-2,4-dione analogs as anticancer agents: design, synthesis and biological characterization*. European journal of medicinal chemistry **47**, 125–37 (2012).
168. Han, S. & Roman, J. *Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways*. Molecular cancer therapeutics **5**, 430–7 (2006).
169. Patel, L. et al. *Tumor suppressor and anti-inflammatory actions of PPARgamma agonists are mediated via upregulation of PTEN*. Current biology **11**, 764–8 (2001).
170. Li, X. et al. *Troglitazone inhibits cell proliferation by attenuation of epidermal growth factor receptor signaling independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. Cell research **19**, 720–32 (2009).
171. Chen, A. & Xu, J. *Activation of PPAR{gamma} by curcumin inhibits Moser cell growth and mediates suppression of gene expression of cyclin D1 and EGFR*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **288**, G447–56 (2005).
172. Narala, V. R. et al. *Curcumin is not a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*. Gene therapy & molecular biology **13**, 20–25 (2009).
173. Ottanà, R. et al. *Identification of 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives endowed with dual activity as aldose reductase inhibitors and antioxidant agents for the treatment of diabetic complications*. European journal of medicinal chemistry **46**, 2797–806 (2011).

Bibliographie

174. Shen, D., Deng, C. & Zhang, M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells. *Postgraduate medical journal* **83**, 414–9 (2007).
175. Takano, S. et al. Pioglitazone, a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma acts as an inhibitor of colon cancer liver metastasis. *Anticancer research* **28**, 3593–9. (2008)
176. Papi, A., Rocchi, P., Ferreri, A. M. & Orlandi, M. RXRgamma and PPARgamma ligands in combination to inhibit proliferation and invasiveness in colon cancer cells. *Cancer letters* **297**, 65–74 (2010).
177. Richard, C. L. & Blay, J. Thiazolidinedione drugs down-regulate CXCR4 expression on human colorectal cancer cells in a peroxisome proliferator activated receptor gamma-dependent manner. *International journal of oncology* **30**, 1215–22 (2007).
178. Gros, S. J. et al. Involvement of CXCR4 chemokine receptor in metastatic HER2-positive esophageal cancer. *PloS one* **7**, e47287 (2012).
179. Xin, X., Yang, S., Kowalski, J. & Gerritsen, M. E. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands are potent inhibitors of angiogenesis in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* **274**, 9116–21 (1999).
180. Azuma, Y., Shinohara, M., Wang, P. L. & Ohura, K. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) inhibits IL-10 and IL-12 production by macrophages. *Biochemical and biophysical research communications* **283**, 344–6 (2001).
181. Panigrahy, D. et al. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* **110**, 923–32 (2002).
182. Dong, Y.-W., Wang, X.-P. & Wu, K. Suppression of pancreatic carcinoma growth by activating peroxisome proliferator-activated receptor gamma involves angiogenesis inhibition. *World journal of gastroenterology : WJG* **15**, 441–8 (2009).
183. Inoue, M. et al. Oxidized LDL regulates vascular endothelial growth factor expression in human macrophages and endothelial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 560–6 (2001).
184. Chintalgattu, V., Harris, G. S., Akula, S. M. & Katwa, L. C. PPAR-gamma agonists induce the expression of VEGF and its receptors in cultured cardiac myofibroblasts. *Cardiovascular research* **74**, 140–50 (2007).

185. Lu, J., Imamura, K., Nomura, S., Mafune, K. & Nakajima, A. *Chemopreventive Effect of Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ on Gastric Carcinogenesis in Mice*. *Cancer research* **65**, 4769–4774 (2005).
186. Takahashi, H. et al. *PPARgamma Ligand as a Promising Candidate for Colorectal Cancer Chemoprevention: A Pilot Study*. *PPAR research* **2010**, 1–4 (2010).
187. Chiu, C.-C. et al. *Increased risk of gastrointestinal malignancy in patients with diabetes mellitus and correlations with anti-diabetes drugs: a nationwide population-based study in Taiwan*. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* **52**, 939–46 (2013).
188. Kamata, H. & Hirata, H. *Redox regulation of cellular signalling*. *Cellular signalling* **11**, 1–14 (1999).
189. Gunasekar, P. G., Borowitz, J. L. & Isom, G. E. *Cyanide-induced generation of oxidative species: involvement of nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2*. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **285**, 236–41 (1998).
190. Daouphars, M. *Mécanismes d'action des AINS en relation avec la prolifération cellulaire et l'apoptose*. 215 (2004).
191. Babior, B. M. *NADPH oxidase: an update*. *Blood* **93**, 1464–76 (1999).
192. Bernardeau-Mozer, M. & Chaussade, S. *Inhibiteurs de la cyclo-oxygénase 2 et cancer colorectal*. *Bulletin du cancer* **91**, S89–S98 (2004).
193. Coant, N. et al. *NADPH oxidase 1 modulates WNT and NOTCH1 signaling to control the fate of proliferative progenitor cells in the colon*. *Molecular and cellular biology* **30**, 2636–50 (2010).
194. Liu, Y. et al. *Proline oxidase functions as a mitochondrial tumor suppressor in human cancers*. *Cancer research* **69**, 6414–22 (2009).
195. Angermüller, S., Islinger, M. & Völkl, A. *Peroxisomes and reactive oxygen species, a lasting challenge*. *Histochemistry and cell biology* **131**, 459–63 (2009).
196. Anderson, C. L., Iyer, S. S., Ziegler, T. R. & Jones, D. P. *Control of extracellular cysteine/cystine redox state by HT-29 cells is independent of cellular glutathione*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **293**, R1069–75 (2007).
197. Wu, G., Fang, Y., Yang, S., Lupton, J. R. & Turner, N. D. *Glutathione Metabolism and Its Implications for Health*. *J. Nutr* **134**, 489–492 (2004).

Bibliographie

198. Davis, W., Ronai, Z. & Tew, K. D. *Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **296**, 1–6 (2001).
199. Opara, E. C. *Oxidative stress*. Oxidative Stress **52**, 183–98 (2006).
200. Kim, H. et al. *Redox regulation of lipopolysaccharide-mediated sulfiredoxin induction, which depends on both AP-1 and Nrf2*. The Journal of biological chemistry **285**, 34419–28 (2010).
201. D'Autréaux, B. & Toledano, M. B. *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nature reviews. Molecular cell biology **8**, 813–24 (2007).
202. Hancock, J. T. *The role of redox mechanisms in cell signalling*. Molecular biotechnology **43**, 162–6 (2009).
203. Baker, L. M. S. et al. *Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine*. Journal of Biological Chemistry **282**, 31085–31093 (2007).
204. Fang, J., Seki, T. & Maeda, H. *Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation*. Advanced drug delivery reviews **61**, 290–302 (2009).
205. Liu, Z. & Lenardo, M. J. *Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases*. Developmental cell **12**, 484–5 (2007).
206. Xie, C.-M., Chan, W. Y., Yu, S., Zhao, J. & Cheng, C. H. K. *Bufalin induces autophagy-mediated cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation and JNK activation*. Free radical biology & medicine **51**, 1365–75 (2011).
207. Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. & Samali, A. *Cellular stress responses: cell survival and cell death*. International journal of cell biology **2010**, 1–23 (2010).
208. Ogura, T. et al. *Keap1 is a forked-stem dimer structure with two large spheres enclosing the intervening, double glycine repeat, and C-terminal domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**, 2842–7 (2010).
209. Loignon, M. et al. *Cul3 overexpression depletes Nrf2 in breast cancer and is associated with sensitivity to carcinogens, to oxidative stress, and to chemotherapy*. Molecular cancer therapeutics **8**, 2432–40 (2009).
210. Itoh, K., Tong, K. I. & Yamamoto, M. *Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles*. Free radical biology & medicine **36**, 1208–13 (2004).

211. Copple, I. M. et al. *Physical and functional interaction of sequestosome 1 with Keap1 regulates the Keap1-Nrf2 cell defense pathway*. The Journal of biological chemistry **285**, 16782–8 (2010).
212. Kaspar, J. W., Niture, S. K. & Jaiswal, A. K. *Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress*. Free radical biology & medicine **47**, 1304–9 (2009).
213. Gao, J., Kashfi, K., Liu, X. & Rigas, B. *NO-donating aspirin induces phase II enzymes in vitro and in vivo*. Carcinogenesis **27**, 803–10 (2006).
214. McMahon, M., Thomas, N., Itoh, K., Yamamoto, M. & Hayes, J. D. *Redox-regulated turnover of Nrf2 is determined by at least two separate protein domains, the redox-sensitive Neh2 degron and the redox-insensitive Neh6 degron*. The Journal of biological chemistry **279**, 31556–67 (2004).
215. Jaganjac, M. *Possible involvement of granulocyte oxidative burst in Nrf2 signaling in cancer*. The Indian journal of medical research **131**, 609–16 (2010).
216. Niture, S. K., Jain, a. K. & Jaiswal, a. K. *Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC- mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance*. Journal of Cell Science **123**, 1969–1969 (2010).
217. Nguyen, T., Nioi, P. & Pickett, C. B. *The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress*. The Journal of biological chemistry **284**, 13291–5 (2009).
218. Giudice, A., Arra, C. & Turco, M. C. *Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2-ARE signaling pathway by chemopreventive agents*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **647**, 37–74 (2010).
219. Cheng, X., Ku, C.-H. & Siow, R. C. M. *Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis*. Free radical biology & medicine **64**, 4–11 (2013).
220. Zhang, Z., Yang, X., Yuan, J., Sun, Z. & Li, Y. *Modulation of NRF2 and UGT1A expression by epigallocatechin-3-gallate in colon cancer cells and BALB/c mice*. Chin Med J **122**, 1660–1665 (2009).
221. Kensler, T. W. & Wakabayashi, N. *Nrf2: friend or foe for chemoprevention?* Carcinogenesis **31**, 90–9 (2010).
222. Khor, T. O. et al. *Nrf2-deficient mice have an increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis*. Cancer research **66**, 11580–4 (2006).

Bibliographie

223. Yu, S. et al. *Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice*. PloS one **5**, e8579 (2010).
224. Rao, V. A. et al. *The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitquinone*. The Journal of biological chemistry **285**, 34447–59 (2010).
225. Kim, D.-H. et al. *15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 upregulates the expression of heme oxygenase-1 and subsequently matrix metalloproteinase-1 in human breast cancer cells: possible roles of iron and ROS*. Carcinogenesis **30**, 645–54 (2009).
226. Akhdar, H. et al. *Involvement of Nrf2 activation in resistance to 5-fluorouracil in human colon cancer HT-29 cells*. European journal of cancer **45**, 2219–27 (2009).
227. Vomhof-Dekrey, E. E. & Picklo, M. J. *The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism*. The Journal of nutritional biochemistry **23**, 1201–6 (2012).
228. MacGarvey, N. C. et al. *Activation of mitochondrial biogenesis by heme oxygenase-1-mediated NF-E2-related factor-2 induction rescues mice from lethal Staphylococcus aureus sepsis*. American journal of respiratory and critical care medicine **185**, 851–61 (2012).
229. Athale, J. et al. *Nrf2 promotes alveolar mitochondrial biogenesis and resolution of lung injury in Staphylococcus aureus pneumonia in mice*. Free Radic Biol Med **53**, 1584–1594 (2012).
230. Piantadosi, C. A., Carraway, M. S., Babiker, A. & Suliman, H. B. *Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1*. Circulation research **103**, 1232–40 (2008).
231. Adamovich, Y. et al. *The protein level of PGC-1 α , a key metabolic regulator, is controlled by NADH-NQO1*. Molecular and cellular biology **33**, 2603–13 (2013).
232. Wagner, a E. et al. *A combination of lipoic acid plus coenzyme Q10 induces PGC1 α , a master switch of energy metabolism, improves stress response, and increases cellular glutathione levels in cultured C2C12 skeletal muscle cells*. Oxidative medicine and cellular longevity **2012**, 835970 (2012).
233. Viña, J. et al. *Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing*. Advanced drug delivery reviews **61**, 1369–74 (2009).

234. Tufekci, K. U., Civi Bayin, E., Genc, S. & Genc, K. *The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. Parkinson's disease* **2011**, 314082 (2011).
235. Whitman, S. a, Long, M., Wondrak, G. T., Zheng, H. & Zhang, D. D. *Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy. Experimental cell research* **319**, 2673–83 (2013).
236. von Otter, M. et al. *Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. BMC medical genetics* **11**, 36 (2010).
237. Jiang, M., Jerome, W. G. & Hayward, S. W. *Autophagy in nuclear receptor PPAR γ -deficient mouse prostatic carcinogenesis. Autophagy* **6**, 175–176 (2010).
238. Kurtoglu, M., Philips, K., Liu, H., Boise, L. H. & Lampidis, T. J. *High endoplasmic reticulum activity renders multiple myeloma cells hypersensitive to mitochondrial inhibitors. Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **66**, 129–140 (2010).
239. Atarod, E. B. & Kehrer, J. P. *Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines. Free radical biology & medicine* **37**, 36–47 (2004).
240. Jiao, H. & Zhao, B. *Cytotoxic effect of peroxisome proliferator fenofibrate on human HepG2 hepatoma cell line and relevant mechanisms. Toxicology and applied pharmacology* **185**, 172–9 (2002).
241. Nishimura, J. et al. *Role of Nrf2 and oxidative stress on fenofibrate-induced hepatocarcinogenesis in rats. Toxicological sciences* **106**, 339–49 (2008).
242. Bécuwe, P., Bianchi, A., Keller, J. M. & Dauça, M. *Effects of the peroxisome proliferator clofibric acid on superoxide dismutase expression in the human HepG2 hepatoma cell line. Biochemical pharmacology* **58**, 1025–33 (1999).
243. Cernuda-Morollón, E., Rodríguez-Pascual, F., Klatt, P., Lamas, S. & Pérez-Sala, D. *PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NF-kappaB: implications for mesangial cell activation by cytokines. Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**, 2223–31 (2002).
244. Collins, A. R. et al. *Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. Circulation research* **104**, e42–54 (2009).
245. Park, E. Y., Cho, I. J. & Kim, S. G. *Transactivation of the PPAR-responsive enhancer module in chemopreventive glutathione S-transferase gene by the peroxisome*

Bibliographie

- proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor heterodimer*. *Cancer research* **64**, 3701–13 (2004).
246. Wang, X. et al. *Double antioxidant activities of rosiglitazone against high glucose-induced oxidative stress in hepatocyte*. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* **25**, 839–47 (2011).
247. Krönke, G. et al. *Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors*. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**, 1276–82 (2007).
248. Cho, H.-Y., Reddy, S. P., Debiase, A., Yamamoto, M. & Kleeberger, S. R. *Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury*. *Free radical biology & medicine* **38**, 325–43 (2005).
249. Cho, H.-Y. et al. *Nrf2-regulated PPAR{gamma} expression is critical to protection against acute lung injury in mice*. *American journal of respiratory and critical care medicine* **182**, 170–82 (2010).
250. Huang, J., Tabbi-Anneni, I., Gunda, V. & Wang, L. *Transcription factor Nrf2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism*. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **299**, G1211–21 (2010).
251. Ding, G. et al. *Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage*. *Cardiovascular research* **76**, 269–79 (2007).
252. Chung, S. S. et al. *Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells*. *Molecular and cellular biology* **29**, 20–30 (2009).
253. Vandewalle, B. et al. *PPARgamma-dependent and -independent effects of rosiglitazone on lipotoxic human pancreatic islets*. *Biochemical and biophysical research communications* **366**, 1096–101 (2008).
254. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J. & Glass, C. K. *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. *Nature* **391**, 79–82 (1998).
255. Zhang, F. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress iNOS expression induced by LPS in rat primary Schwann cells*. *Journal of neuroimmunology* **218**, 36–47 (2010).

256. Petrova, T. V., Akama, K. T. & Van Eldik, L. J. Cyclopentenone prostaglandins suppress activation of microglia: down-regulation of inducible nitric-oxide synthase by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4668–73 (1999).
257. Chan, S. H. H., Wu, K. L. H., Kung, P. S. S. & Chan, J. Y. H. Oral intake of rosiglitazone promotes a central antihypertensive effect via upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and alleviation of oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **55**, 1444–53 (2010).
258. Zhao, Y., Patzer, A., Herdegen, T., Gohlke, P. & Culman, J. Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 1162–75 (2006).
259. Collino, M. et al. Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion. *European journal of pharmacology* **530**, 70–80 (2006).
260. Aleshin, S., Grabeklis, S., Hanck, T., Sergeeva, M. & Reiser, G. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma positively controls and PPARalpha negatively controls cyclooxygenase-2 expression in rat brain astrocytes through a convergence on PPARbeta/delta via mutual control of PPAR expression levels. *Molecular pharmacology* **76**, 414–24 (2009).
261. Kim, E.-H. et al. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces COX-2 expression through Akt-driven AP-1 activation in human breast cancer cells: a potential role of ROS. *Carcinogenesis* **29**, 688–95 (2008).
262. Okuno, Y. et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. *Endocrine journal* **57**, 303–9 (2010).
263. Chen, Z.-H. et al. Induction of adaptive response and enhancement of PC12 cell tolerance by 7-hydroxycholesterol and 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 through up-regulation of cellular glutathione via different mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **281**, 14440–5 (2006).

Bibliographie

264. *Levonen, A. L. et al. Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **21**, 1846–51 (2001).
265. *Gong, P. et al. Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2. Antioxidants & redox signaling* **4**, 249–57 (2002).
266. *Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T. & Uchida, K. Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. The Journal of biological chemistry* **276**, 12076–83 (2001).
267. *Soller, M., Dro, S., Brandt, U., Bru, B. & Knethen, A. V. Mechanism of Thiazolidinedione-Dependent Cell Death in Jurkat T Cells. Molecular Pharmacology* **71**, 1535–1544 (2007).
268. *Lennon, A. M., Ramaugé, M., Dessouroux, A. & Pierre, M. MAP kinase cascades are activated in astrocytes and preadipocytes by 15-deoxy-Delta(12-14)-prostaglandin J(2) and the thiazolidinedione ciglitazone through peroxisome proliferator activator receptor gamma-independent mechanisms involving reactive oxygenat. The Journal of biological chemistry* **277**, 29681–5 (2002).
269. *Kim, K. Y., Ahn, J. H. & Cheon, H. G. Apoptotic action of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation in human non small-cell lung cancer is mediated via proline oxidase-induced reactive oxygen species formation. Molecular pharmacology* **72**, 674–85 (2007).
270. *Pandhare, J., Cooper, S. K. & Phang, J. M. Proline oxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone: evidence for both peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent and -independent mechanisms. The Journal of biological chemistry* **281**, 2044–52 (2006).
271. *Song, N. et al. Multidrug Resistance-Associated Protein 1 Mediates 15-Deoxy-Δ12,14-prostaglandin J2-Induced Expression of Glutamate Cysteine Ligase Expression via Nrf2 Signaling in Human Breast Cancer Cells. Chemical Research in Toxicology* **24**, 1231–1241 (2011).
272. *Paumi, C. M., Smitherman, P. K., Townsend, A. J. & Morrow, C. S. Glutathione S-transferases (GSTs) inhibit transcriptional activation by the peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) ligand, 15-deoxy-delta 12,14prostaglandin J2 (15-d-PGJ2). Biochemistry* **43**, 2345–52 (2004).

273. Alvarez-Sanchez, R., Montavon, F., Hartung, T. & Pähler, A. Thiazolidinedione bioactivation: a comparison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemical research in toxicology* **19**, 1106–16 (2006).
274. Baughman, T. M. et al. Metabolic activation of pioglitazone identified from rat and human liver microsomes and freshly isolated hepatocytes. *Drug metabolism and disposition* **33**, 733–8 (2005).
275. Havrylyuk, D. et al. Synthesis and anticancer activity evaluation of 4-thiazolidinones containing benzothiazole moiety. *European journal of medicinal chemistry* **45**, 5012–21 (2010).
276. George, R. F. Stereoselective synthesis and QSAR study of cytotoxic 2-(4-oxo-thiazolidin-2-ylidene)-2-cyano-N-arylacetamides. *European journal of medicinal chemistry* **47**, 377–86 (2012).
277. Wang, S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. *European journal of medicinal chemistry* **46**, 3509–18 (2011).
278. Wang, S. et al. Synthesis and anticancer activity of Indolin-2-one derivatives bearing the 4-thiazolidinone moiety. *Archiv der Pharmazie* **345**, 73–80 (2012).
279. Li, W. et al. Design, synthesis and evaluation of novel rhodanine-containing sorafenib analogs as potential antitumor agents. *Archiv der Pharmazie* **344**, 349–57 (2011).
280. Russell, A. J. et al. Selective small molecule inhibitors of the potential breast cancer marker, human arylamine N-acetyltransferase 1, and its murine homologue, mouse arylamine N-acetyltransferase 2. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17**, 905–18 (2009).
281. Ottanà, R. et al. 5-Arylidene-2-phenylimino-4-thiazolidinones as PTP1B and LMW-PTP inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry* **17**, 1928–37 (2009).
282. Bhattarai, B. R. et al. Thiazolidinedione derivatives as PTP1B inhibitors with antihyperglycemic and antiobesity effects. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **19**, 6161–5 (2009).
283. Kamel, M. M., Ali, H. I., Anwar, M. M., Mohamed, N. A. & Soliman, A. M. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel sulfonamide-Schiff's bases,

Bibliographie

- thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives*. European journal of medicinal chemistry **45**, 572–80 (2010).
284. Teraishi, F. et al. *P-glycoprotein-independent apoptosis induction by a novel synthetic compound, MMPT [5-[(4-methylphenyl)methylene]-2-(phenylamino)-4(5H)-thiazolone]*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics **314**, 355–62 (2005).
285. Panico, A. M. et al. *Heteroarylimino-4-thiazolidinones as inhibitors of cartilage degradation*. Bioorganic chemistry **39**, 48–52 (2011).
286. Ottanà, R. et al. *Synthesis and in vitro evaluation of 5-arylidene-3-hydroxyalkyl-2-phenylimino-4-thiazolidinones with antidegenerative activity on human chondrocyte cultures*. Bioorganic & medicinal chemistry **15**, 7618–25 (2007).
287. Eleftheriou, P. et al. *Fragment-based design, docking, synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of 2-benzo/benzisothiazolimino-5-arylidene-4-thiazolidinones as cyclooxygenase/lipoxygenase inhibitors*. European journal of medicinal chemistry **47**, 111–24 (2012).
288. Unsal-Tan, O., Ozadali, K., Piskin, K. & Balkan, A. *Molecular modeling, synthesis and screening of some new 4-thiazolidinone derivatives with promising selective COX-2 inhibitory activity*. European journal of medicinal chemistry **57**, 59–64 (2012).
289. Ottanà, R. et al. *In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones. Part I*. Bioorganic & medicinal chemistry letters **15**, 3930–3 (2005).
290. Cassin, M., Colella, G., De, M. S. & Grugni, M. *Use of thiazolidinone derivatives as antiangiogenic agents*. Cell Therapeutics Europe S.R.L. WO2006066846. (2006).
291. Dayam, R. et al. *Discovery of small molecule integrin $\alpha v \beta 3$ antagonists as novel anticancer agents*. Journal of medicinal chemistry **49**, 4526–34 (2006).
292. Rane, R. A., Sahu, N. U. & Shah, C. P. *Synthesis and antibiofilm activity of marine natural product-based 4-thiazolidinones derivatives*. Bioorganic & medicinal chemistry letters **22**, 7131–4 (2012).
293. Aridoss, G., Amirthaganesan, S., Kim, M. S., Kim, J. T. & Jeong, Y. T. *Synthesis, spectral and biological evaluation of some new thiazolidinones and thiazoles based on t-3-alkyl-r-2,c-6-diarylpiperidin-4-ones*. European journal of medicinal chemistry **44**, 4199–210 (2009).

294. El Bialy, S. A., Nagy, M. M. & Abdel-Rahman, H. M. Efficient regioselective three-component domino synthesis of 3-(1,2,4-Triazol-5-yl)-1,3-thiazolidin-4-ones as potent antifungal and antituberculosis agents. *Archiv der Pharmazie* **344**, 821–9 (2011).
295. El-Gaby, M. S. A., El-Hag Ali, G. A. M., El-Maghraby, A. A., Abd El-Rahman, M. T. & Helal, M. H. M. Synthesis, characterization and in vitro antimicrobial activity of novel 2-thioxo-4-thiazolidinones and 4,4'-bis(2-thioxo-4-thiazolidinone-3-yl)diphenylsulfones. *European journal of medicinal chemistry* **44**, 4148–52 (2009).
296. Balzarini, J., Orzeszko-Krzesińska, B., Maurin, J. K. & Orzeszko, A. Synthesis and anti-HIV studies of 2- and 3-adamantyl-substituted thiazolidin-4-ones. *European journal of medicinal chemistry* **44**, 303–11 (2009).
297. Verma, A. & Saraf, S. K. 4-thiazolidinone--a biologically active scaffold. *European journal of medicinal chemistry* **43**, 897–905 (2008).
298. Agarwal, A., Lata, S., Saxena, K. K., Srivastava, V. K. & Kumar, A. Synthesis and anticonvulsant activity of some potential thiazolidinonyl 2-oxo/thiobarbituric acids. *European journal of medicinal chemistry* **41**, 1223–9 (2006).
299. Lockman, J. W. et al. Oxindole derivatives as inhibitors of TAK1 kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 1724–7 (2011).
300. Suzuki, Y., Akima, M. & Tamura, K. Effects of CP-060S, a novel cardioprotective drug, on cardiac function and myocardial oxygen consumption. *General pharmacology* **32**, 57–63 (1999).
301. Chandra, J. N. N. S., Malviya, M., Sadashiva, C. T., Subhash, M. N. & Rangappa, K. S. Effect of novel arecoline thiazolidinones as muscarinic receptor 1 agonist in Alzheimer's dementia models. *Neurochemistry international* **52**, 376–83 (2008).
302. Maccari, R. et al. In vitro evaluation of 5-arylidene-2-thioxo-4-thiazolidinones active as aldose reductase inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **21**, 200–3 (2011).
303. Dakin, L. et al. *Chemical compounds 251*. Astrazeneca AB. WO2010/001169. (2010).
304. Müller-Esterl, W. *Biochimie et Biologie moléculaire*. 625 (2007).
305. D'Alessandro, A. & Zolla, L. Metabolomics and cancer drug discovery: let the cells do the talking. *Drug discovery today* **00**, 1–7 (2011).
306. Buchakjian, M. R. & Kornbluth, S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 715–27 (2010).

Bibliographie

307. Rabinowitz, J. D. & White, E. *Autophagy and metabolism*. Science (New York, N.Y.) **330**, 1344–8 (2010).
308. Krüger, A. & Ralser, M. *ATM is a redox sensor linking genome stability and carbon metabolism*. Science signaling **4**, pe17 (2011).
309. Vamecq, J. et al. *PPARs: Interference with Warburg' Effect and Clinical Anticancer Trials*. PPAR research **2012**, 304760 (2012).
310. Costello, L. C. & Franklin, R. B. “*Why do tumour cells glycolyse?*”: from glycolysis through citrate to lipogenesis. Molecular and cellular biochemistry **280**, 1–8 (2005).
311. DeBerardinis, R. J. et al. *Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 19345–50 (2007).
312. Langbein, S. et al. *Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted*. British journal of cancer **94**, 578–85 (2006).
313. Weljie, A. M. & Jirik, F. R. *Hypoxia-induced metabolic shifts in cancer cells: Moving beyond the Warburg effect*. The international journal of biochemistry & cell biology **43**, 981–9 (2011).
314. Bratslavsky, G., Sudarshan, S., Neckers, L. & Linehan, W. M. *Pseudohypoxic pathways in renal cell carcinoma*. Clinical cancer research **13**, 4667–71 (2007).
315. Salnikow, K. et al. *Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress*. The Journal of biological chemistry **279**, 40337–44 (2004).
316. Hervouet, E. et al. *HIF and reactive oxygen species regulate oxidative phosphorylation in cancer*. Carcinogenesis **29**, 1528–37 (2008).
317. Jin, W. et al. *Regulation of hypoxia inducible factor-1 α expression by the alteration of redox status in HepG2 cells*. Journal of experimental & clinical cancer research **30**, 61 (2011).
318. Saxena, S., Shukla, D. & Bansal, A. *Augmentation of aerobic respiration and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by hypoxia preconditioning with cobalt chloride*. Toxicology and applied pharmacology **264**, 324–34 (2012).
319. Morris, B. J. *Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging*. Free Radical Biology and Medicine **1–39** (2012).

320. Massimi, M. et al. *Effects of resveratrol on HepG2 cells as revealed by 1 H-NMR based metabolic profiling*. *Biochimica et biophysica acta* **1820**, 1–8 (2012).
321. Hu, W. et al. *Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7455–60 (2010).
322. Puzio-Kuter, A. M. *The Role of p53 in Metabolic Regulation*. *Genes & cancer* **2**, 385–91 (2011).
323. Pedersen, P. L. *Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **39**, 211–22 (2007).
324. Levine, A. J. & Puzio-Kuter, A. M. *The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes*. *Science* **330**, 1340–4 (2010).
325. Zhou, J. et al. *Activation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) suppresses hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) signaling in cancer cells*. *The Journal of biological chemistry* (2012).
326. Narravula, S. & Colgan, S. P. *Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression During Hypoxia*. *The Journal of Immunology* **166**, 7543–7548 (2001).
327. Laurenti, G. et al. *Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and lipid metabolism peroxisomal enzymes in human glioblastoma cells*. *Journal of cellular biochemistry* **112**, 3891–901 (2011).
328. Galzio, R. et al. *Hypoxia modulation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human glioblastoma stem cells. Implications for therapy*. *Journal of cellular biochemistry* **113**, 3342–52 (2012).
329. Lee, W. H. & Kim, S. G. *AMPK-Dependent Metabolic Regulation by PPAR Agonists*. *PPAR research* **2010**, (2010).
330. Roberts, L. D. et al. *The contrasting roles of PPAR δ and PPAR γ in regulating the metabolic switch between oxidation and storage of fats in white adipose tissue*. *Genome biology* **12**, R75 (2011).
331. Jeong, E. et al. *PPAR δ deficiency disrupts hypoxia-mediated tumorigenic potential of colon cancer cells*. *Molecular carcinogenesis* (2014).

Bibliographie

332. *el Azzouzi, H. et al. The hypoxia-inducible microRNA cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation. Cell metabolism* **18**, 341–54 (2013).
333. *Avena, P. et al. Compartment-specific activation of PPAR γ governs breast cancer tumor growth, via metabolic reprogramming and symbiosis. Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **12**, 1360–70 (2013).
334. *Pino, E., Wang, H., McDonald, M. E., Qiang, L. & Farmer, S. R. Roles for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and PPAR γ coactivators 1 α and 1 β in regulating response of white and brown adipocytes to hypoxia. The Journal of biological chemistry* **287**, 18351–8 (2012).
335. *Zhao, Y.-Z. et al. Hypoxia induces peroxisome proliferator-activated receptor γ expression via HIF-1-dependent mechanisms in HepG2 cell line. Archives of biochemistry and biophysics* **543**, 40–7 (2014).
336. *Lu, X. et al. Hypoxia downregulates PPAR γ via an ERK1/2-NF- κ B-Nox4-dependent mechanism in human pulmonary artery smooth muscle cells. Free radical biology & medicine* **63**, 151–60 (2013).
337. *Gong, K. et al. Hypoxia induces downregulation of PPAR- γ in isolated pulmonary arterial smooth muscle cells and in rat lung via transforming growth factor- β signaling. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **301**, L899–907 (2011).
338. *Evans, R. M., Barish, G. D. & Wang, Y.-X. PPARs and the complex journey to obesity. Nature medicine* **10**, 355–61 (2004).
339. *Brown, M. S. & Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. Cell* **89**, 331–40 (1997).
340. *Watkins, S. M., Reifsnyder, P. R., Pan, H., German, J. B. & Leiter, E. H. Lipid metabolome-wide effects of the PPAR γ agonist rosiglitazone. Journal of lipid research* **43**, 1809–17 (2002).
341. *Hallakou, S. et al. Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat. Diabetes* **46**, 1393–9 (1997).
342. *Scatena, R. et al. Mitochondrial respiratory chain dysfunction, a non-receptor-mediated effect of synthetic PPAR-ligands: biochemical and pharmacological*

- implications*. Biochemical and biophysical research communications **319**, 967–73 (2004).
343. Scatena, R. et al. *Mitochondria, ciglitazone and liver: a neglected interaction in biochemical pharmacology*. European journal of pharmacology **567**, 50–8 (2007).
344. Scatena, R., Martorana, G. E., Bottoni, P. & Giardina, B. *Mitochondrial dysfunction by synthetic ligands of peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)*. IUBMB life **56**, 477–82 (2004).
345. LeBrasseur, N. K. et al. *Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues*. American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **291**, E175–81 (2006).
346. Coletta, D. K. et al. *Pioglitazone stimulates AMP-activated protein kinase signalling and increases the expression of genes involved in adiponectin signalling, mitochondrial function and fat oxidation in human skeletal muscle in vivo: a randomised trial*. Diabetologia **52**, 723–32 (2009).
347. Saha, A. K. et al. *Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo*. Biochemical and biophysical research communications **314**, 580–5 (2004).
348. Fryer, L. G. D., Parbu-Patel, A. & Carling, D. *The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways*. The Journal of biological chemistry **277**, 25226–32 (2002).
349. Srivastava, N. et al. *Inhibition of Cancer Cell Proliferation by PPAR γ Is Mediated by a Metabolic Switch that Increases Reactive Oxygen Species Levels*. Cell Metabolism **20**, 650–61 (2014).
350. Huber, S., Valente, S., Chaimbault, P. & Schohn, H. *Evaluation of Δ^2 -pioglitazone, an analogue of pioglitazone, on colon cancer cell survival: Evidence of drug treatment association with autophagy and activation of the Nrf2/Keap1 pathway*. International journal of oncology **45**, 426–38 (2014).
351. REVELANT, G. *Conception, Synthèse et Evaluation Biologique d'Hétéroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones à activité anti-cancéreuse potentielle*. (2012).
352. Lewicki, K. et al. *Development of a fluorescence-based microtiter plate method for the measurement of glutathione in yeast*. Talanta **70**, 876–82 (2006).
353. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. **193**, 265–275 (1951).

Bibliographie

354. Shimada, T., Kojima, K., Yoshiura, K., Hiraishi, H. & Terano, A. Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* **50**, 658–64 (2002).
355. Yen, C.-C. et al. Cytotoxic effects of 15d-PGJ2 against osteosarcoma through ROS-mediated AKT and cell cycle inhibition. *Oncotarget* **5**, 716–25 (2014).
356. Zhou, J. et al. PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **41**, 2334–42 (2009).
357. Shimizu, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature cell biology* **6**, 1221–8 (2004).
358. Miranda, S. et al. Beneficial effects of fenofibrate in retinal pigment epithelium by the modulation of stress and survival signaling under diabetic conditions. *Journal of cellular physiology* **227**, 2352–62 (2012).
359. Pérez-Ortiz, J. M., Tranque, P., Burgos, M., Vaquero, C. F. & Llopis, J. Glitazones Induce Astrogloma Cell Death by Releasing Reactive Oxygen Species from Mitochondria : Modulation of Cytotoxicity by Nitric Oxide. *Molecular Pharmacology* **72**, 407–417 (2007).
360. Narayanan, P. K. et al. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **52**, 28–35 (2003).
361. Cianchi, F. et al. Cyclooxygenase-2 Activation Mediates the Proangiogenic Effect of Nitric Oxide in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* **10**, 2694–2704 (2004).
362. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B. & Apanasets, O. Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease. *Biochimica et biophysica acta* **1822**, 1363–73 (2012).
363. Paukkeri, E.-L. et al. PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages. *British journal of pharmacology* **152**, 1081–91 (2007).
364. Li, C.-Q. et al. Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14547–51 (2009).
365. Cho, H.-Y. et al. Nrf2-regulated PPAR{gamma} expression is critical to protection against acute lung injury in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine* **182**, 170–82 (2010).

366. Huang, J., Tabbi-Anneni, I., Gunda, V. & Wang, L. *Transcription factor Nrf2 regulates SHP and lipogenic gene expression in hepatic lipid metabolism*. American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology **299**, G1211–21 (2010).
367. Ferguson, H. E. et al. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands induce heme oxygenase-1 in lung fibroblasts by a PPARgamma-independent, glutathione-dependent mechanism*. American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology **297**, L912–9 (2009).
368. Elbirt, K. K. & Bonkovsky, H. L. *Heme oxygenase: recent advances in understanding its regulation and role*. Proceedings of the Association of American Physicians **111**, 438–47(1999).
369. Boettler, U. et al. *Coffee constituents as modulators of Nrf2 nuclear translocation and ARE (EpRE)-dependent gene expression*. The Journal of nutritional biochemistry **22**, 426–40 (2011).
370. Arlt, A. et al. *Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity*. Oncogene **32**, 4825–35 (2013).
371. Maher, J. M. et al. *Nrf2- and PPAR alpha-mediated regulation of hepatic Mrp transporters after exposure to perfluorooctanoic acid and perfluorodecanoic acid*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **106**, 319–28 (2008).
372. Knight, T. R., Choudhuri, S. & Klaassen, C. D. *Induction of hepatic glutathione S-transferases in male mice by prototypes of various classes of microsomal enzyme inducers*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology **106**, 329–38 (2008).
373. Yates, M. S. et al. *Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice*. Carcinogenesis **30**, 1024–31 (2009).
374. Xie, T. & Jaiswal, A. K. *AP-2-mediated regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene expression*. Biochemical pharmacology **51**, 771–8 (1996).
375. Wu, J. et al. *Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of PI3K-AKT and Nrf2 signaling*. Food and chemical

Bibliographie

- toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association **64**, 307–13 (2014).
376. Kim, H. R. et al. *CDC25B phosphatase inhibitors; side effect reduction; Vilsmeier-Haack reaction; alkenylation reaction of thiazolo-2,4-dione; methenylation reaction using acetophenone derivative*. Korea Research Institute of Chemical Technology. WO2006/101307. (2010).
377. Viry, E. et al. *Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases*. International Journal of Oncology **38**, 1103–1111 (2011).
378. Sibille, E. et al. *Development of a matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry screening test to evidence reversible and irreversible inhibitors of CDC25 phosphatases*. Analytical biochemistry **430**, 83–91 (2012).
379. Fiatte, C. *Impact des agonistes de PPARgamma sur l'adhérence et la migration des cellules colorectales humaines HT29*. Université P. Verlaine- Metz. (2008).
380. Ye, D. et al. *Novel thiophene derivatives as PTP1B inhibitors with selectivity and cellular activity*. Bioorganic & medicinal chemistry **18**, 1773–82 (2010).

Publications

Evaluation of $\Delta 2$ -pioglitazone, an analogue of pioglitazone, on colon cancer cell survival: Evidence of drug treatment association with autophagy and activation of the Nrf2/Keap1 pathway

SOPHIE HUBER¹, SERGIO VALENTE¹, PATRICK CHAIMBAULT² and HERVÉ SCHOHN¹

¹University of Lorraine, CNRS Unit 7565 - SRSMC Campus Bridoux, F-57070 Metz; ²University of Lorraine, EA 4632 - Laboratory of Chemistry and Physics - A2MC, F-57078 Metz Cedex 3, France

Received January 15, 2014; Accepted March 6, 2014

DOI: 10.3892/ijo.2014.2408

Abstract. Thiazolidinediones have been shown to exhibit anti-proliferative effects against cancer cells derived from diverse tissue origins both *in vivo* and *in vitro*. We studied the anti-proliferative impact of 5-{4-(2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethoxy)-benzylidene}-thiazolidine-2,4-dione ($\Delta 2$ -pioglitazone), an analogue of pioglitazone, which binds to the nuclear peroxisome proliferator activated receptor- γ without activating it, on human adenocarcinoma-derived HT29 and HCT116 cells. In HCT116 cells, exposure to $\Delta 2$ -pioglitazone reduced cell growth, but HT29 cells reached the plateau phase of growth after three days. $\Delta 2$ -pioglitazone treatment did not trigger cells to enter apoptosis but enhanced the autophagy process.

The effect of $\Delta 2$ -pioglitazone treatment was related to the increase of oxygen and nitric oxide-derived species production and decreased glutathione content. Moreover, pre-treatment with an antioxidant before addition of $\Delta 2$ -pioglitazone limited cell growth inhibition, reduced the production of reactive species and attenuated autophagy within the cells. The impact of the drug was associated with activation of the Nrf2/Keap1 pathway as demonstrated by the increased protein content of several antioxidant enzymes, notably heme-oxygenase-1.

Introduction

Pioglitazone (Pio) belongs to the thiazolidinedione family (TZD), a class of drugs used in the oral treatment of type 2 diabetes mellitus (Fig. 1). TZDs exert a hypoglycaemic effect by improving insulin sensitivity. These molecules act primarily by decreasing insulin resistance in adipose tissue and muscle, allowing the control of glucose metabolism by this hormone in patients (1). Pio is a potent and selective ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ). The transcription factor forms a heterodimer with the 9-*cis*-retinoic acid receptor. The complexes, upon activation by each respective ligand, bind onto DNA response element localised on the promoter of PPAR γ target genes and modulate the transcription rate of respective genes (2).

Using either cancer-derived cells from diverse origins or animal models, it has been clearly shown that TZD treatment both *in vitro* and *in vivo* leads to cell growth inhibition or tumour development arrest (2,3). However, the effects of these molecules are, in part, unrelated to PPAR γ activation. PPAR γ -independent effects have been reported also for the prostanoid 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (Δ PGJ2) referred to as the endogenous ligand of PPAR γ . As an example, Δ PGJ2 binds to I κ B inhibiting the NF κ B signalling pathway (4). Several reports have demonstrated that TZD or Δ PGJ2 treatment enhances the production of ROS or RNS either by PPAR γ -dependent or independent activation (5,6). The production of reactive species by both mechanisms triggers cells to enter apoptosis. The production of ROS or RNS within cells induces also the activation of diverse transduction pathways, notably the NF-2E related factor 2/Kelch

Correspondence to: Dr Hervé Schohn, University of Lorraine, CNRS Unit 7565 - SRSMC Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, F-57070 Metz, France
E-mail: herve.schohn@univ-lorraine.fr

Abbreviations: BSO, L-buthionine-(S-R) sulfoximine; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; DAF-2DA, 4,5-diaminofluoresceine diacetate; DCF-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's minimum essential medium; DPBS, Dulbecco's phosphate-buffered saline; GAPDH, glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase; GCL, glutamyl-cysteine ligase; GSTpi, glutathione-S-transferase pi; HO-1, heme oxygenase-1; Keap1, Kelch like-ECH-associated protein 1; NAC, N-acetyl cysteine; NQO1, NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1; Pio, pioglitazone, 5-{4-(2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethoxy)-benzylidene}-thiazolidine-2,4-dione; Δ Pio, $\Delta 2$ -pioglitazone, 5-{4-(2-(5-ethyl-pyridin-2-yl)-ethoxy)-benzylidene}-thiazolidine-2,4-dione; Δ PGJ2, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂; MTT, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; iNOS, inductive NO synthase; Nrf2, NF-2E related factor 2; PARP-1, poly(ADP-ribose) polymerase-1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen-derived species; Trx, thioredoxin; TZD, thiazolidinedione

Key words: $\Delta 2$ -pioglitazone, pioglitazone, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, oxidative stress, Nrf2/Keap1 pathway, colon cancer

like-ECH-associated protein 1 (Nrf2/Keap1) pathway (7). On the other hand, diverse anticancer drugs, mainly electrophile molecules, activate the pathway by Michaelis addition on critical cysteine residues in Keap1, which disrupts the complex Nrf2/Keap1 leading to the stabilization of Nrf2. Among these molecules, Δ PGJ2, the endogenous ligand of PPAR γ , activates the Nrf2/Keap1 pathway (8).

Inhibition of cell proliferation by independent PPAR γ activation was demonstrated using PPAR γ ^{-/-} mouse embryonic stem cells treated by the cognate ligand (9). Using siRNA, knockdown of PPAR γ does not affect the ability of TZD to induce apoptotic death (6). PPAR γ inactive analogues of TZDs were also synthesized by introducing a double bond adjoining the terminal thiazolidine-2,4-dione ring, resulting in the $\Delta 2$ -analogue of the corresponding TZD. These analogues were developed in order to discriminate PPAR γ -dependent from -independent effects of TZDs since the $\Delta 2$ -TZDs have no PPAR γ activating action. Among them, $\Delta 2$ -troglitazone has a similar action on prostate carcinoma cell growth as the parent molecule (10).

Herein, we evaluated the potential of Δ Pio as an anticancer drug on human colon adenocarcinoma-derived colon HT29 and HCT116 cells. The results obtained were compared to those obtained with Pio. We studied the cellular modifications occurring within colorectal cells, *i.e.* mediated-stress cell responses after cell exposure to each drug,

Materials and methods

Chemicals. Pioglitazone was purchased from Interchim (Montluçon, France). Δ PGJ2 was from Cayman Chemicals (Bertin, Montigny le Bretonneux, France). 2'-7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCF-DA) was provided by Accros Organics (Halluin, France), acridine orange, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), propidium iodide, GSH, 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF2-DA), ortho-phthalaldehyde (OPA), L-buthionine sulfoximine (BSO) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier France). Rabbit antibodies against caspase-3 (1087-1), GCL (5529-1), HO-1 (1922-1), NQO1 (S2173), PARP (1078-1), Beclin-1 (2026-1), lamin A/C (3770-1) were purchased from Epitomics (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Mouse monoclonal antibodies against GAPDH (MAB374) were purchased from Millipore (Mosheim, France). Human GSTPi (F-6), human Nrf2 (H-300) and human Trx (which recognize Trx1 and 2 isoforms; 1H6H6) antibodies were from Santa Cruz Biotechnologies (Perray en Yvelines, France). Mouse or rabbit HRP-conjugated second antibodies were purchased from Santa Cruz Technologies. RNase A (from bovine pancreas) was from Euromedex. Other chemicals were of analytical grade.

$\Delta 2$ -pioglitazone synthesis. $\Delta 2$ -pioglitazone was synthesized according to the procedure of Sohda *et al.* (11), except for the first step of condensation which was described by Deguest *et al.* (12).

Cell culture

General conditions. HT29 and HCT116 cells were grown in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM, Eurobio,

Courtaboeuf, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated (30 min at 56°C) fetal calf serum (Eurobio), 50 μ g/ml gentamycin (Invitrogen, Paisley, UK) and 2 mM L-glutamine (Eurobio). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere in the presence of 5% CO₂. Seeding was 10⁵ cells/ml in all experiments, with the exception of the MTT procedure. Medium was changed daily 48 h after seeding.

Assessment of drug cytotoxicity. Δ Pio cytotoxicity was assessed by the MTT procedure. Cells were seeded at 10⁴ cells/well in 96-well plates and treated with increasing concentrations of Δ Pio (0-100 μ M) for 72 h. The stock solution of Δ Pio was 50 mM in DMSO. Dilutions of the drug were performed in DMSO prior to addition in the cell medium. Control cells were treated with 0.1% (v/v) of DMSO, used as a molecule diluent. MTT (0.5 mg/ml) was prepared in medium containing fetal calf serum, and 100 μ l/well was added, and each plate was incubated for 2 h at 37°C. Formazan precipitate was dissolved in DMSO and absorbance at 540 nm was read.

Impact of the drug on colorectal cell growth. Cell growth kinetics with Δ Pio (50 μ M) or Pio (50 μ M) were established for HT29 and HCT116 cells. Cells were seeded in 6-well plates and treated for 4 days. Control cells were treated with 0.1% (v/v) of DMSO. Then, cells were harvested by trypsinization [0.02% (w/v) trypsin/2 mM EDTA solution, Eurobio], and 100 μ l of cell suspension was mixed to an equal volume of 0.04% (v/v) trypan blue solution prepared with Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Eurobio) and living cells were counted using a Malassez hematometer. Cell growth was also tested with Δ Pio or Pio together with 1 mM ascorbic acid for three days. Cells were harvested and counted. Results are expressed as the ratio of treated cells versus control cells cultivated with vehicle (mitotic index).

Cell cycle distribution. HT29 or HCT116 cells were seeded in 6-well plates. Forty-eight hours after seeding, cells were exposed to each drug for 24 h. Cell layers were washed twice with DPBS, harvested by trypsinization and fixed in 70% (v/v) ethanol solution for 2 h and stored at -20°C. Cells were then centrifuged at 1,000 g for 5 min at 4°C, washed with DPBS and centrifuged again. Pellets were suspended in 500 μ l DPBS containing 50 μ g/ml propidium iodide, 20 μ g/ml of RNase A and 0.1% (v/v) Triton X-100 for 20 min and analysed by FACS (FL2A; FACSCalibur, BD Sciences, Le Pont de Claix, France). Results were quantified using the CellQuest software (BD Sciences) and cell cycle distribution was analysed using Modfit software (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

Clonogenic assay. Anchorage-dependent clonogenic assay was performed in 6-well plates. Cells were seeded at 1,000 cells/well in complete medium. Δ Pio or Pio were added to cell suspensions after seeding. Cells were left to grow for 7 days. Cell clones were then washed twice with DPBS and fixed in 70% (v/v) cold-ethanol for 15 min. They were washed twice with DPBS before adding 1% (v/v) toluidine blue solution diluted in DPBS for 15 min and washed with DPBS. Images were captured with Geldoc (Bio-Rad, Marne la Coquette, France).

Quantification of oxygen and nitric oxide-derived species. Two days after seeding, cells were treated with Δ Pio or Pio for various times up to 24 h. Cells were loaded with 50 μ M DCF-DA for 15 min or 1 μ M DAF-2DA for 30 min at 37°C. After incubation, cells were harvested by trypsination, washed with DPBS and finally suspended in 1 ml of the same buffer. Fluorescence was measured in 30,000 cells/sample by flow cytometry with excitation and emission settings, at 488 and 530/30 nm (FL1). In addition, 5 mM N-acetyl cysteine or 1 mM ascorbic acid, as antioxidant, was added to the medium 1 h before drug treatment. Production of reactive species from mitochondria was assessed also in the presence or absence of the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). Cells were treated with each drug and 50 mM CCCP was added for 15 min at 37°C. Cells were loaded with 50 μ M DCF-DA for 15 min and they were prepared for FACS analysis. Data from control (DMSO-treated cells) and drug-treated cells were compared. Results are expressed relative to those obtained from control cells taken as 100.

GSH content determination. Intracellular GSH levels were determined by an HPLC method described by Lenton *et al* (13) with slight modifications using a C18-Thermo Hypersil column (Fisher Scientific, Illkirch, France) and 1.5 mM ortho-phthalaldehyde. Cells were grown in 25 cm²-flasks. Briefly, 48 h after seeding, cells were exposed to 50 μ M Pio, 50 μ M Δ Pio or 3 μ M Δ PGJ2 for various times, up to 24 h. When used, antioxidant was added 1 h before drug treatment. Cell layers were washed three times with ice-cold DPBS, then suspended with 10% (v/v) perchloric acid ice-cold solution/2 mM EDTA, pH 8.0. The homogenates were centrifuged at 15000 g for 15 min at 4°C. The supernatant were stored at -80°C until HPLC analysis. Perchloric acid-precipitated proteins (pellets) were solubilized in daily prepared 1 M NaOH prior to protein content determination. GSH contents were calculated as nanomole of GSH/mg of protein. Data from DMSO-treated cells (control cells) and treated cells were compared and they are expressed relative to those obtained from control cells, taken as 100.

Western blotting. Cells were seeded in 25 cm²-flasks. Total protein homogenates were prepared from drug- and DMSO-treated cells as followed: cell layers were washed twice with ice-cold DPBS and they were scrapped with 25 mM HEPES/KOH, pH 7.5 containing 10 mM EDTA, 400 mM KCl, 0.5% (v/v) Igepal, 1 mM DTT and 0.1% (v/v) of a protease inhibitor mixture (Sigma). Homogenates were collected and left on ice for 30 min before centrifugation at 15,000 g for 15 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C until use. Nuclear and cytoplasmic protein extracts were obtained from drug and DMSO-treated cells grown in 90-mm dishes. Cell layers were washed twice in cold DPBS and scrapped gently in DPBS. The suspension obtained was centrifuged at 1,000 g for 2 min at 4°C. The cell pellet was mixed with an equal volume of 10 mM HEPES/KOH, pH 7.5 containing 60 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5% (v/v) Igepal and 0.1% (v/v) of a protease inhibitor mixture, and left on ice for 5 min. The sample was centrifuged at 1,000 g for 5 min at 4°C. The supernatant, which correspond to the cytoplasmic fraction, was further centrifuged for 15 min at 15,000 g and at 4°C and the pellet discarded. The cyto-

plasmic fractions were stored at -80°C. The pellet obtained after the initial centrifugation was suspended with HEPES/KOH buffer without detergent and centrifuged at 8,000 g for 2 min at 4°C. This step was repeated at least three times. After washing, each pellet was suspended in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 600 mM KCl, 1 mM DTT and 0.1% (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma). They were left on ice for 15 min, vortexed every 5 min and then centrifuged at 15,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant corresponded to the nuclear fraction and each sample was stored at -80°C until use.

Protein (25 μ g) from whole cell homogenates or 20 μ g of protein from nuclear or cytoplasmic fractions were resolved in 10-15% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes. The saturation step was performed in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.15 M NaCl, 5% (w/v) non-fat milk and 0.01% (v/v) Tween-20. The antibody solutions were prepared in the same buffer and incubated overnight at 4°C by gentle agitation. Washing steps (3 times for 5 min) were performed with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 0.15 M NaCl and 0.01% (v/v) Tween-20. The blots were then incubated in this buffer containing the diluted second antibody (horseradish peroxidase conjugated to goat anti-rabbit (1:7,500) or anti-mouse (1:7,500), Santa Cruz Technologies), and finally washed 3 times for 5 min with the same buffer. Blots were developed by chemiluminescence detection according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Technologies).

Detection of autophagy process. HT29 and HCT116 cells were seeded in 6-well plates and treated as described above for 1-3 days with daily medium changes. In parallel, HT29 cells were treated with 500 μ M of hydrogen peroxide used as an inducer of autophagy. Cells were incubated with 1 μ g/ml acridine orange for 15 min, then harvested by trypsination and suspended in DPBS before FACS analysis. Fluorescence was measured in 30,000 cells/sample, with excitation at 488 nm and emission settings at 670 nm (FL3). Results were analysed using CellQuest and Cyflogic software and they were compared to those obtained with DMSO-treated cells, taken as 1.0. In parallel, cells were treated with each drug in the presence or absence of 5 mM NAC over three days. Total protein homogenates were prepared and western blots were performed as described, using Beclin-1 (1:1,000) and GAPDH (1:10,000) antibodies, respectively, as a marker of autophagosome formation and an internal marker for protein loading.

Statistical analyses. Differences between results from control (DMSO-treated cells) and treated cells were analysed by Student's t-test and any difference was considered significant at P<0.05.

Results

Impact of Δ 2-pioglitazone on human colon adenocarcinoma cell growth. In a first set of experiments, we assessed whether Δ Pio was efficient in inhibiting colon cancer-derived cell growth since the molecule had little effect on prostate carcinoma cells (10). Δ Pio cytotoxicity was estimated by the MTT procedure and the trypan blue coloration method. The IC₅₀ was, respectively, 53.7 \pm 2.8 and 46.2 \pm 2.4 μ M in HT29 and HCT116 cells. We established cell growth kinetics for

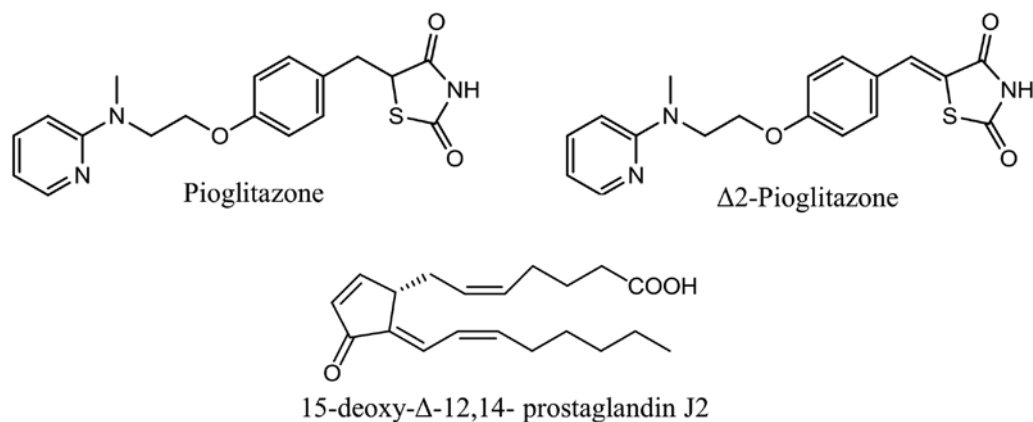


Figure 1. Structure of the molecules used in the study. $\Delta 2$ -pioglitazone differs from pioglitazone by the presence of a double bound adjoining the thiazolidine-2,4-dione ring.

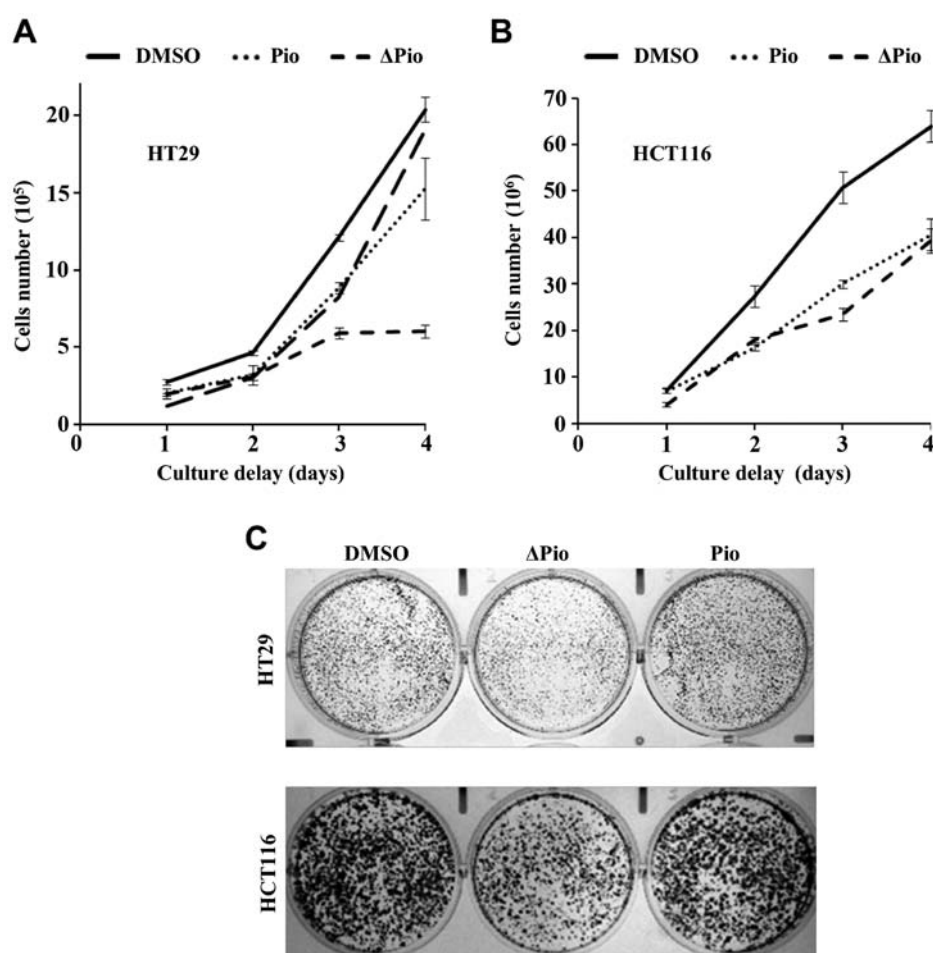


Figure 2. Cell growth kinetics with colorectal cells treated with $\Delta 2$ -pioglitazone. (A and B) Colorectal cell growth curves were established for the treated HT29 (A) or HCT116 (B) cells four days after seeding. Cells were treated with 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) or 50 μ M pioglitazone (Pio). * $P < 0.05$, relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. (C) Anchorage-dependent clonogenic assays were performed as described in Materials and methods. The results shown represent one out of three independent experiments.

HT29 and HCT116 cells treated with 50 μ M Δ Pio over four days; the results were compared to those obtained after cell exposure to 50 μ M Pio (Fig. 2A). HT29 cells in the presence of Δ Pio reached the plateau phase of growth after three days of treatment. In contrast, cell growth was decreased up

to 35% at the end of the experiment when HT29 cells were treated in the presence of Pio (Fig. 2A). A 40%-decrease was obtained when HCT116 cells were exposed to each molecule, but the effect of Δ Pio, previously found in HT29 cells, was not observed with these cells (Fig. 2B). Anchorage-dependent

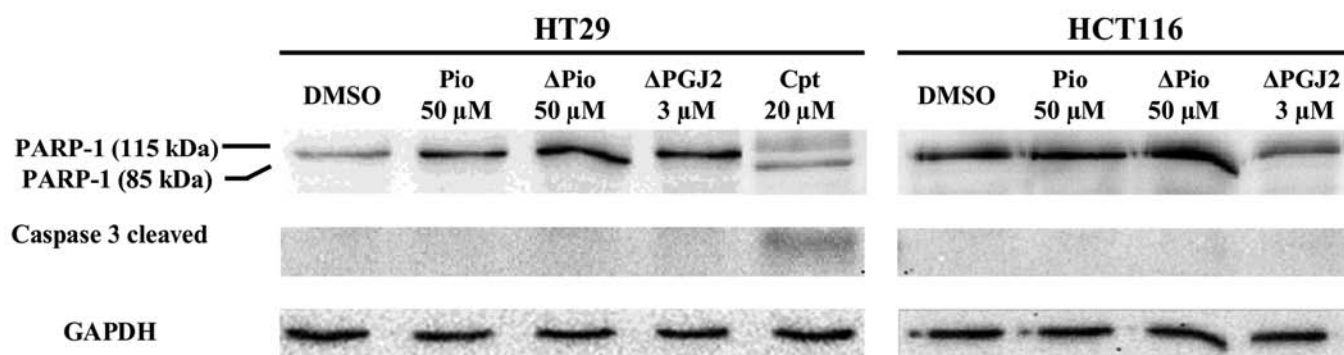


Figure 3. Effect of $\Delta 2$ -pioglitazone on cell growth arrest. Western blotting was performed with protein homogenates (25 μ g) prepared from HT29 or HCT116 cells exposed for 48 h to 50 μ M pioglitazone (Pio), 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio), 3 μ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (Δ PGJ2) or 0.1% (v/v) DMSO used as diluent of each drug. Blots were incubated with diluted antibodies against human PARP (1:1,000) and caspase-3 (1:1,000). Activation of caspase-3 (cleaved Casp3) and cleavage of PARP 115/85 (cleaved PARP at 85 kDa) was achieved by exposure of HT29 cells to 20 μ M camptothecin for 48 h (Cpt), used as a positive control. Mouse anti-human GAPDH antibody (1:10,000) was used as a marker of sample loading. The results represent one out of three independent experiments.

Table I. Cell distribution in cell cycle phases after 24-h drug treatment.

Treatment	G0/G1	S	G2/M
HT29			
Control [0.1% (v/v) DMSO]	55.3 \pm 3.7	24.0 \pm 2.9	20.8 \pm 5.6
$\Delta 2$ -pioglitazone (50 μ M)	67.0 \pm 2.5 ^a	21.6 \pm 2.3	11.4 \pm 3.4 ^a
Pioglitazone (50 μ M)	52.7 \pm 1.5	29.1 \pm 2.0 ^a	18.1 \pm 2.6
HCT116			
Control [0.1% (v/v) DMSO]	37.1 \pm 2.3	30.9 \pm 0.9	32.0 \pm 2.6
$\Delta 2$ -pioglitazone (50 μ M)	41.2 \pm 2.2 ^a	30.1 \pm 2.6	28.6 \pm 1.5 ^a
Pioglitazone (50 μ M)	36.2 \pm 2.6	37.4 \pm 4.6 ^a	26.3 \pm 4.1 ^a

^aP<0.05 relative to control cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

assays were performed with both cell lines (Fig. 2C) and the results obtained confirmed the higher anti-proliferative property of Δ Pio. The impact of Δ Pio treatment on cell growth was associated with the alteration of cell distribution in cell cycle phases. Cell exposure to this drug resulted in cell accumulation in G0/G1-phase, whereas Pio treatment enhanced cell distribution in S-phase (Table I). However, HT29 or HCT116 cell growth arrests were not associated with apoptosis cell death. As shown in Fig. 3, neither caspase-3 activation nor PARP-1 cleavage was found in protein homogenates prepared from Δ Pio or Pio-treated cells. In contrast, protein cleavage was obtained when HT29 cells were treated for two days in the presence of 20 μ M camptothecin used as an inducer of apoptosis.

Reactive species production and GSH depletion in $\Delta 2$ -pioglitazone treated cells. Several lines of evidence demonstrated that cell exposure to TZD generated oxidative stress which dramatically impacted cell survival (14). We tested whether Δ Pio treatment involved the production of ROS and RNS in colorectal cells. Fluorescent probes, *i.e.* DCF-DA and

DAF-2DA for ROS and RNS detection, respectively, were used to quantify any changes in the levels of reactive species after HT29 cell exposure to Δ Pio over 24 h. ROS levels reached a peak 15 min after drug treatment (Fig. 4A). ROS levels were markedly increased with the maximum reached at 8 h and it decreased slightly over 24 h (Fig. 4B). Similarly, we evaluated ROS level after cell exposure to Pio. In Pio-treated cells, ROS level stayed constant over two hours, then decreased to a level lower than ROS content in DMSO-treated cells (Fig. 4B). When HCT116 cells were tested, ROS levels were increased after a 10-min drug treatment (Fig. 4C), but they stayed mostly constant over the experimental duration whatever the molecule tested (Fig. 4D). Since mitochondria are the main source of radical species and notably superoxide anion radical, colorectal cells were treated in the presence of CCCP together with Δ Pio and Pio then loaded with DCF-DA (Table II). CCCP pre-treatment inhibited mostly Pio or Δ Pio-mediated production of ROS in HCT116 cells and to a lesser extent in HT29 cells, supporting the finding that part of the redox alteration was associated with the mitochondria. Moreover, pre-treatment with ascorbic acid or NAC (as antioxidants) prevented or limited the formation of reactive species in colorectal cells (Table II). When cells were treated over three days with Δ Pio or Pio together with 1 mM ascorbic acid, cell growth was partially restored, suggesting that cell growth arrest was associated to the production of excessive ROS (Fig. 5A and B, respectively). We used ascorbic acid instead of NAC since we observed that 5 mM NAC treatment inhibited cell growth as reported by others (15). Using DAF-2DA, we demonstrated that RNS were present within HT29 cells. The production reached a maximum after 6 h and stayed constant thereafter (Fig. 6). Of note, the effect of Δ Pio on RNS production was greater than Pio treatment in HT29. RNS production was increased in HCT116 cells exposed to each molecule after 2 h, but RNS levels stayed almost constant over the experiment duration (Fig. 6B). The results obtained were associated with the increase of iNOS level in both cell lines (Fig. 6C). In fact, HCT116 cells expressed iNOS constitutively whereas the expression of iNOS is inducible in HT29 cells. Nevertheless, our results suggested that RNS were produced in our cell

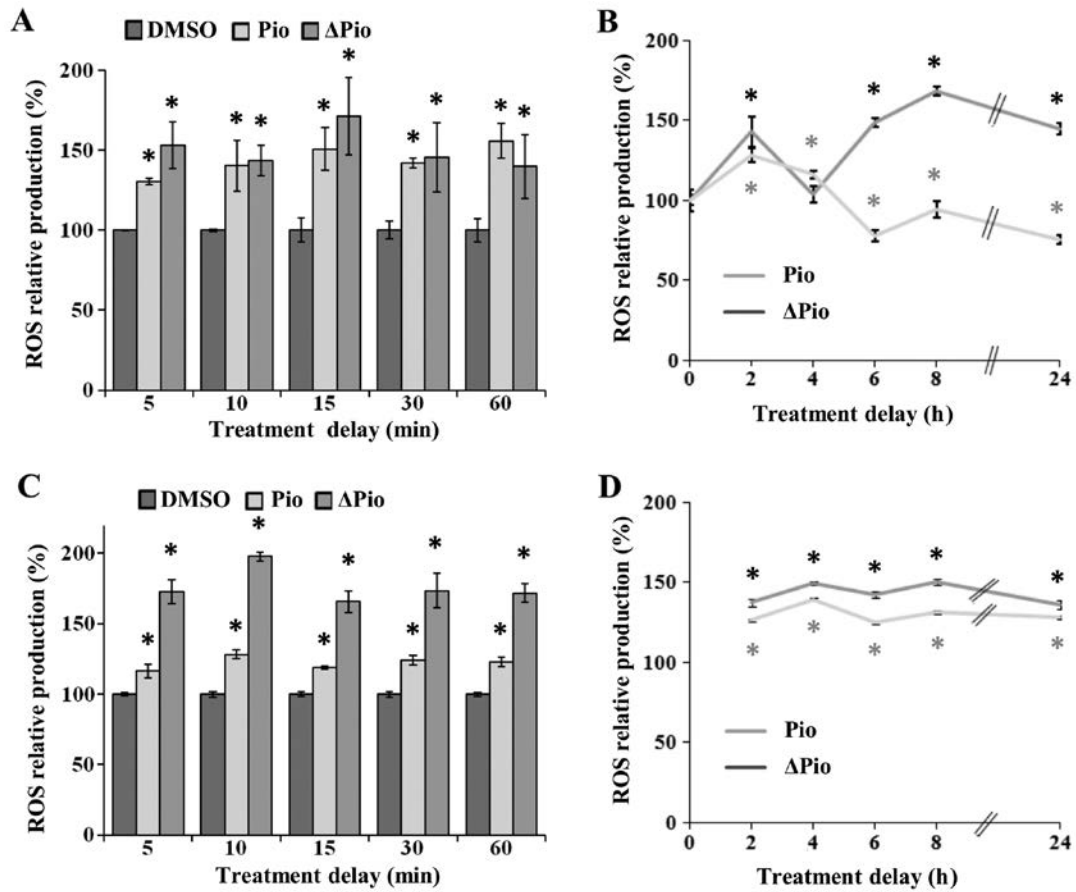


Figure 4. Reactive oxygen-derived species in cell treated with $\Delta 2$ -pioglitazone (A-D) HT29 (A and B) or HCT116 cells (C and D) were exposed to 50 μM $\Delta 2$ -pioglitazone (ΔPio) and 50 μM pioglitazone (Pio) for various times up to 24 h. ROS productions were quantified after cell loading with DCF-DA. * $P < 0.05$, relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

Table II. Impact of antioxidants and CCCP on ROS production.

Treatment	HT29	HCT116
Control [0.1% (v/v) DMSO]	100.0 \pm 9.2	100.0 \pm 2.8
Δ -pioglitazone (50 μM)	171.8 \pm 6.0 ^a	171.8 \pm 6.0 ^a
Δ -pioglitazone (50 μM) + N-acetyl cysteine (5 mM)	117.1 \pm 9.0 ^b	134.5 \pm 3.2 ^b
Δ -pioglitazone (50 μM) + ascorbic acid (1 mM)	123.4 \pm 9.0 ^b	139.5 \pm 2.6 ^b
Pioglitazone (50 μM)	152.0 \pm 4.2 ^a	122.0 \pm 4.2 ^a
Pioglitazone (50 μM) + N-acetyl cysteine (5 mM)	95.7 \pm 9.4 ^b	94.4 \pm 4.5 ^b
Pioglitazone (50 μM) + ascorbic acid (50 μM)	103.2 \pm 2.7 ^b	97.5 \pm 5.4 ^b
Control (0.1% (v/v) DMSO)	100.0 \pm 2.5	100.0 \pm 1.7
Δ -pioglitazone (50 μM)	159.3 \pm 2.2 ^a	159.4 \pm 6.6 ^a
CCCP (50 mM) + Δ -pioglitazone (50 μM)	139.3 \pm 2.6 ^b	117.4 \pm 3.6 ^b
Pioglitazone (50 μM)	139.2 \pm 2.9 ^a	126.7 \pm 1.4 ^a
CCCP (50 mM) + pioglitazone (50 μM)	108.4 \pm 1.6 ^b	94.3 \pm 4.5 ^b

^a $P < 0.05$ relative to control DMSO-treated cells (Student's t-test); ^b $P < 0.05$ relative to ΔPio or Pio-treated cells (Student's t-test); results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

models. The production of an excess of reactive species has been associated to the depletion of intracellular GSH content (14). As demonstrated in Fig. 7, GSH level was decreased in

a time-dependent manner over 24 h. They were estimated at 30-50% when colorectal cells were treated with ΔPio or Pio for 24 h (Fig. 7A and 7B), respectively.

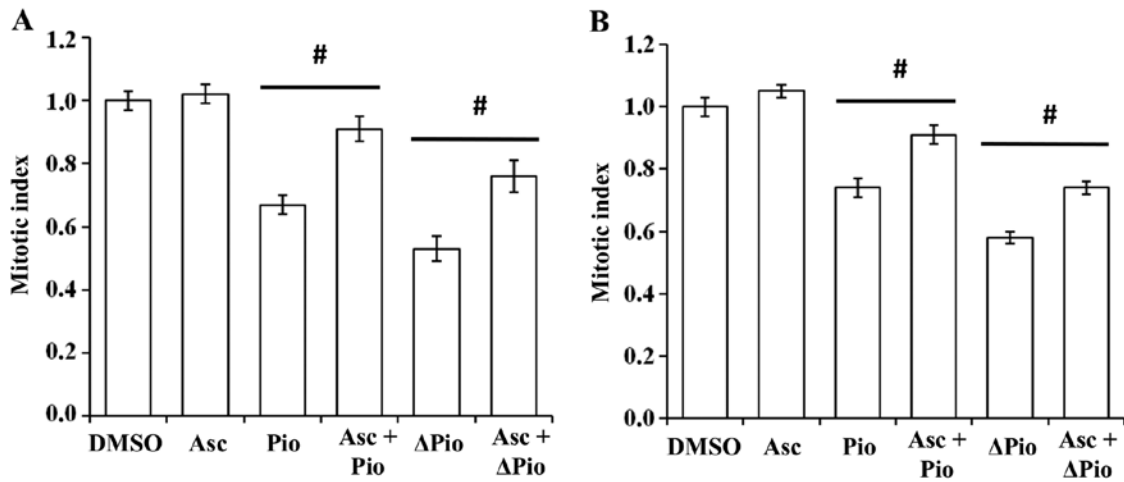


Figure 5. Effect of ascorbic acid pre-treatment on $\Delta 2$ -pioglitazone-mediated cell growth inhibition. HT29 (A) or HCT116 cells (B) were treated in the presence of 1 mM ascorbic acid before addition of 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) or 50 μ M pioglitazone (Pio) for three days. Cells were harvested and counted. *P<0.05, relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate numerations from three independent experiments.

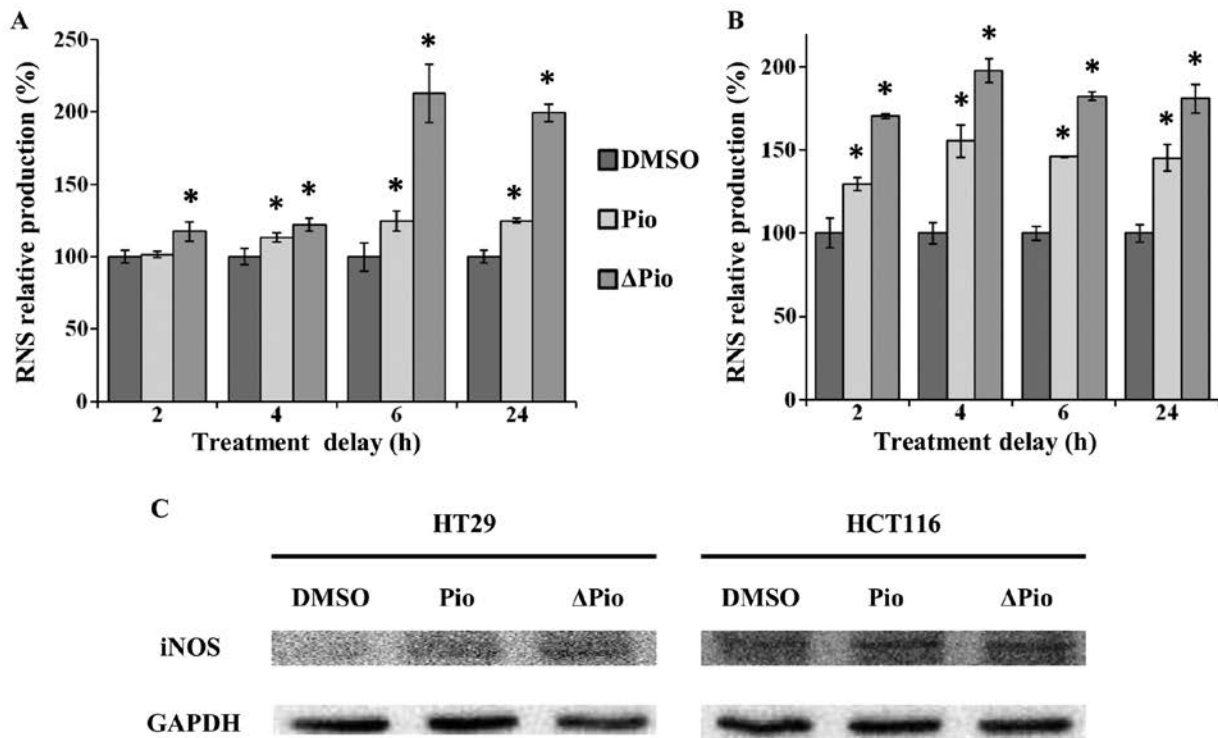


Figure 6. Reactive nitric oxide derived species in cells exposed to $\Delta 2$ -pioglitazone. (A and B) RNS production was quantified after cell loading with DAF-2DA in HT29 (A) and HCT116 cells (B) exposed to 50 μ M pioglitazone (Pio) and 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) for various times up to 24 h. *P<0.05 relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments. (C) Western blotting was performed with protein homogenates (25 μ g) prepared from HT29 or HCT116 cells exposed for 24 h to 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) and 50 μ M pioglitazone (Pio) or 0.1% (v/v) DMSO used as diluent of each drug. Blots were incubated with diluted antibodies against human iNOS (1:500). Mouse anti-human GAPDH antibody (1:10,000) was used as a marker of sample loading. The results represent one out of three independent experiments.

Induction of autophagy process. Among the mechanisms related to the generation of oxidative stress and involved in cell growth arrest or survival, we studied whether Δ Pio treatment could induce autophagy. The formation of acidic vesicles was analysed by acridine orange red-fluorescence detection by FACS (Fig. 8A and B). The increase of red-fluorescence due to the acidic vesicles was time-dependent and Δ Pio treatment had a greater effect as compared to cells exposed to Pio. Beclin-1,

a marker of autophagosome formation, was induced after cell exposure to Δ Pio or Pio for 3 days whatever the cell line tested (Fig. 8C and D). Treatment with Δ Pio had a more pronounced effect when compared to cells exposed to Pio. NAC pre-treatment lowered Beclin-1 expression confirming that autophagy was associated to drug-mediated oxidative stress in both cell lines (Fig. 8E and F). However, NAC treatment did not rescue completely the effect of Δ Pio over three days.

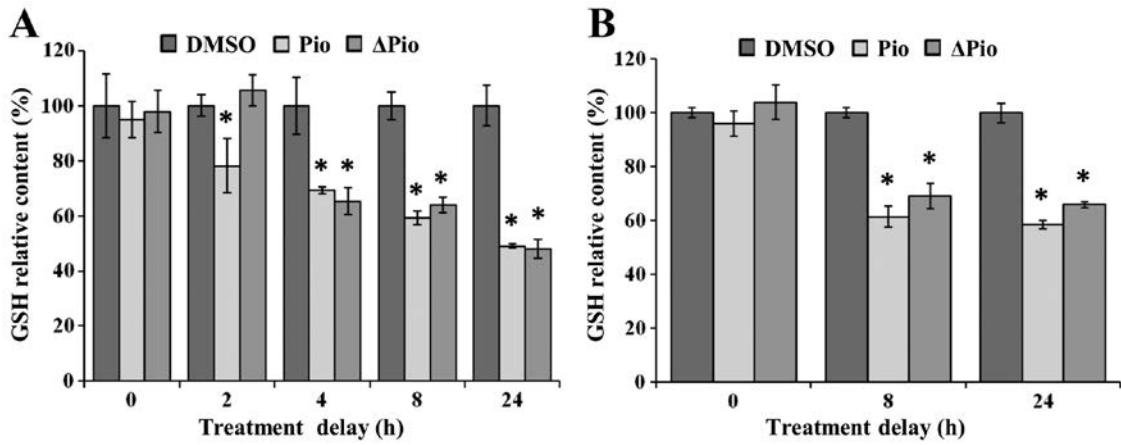


Figure 7. Intracellular glutathione content in colorectal cells during $\Delta 2$ -pioglitazone treatment. (A and B) Time course of intracellular glutathione (GSH) content during HT29 (A) or HCT116 (B) cell exposure to 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) or 50 μ M pioglitazone (Pio) over 24 h. *P<0.05 relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

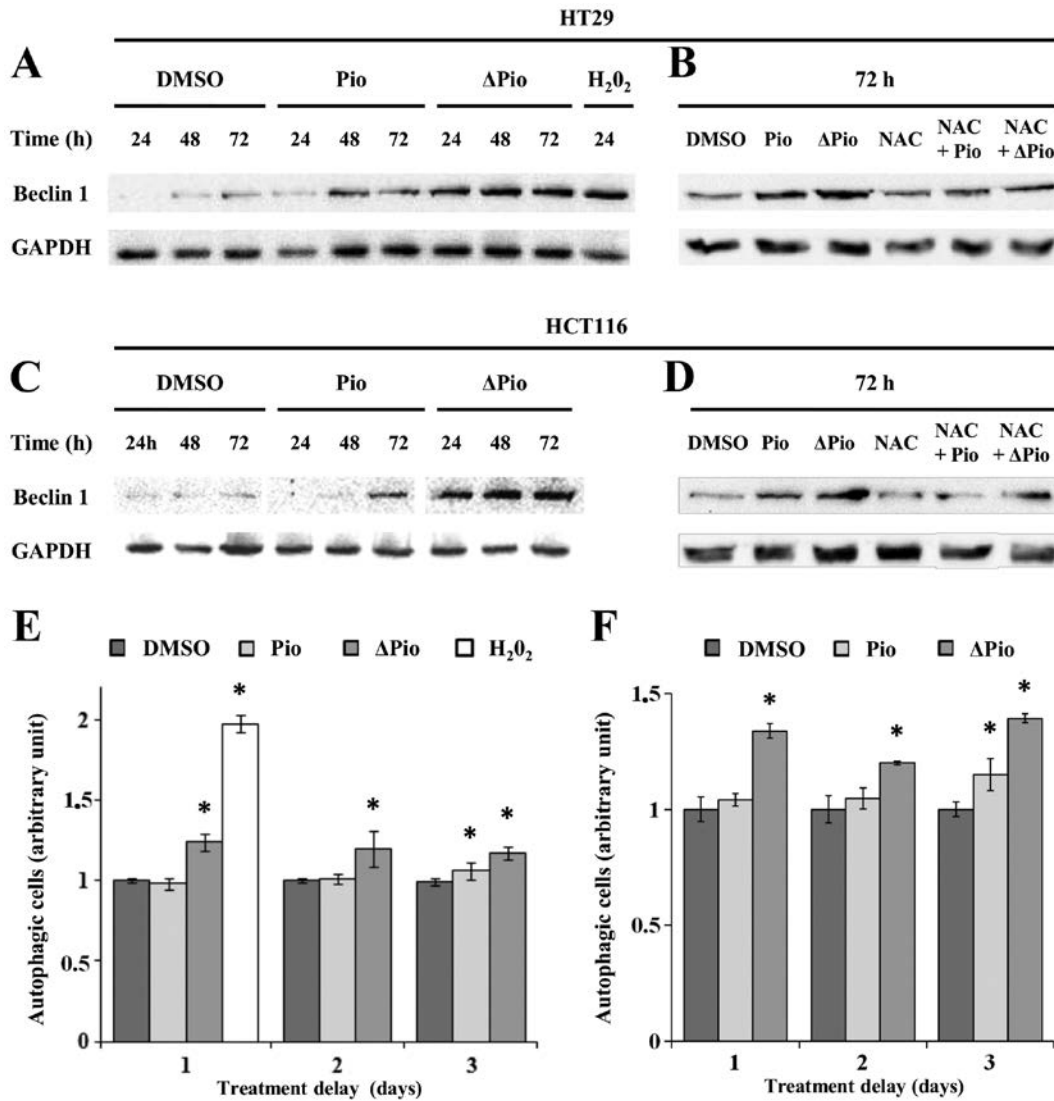


Figure 8. The autophagy process in HT29 and HCT116 cells exposed to $\Delta 2$ -pioglitazone. (A-D) HT29 (A) and HCT116 (C) cells were exposed to 50 μ M pioglitazone (Pio) or 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) over three days. Cells were treated with Δ Pio or Pio together with 5 mM N-acetyl cysteine (NAC) for three days (B and D). Western blotting using protein homogenates (25 μ g) was performed from drug and DMSO-treated cells. Blots were incubated with rabbit antibody against human Beclin-1 (1:1,000). Mouse anti-human GAPDH antibody (1:10,000) was used as a marker of sample loading. The results represent one out three independent experiments. (E and F) In parallel, acidic vesicles were quantified within HT29 (E) or HCT116 cells (F) by FACS (FL3). Cell treatment with 500 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a positive control. *P<0.05 relative to DMSO-treated cells (Student's t-test). Results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments.

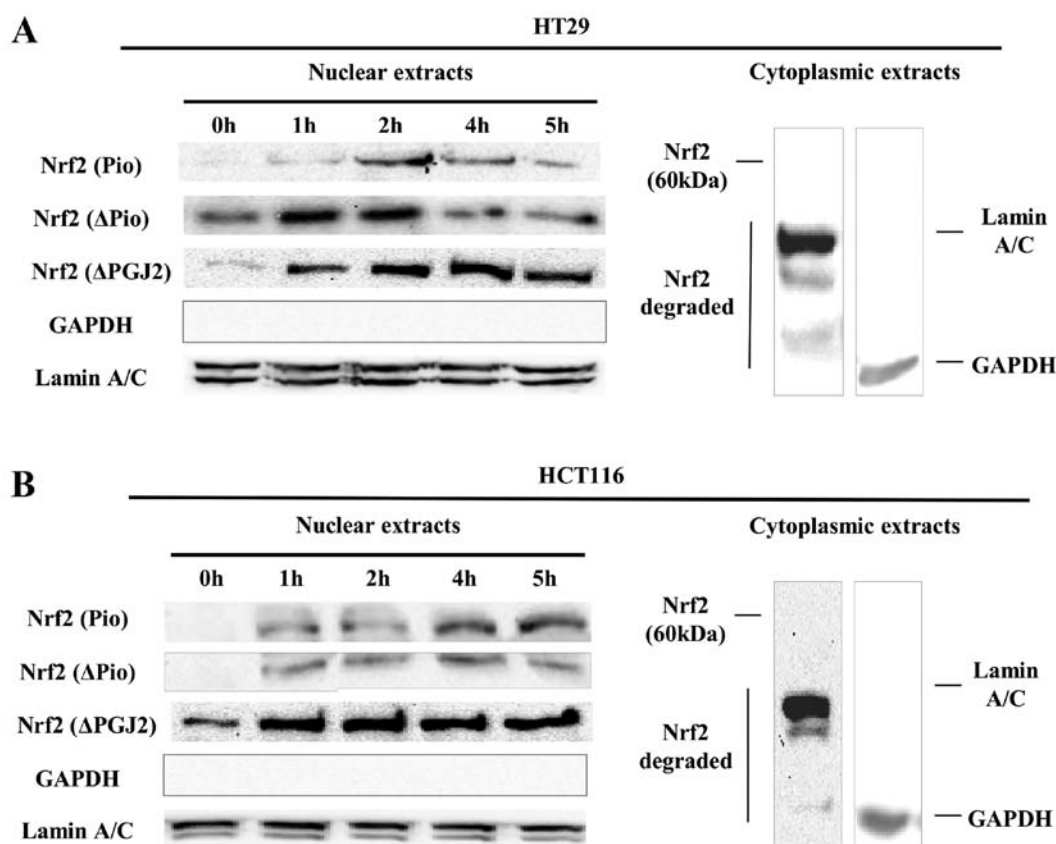


Figure 9. Nrf-2 translocation in the nucleus in $\Delta 2$ -pioglitazone-treated cells. (A and B) HT29 (A) and HCT116 cells (B) were treated with 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio), 50 μ M pioglitazone (Pio) or 3 μ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 (Δ PGJ2) for various incubation times up to 5 hours. Western blotting for Nrf-2 (estimated band at 70 kDa, diluted antibodies at 1:100) was performed with 20 μ g nuclear or 50 μ g cytoplasmic protein homogenates. GAPDH and lamin A/C were, respectively, tested as cytoplasmic and nuclear markers. GAPDH (1:10,000) or lamin A/C (1:500) immunodetection was performed in cytoplasmic extracts prepared from unstimulated cells. Results shown are representative of one out of three independent experiments.

Nrf2/Keap1 pathway activation. Activation of the Nrf2/Keap1 pathway is associated with redox changes within cells (7). We studied whether Δ Pio treatment activated translocation of Nrf2 in the cell nuclei. These results were compared to those obtained after cell exposure to Δ PGJ2, known as a potent inducer of the Nrf2/Keap1 pathway (16) and the endogenous ligand of PPAR γ (17). However, the molecule has been shown to induce apoptosis at a concentration higher than 10 μ M in colorectal cells (18) but also in cells from other tissue origins (19). We assessed whether cell exposure to 3 μ M Δ PGJ2 had any impact on colorectal cell growth and we showed that Δ PGJ2 treatment did not trigger cells to enter apoptosis (Fig. 3). As demonstrated by western blots performed with nuclear extracts, 3 μ M Δ PGJ2 treatment enhanced dramatically Nrf2 nuclear translocation in both cell lines throughout the experiment (Fig. 9). Δ PGJ2 treatment enhanced HO-1, a Nrf2 target gene, at the protein level (Fig. 10C and F, respectively). Maximum HO-1 levels were achieved when HCT116 cells are exposed to Δ PGJ2 (25 times induction) for 24 h, as compared to that found in HT29 cells (4.7 times induction). Similarly, NQO1 was detected in HT29 and HCT116 cells and the protein levels were increased after cell exposure to Δ PGJ2. Moreover, GCL protein contents were also enhanced in Δ PGJ2-treated cells and it was associated with the increase of intracellular GSH levels starting 8 h after cell treatment (Table III). Addition of BSO, a specific inhibitor of GCL activity, abrogated Δ PGJ2-

Table III. Intracellular GSH level in Δ PGJ $_2$ -treated cells.

Treatment	HT29	HCT116
DMSO [0.1% (v/v)], 4 h	100.0 \pm 3.9	-
Δ PGJ2 (3 μ M), 4 h	93.6 \pm 3.9	-
Vehicle, 8 h	100.0 \pm 5.0	100.0 \pm 1.9
Δ PGJ2 (3 μ M), 8 h	168.1 \pm 6.9 ^a	171.8 \pm 2.1 ^a
Vehicle, 24 h	100.0 \pm 7.4	100.0 \pm 3.6
Δ PGJ2 (3 μ M), 24 h	134.1 \pm 5.8 ^a	202.9 \pm 3.6 ^a
Δ PGJ2 (3 μ M) + L-buthionine-(S-R) sulfoximine (100 μ M)	6.8 \pm 0.2 ^b	16.9 \pm 1.0 ^b

^aP<0.05 relative to DMSO-treated cells (Student's t-test); ^bP<0.05 relative to Δ PGJ2-treated cells (Student's t-test); results are means \pm SEM of triplicate determinations from three independent experiments (vehicle, 0.1% DMSO).

mediated GSH synthesis. Thus, at the dose used Δ PGJ2 had a protective effect on colorectal cells. As shown in Fig. 9, Nrf2 accumulated in cell nuclei from Δ Pio or Pio-treated cells but differences existed depending on the cell line tested. In HT29 cells, maximum Nrf2 nuclear levels were found at 1 h in

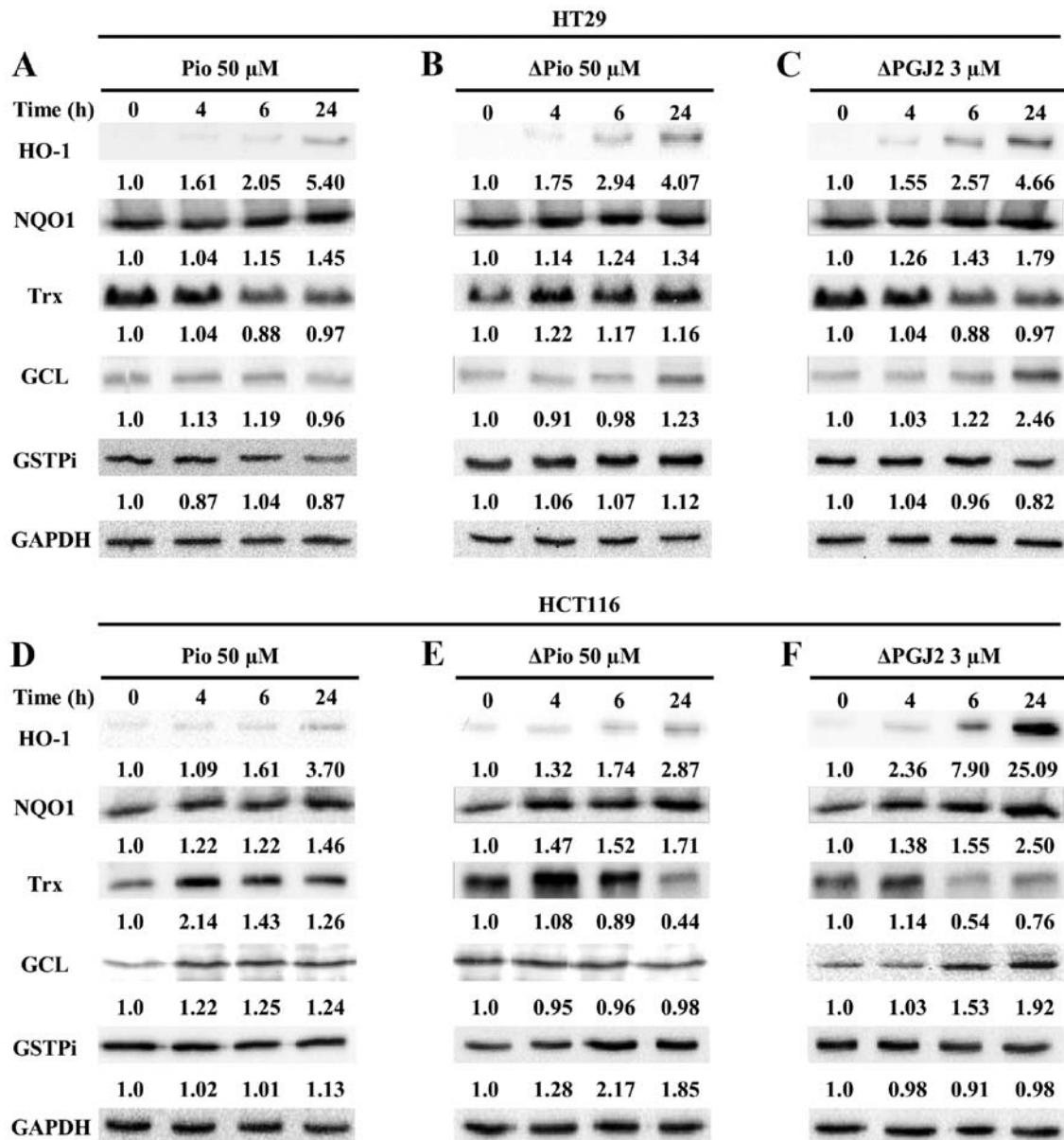


Figure 10. Expression of Nrf2 target gene in colorectal cells exposed to pioglitazone, $\Delta 2$ -pioglitazone or Δ PGJ2. (A-F) HT29 cells (A-C) and HCT116 cells (D-F) were treated with 50 μ M pioglitazone (Pio; A and D), 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio; B and E) or 3 μ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 (Δ PGJ2; C and F) for various incubation times. Western blotting was performed as described in Materials and methods using, respective, mouse or rabbit diluted antibodies against HO-1 (1:1,000), NQO1 (1:1,000), Trx (1:1,000), GCL (1:500) and GSTPi (1:500). Each blot was stripped in order to detect human GAPDH (1:10,000). Bands were quantified and normalized to GAPDH content. The ratio, level of protein of interest versus GAPDH content, in DMSO-treated cells was considered as 1.00. Results shown are representative of one out of three independent experiments.

Δ Pio-treated cells and at 2 h in Pio-treated cells (Fig. 9A). In contrast, Nrf2 translocation began 1 h after the HCT116 cell exposure to each drug and it stayed mostly constant during the experiment duration (Fig. 9B). We analysed which Nrf2 target gene could be activated during drug treatment. Whatever the cell line tested, HO-1 expression was induced demonstrating that HO-1 was involved in Δ Pio-mediated oxidative stress. Δ Pio or Pio-treatment increased HO-1 expression to a similar level whatever the cell tested (Fig. 10A,B and D,E respectively). Focusing on known Nrf2 target genes such as NQO1, GSTPi, thioredoxin and GCL, respective protein levels depended on the cell line tested and the treatment applied. NQO1 expression was increased at the protein levels, in Pio (Fig. 10A,D) and Δ Pio treated cells (Fig. 10B,E). There were

only small changes in GCL levels in Pio and Δ Pio-treated HT29 or HCT116 cells (Fig. 10A,B and D,E respectively). GSTPi expression did not change dramatically upon molecule treatment whatever the cell line tested. Trx levels rose to a maximum after HCT116 cell exposure to Pio for 4 h (Fig. 10D), whereas its expression was often decreased in the other treatment conditions. Thus, activation of the Nrf2 pathway correlated well to an increase of reactive species production within the cells.

HO-1 expression in the presence of antioxidant. HO-1 expression is enhanced in stressed cells but its expression depends also on activation of diverse transduction pathways or a mechanism involving GSH depletion (7). Based on our

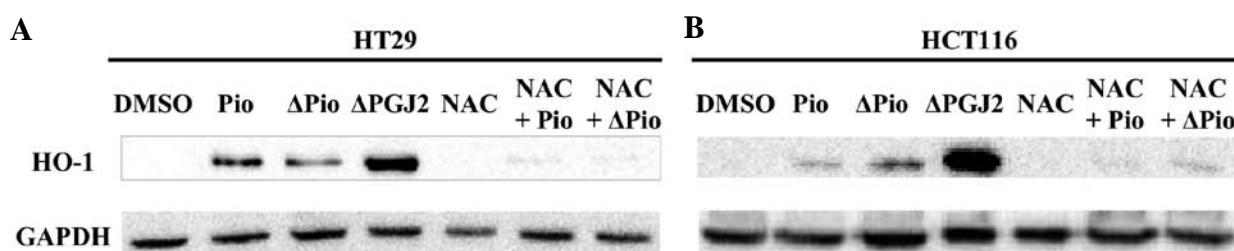


Figure 11. Impact of N-acetyl cysteine on $\Delta 2$ -pioglitazone or pioglitazone-mediated HO-1 expression. HT29 (A) and HCT116 (B) cells were treated with 50 μ M pioglitazone (Pio) or 50 μ M $\Delta 2$ -pioglitazone (Δ Pio) for 24 h, in the presence or absence of 5 mM N-acetyl cysteine (NAC). Cell treatment with 3 μ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (Δ PGJ₂) for 24 h was used as an activator of Nrf2 signalling pathway. HO-1 was detected by western blotting (diluted antibodies at 1:1,000) performed with protein homogenates prepared from treated cells. Blots are representative of one out of three independent experiments.

results, notably the presence of reactive species and GSH depletion during Δ Pio treatment, we assessed whether HO-1 expression could be modulated by antioxidants such as NAC (a thiol scavenger) (Fig. 11). Pre-treatment with NAC prevented the production of ROS within HT29 colorectal cells (Table II) and addition of the antioxidant inhibited almost completely Δ Pio-induced HO-1 expression (Fig. 11A). These results were close to those obtained when HCT116 cells were tested (Table II and Fig. 11B).

Discussion

Using a similar experimental approach as described by others (10), we synthesized Δ Pio, the analogue of Pio, which binds to the PPAR γ receptor without activating it (Fig. 1). The molecule was initially used in order to discriminate PPAR γ -dependent from -independent effects on prostate carcinoma-derived cells (10), but Δ Pio impact on other cancer-derived cells from other tissue origins had not been tested.

TZD treatment has been shown to limit colorectal cell growth or to trigger cells to enter apoptosis (18). However, several studies have demonstrated that cell exposure to TZD involved unexpected effects different from PPAR γ -dependent or -independent receptor ligand activation; notably, treatment with TZD generated oxidative stress, which in turn was related to cell growth arrest (5,20). As presented in this report, HT29 or HCT116 cell exposure to Δ Pio reduced colorectal growth more efficiently than Pio. Δ Pio treatment induced cell growth arrest, associated with cell accumulation in the G₀/G₁ phase. In contrast, Pio-treated cells accumulated in S phase (Table I) as previously reported by others (21). The Δ Pio effect observed could also reflect differentiation-like processes which occur in breast cancer cells exposed to TZD (22). Colorectal cell growth arrest was associated to autophagy initiated by the production of reactive species. Autophagy has been reported in other TZD-treated cells (23,24) but the phenomenon is related to either dependent or independent activation of PPAR γ . In breast cancer cells, TZD-dependent receptor activation induced autophagy through Hif1 α activation (24). Autophagy processes were described in neuroblastoma cells exposed to Δ PGJ₂, the endogenous ligand of PPAR γ when cells were grown in standard conditions (25). In contrast, cells underwent apoptosis in medium supplemented with de-lipidated serum (25). Similarly, absence of fetal calf serum potentiated TZD-mediated colorectal cell growth arrest and apoptosis,

whereas supplementation with serum had no consequence on cell survival when cells were treated with Δ PGJ₂ or TZD (18). On the other hand, it has been hypothesised that the Nrf2/Keap1 pathway was activated either to contribute to cell growth in the presence of oxidative stress (7) or, as suggested by others in another experimental cell model (26), by lowering autophagy processes to promote cell survival. The latter could explain why Δ Pio and Pio did not trigger cells to enter apoptosis. Indeed, the absence of apoptotic cell death contrasted to the effect of troglitazone or ciglitazone and respective $\Delta 2$ -analogues on prostate carcinoma-derived cells (10).

Several lines of evidence demonstrated that cell exposure to TZD generated oxidative stress which dramatically impacted cell survival. For example, Jurkat or A549 cell exposure to troglitazone lead to the production of an excess of ROS and RNS (14). Similar results were obtained with astroglia-derived cells exposed to ciglitazone (27). The mitochondrial membrane potential was lost after cell treatment with TZD (5,14). We have shown that HT29 and HCT116 cell exposure to Δ Pio or Pio involved the production of ROS and RNS which was inhibited by the supplementation of diverse antioxidants (Figs. 4 and 6, Table II). ROS content was enhanced within minutes suggesting that the effect observed was not dependent on PPAR γ activation as discussed previously (5). According to previous data, TZD treatment involved alteration of mitochondria function (27). In our cell model, CCCP inhibited mostly Δ Pio or Pio-mediated production of ROS confirming alteration at the mitochondrial membrane potential. Moreover, superoxyl was detected using MitoSOX probe (unpublished data). Following TZD treatment and dependent on the human cell model used, it has been shown that intracellular GSH content was decreased (14,28) concomitantly with inhibition of glutathione reductase (28) or with an increase of glutathione peroxidase activities (29). In the latter report, human pluripotent embryonic carcinoma NTERA2/D1 cell exposure to Pio for long-term treatment (several weeks), involved the production of peroxides and the concomitant, but independent, increase of glutathione peroxidase activities (29). However, we failed to demonstrate a significant increase of glutathione peroxidase enzyme activities, while GSH content stayed low in HT29 cells exposed to Pio over five days (unpublished data). We cannot exclude the concept that Pio or Δ Pio could be conjugated to GSH as demonstrated for Δ PGJ₂ in hepatoblastoma-derived cells (30). This mechanism leads to drug efflux

as demonstrated for other xenobiotics (31). However, TZD conjugation to GSH has been reported only in an *in vitro* assay with microsomal fraction prepared from human or murine hepatocytes (32). Moreover, conjugation of Pio to GSH needs the opening of the thiazolidine ring (33). In the case of Δ Pio, the conjugation could occur via the double bond adjoining the thiazolidine moiety of the molecule. Such a mechanism could explain the active effect of Δ Pio on the Nrf2/Keap1 pathway, similar to the action of Δ PGJ2 on Keap1. Δ PGJ2 reacts via Michaelis addition to one of the cysteyle residues of the Nrf2 inhibitor leading to Keap1 release from Nrf2, which in turn undergoes translocation within the cell nucleus. This mechanism was described for 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic acid (CDDO) referred to as a PPAR γ agonist (34). Indeed, the excessive production of ROS or GSH depletion after cell exposure to diverse drugs (7) or nitric oxide (35) involved activation of the Nrf2/Keap1 pathway, but crosstalk exists (36). Interestingly, HO-1 could be notably regulated by PPAR γ (37). In our cell model, HO-1 expression was induced with cells exposed to Δ Pio, the analogue of Pio, supporting that drug effect was not related to PPAR γ -dependent mechanisms.

Finally, we showed that at a comparable dose (50 μ M), Δ Pio and Pio did not have a similar impact on HT29 cells compared to that obtained with HCT116 cells. However, the Pio concentration used was nearly 20 times higher than the serum concentration in human after an oral administration of 30 mg Pio (5). We could not exclude that the results observed after cell exposure to Δ Pio reflected similar effects on cell redox alteration as those obtained with Pio.

Acknowledgements

We thank Dr Eric Battaglia and Professor Denyse Bagrel for discussion and reading of the manuscript and Professor S.N. Thornton for correcting the English. This study was supported by grants from la Ligue Contre le Cancer. Sophie Huber obtained financial support from Ministère de la Recherche et de la Technologie. Sergio Valente was granted from Marie Curie Initial Training Network (ITN) in the FP7 People Programme - Natural Products and related Redox Catalysts: Basic Research and Applications in Medicine and Agriculture.

References

- Oakes ND, Camilleri S, Furler SM, Chisholm DJ and Kraegen EW: The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat. *Metabolism* 46: 935-942, 1997.
- Michalik L, Desvergne B and Wahli W: Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer* 4: 61-70, 2004.
- Koeffler HP: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 9: 1-9, 2003.
- Castrillo A, Diaz-Guerra M, Hortelano S, Martin-Sanz P and Bosca L: Inhibition of I κ B kinase and I κ B phosphorylation by 15-deoxy Δ^{12-14} -prostaglandin J₂ in activated murine macrophages. *Mol Cell Biol* 20: 1692-1698, 2000.
- Feinstein D, Spagnolo A, Akar C, Weinberg G, Murphy P, Gavriluyk V, *et al.*: Receptor-independent actions of PPAR thiazolidinedione agonists: Is mitochondrial function the key? *Biochem Pharmacol* 2005: 177-188, 2005.
- Wei S, Yang J, Lee SL, Kulp SK and Chen CS: PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett* 276: 119-124, 2009.
- Niture SK, Kaspar JW, Shen J and Jaiswal AK: Nrf2 signaling and cell survival. *Toxicol Appl Pharmacol* 244: 37-42, 2009.
- Gong P, Stewart D, Hu B, Li N, Cook J, Nel A, *et al.*: Activation of the mouse heme oxygenase-1 gene by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) is mediated by the stress response elements and transcription factor Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 4: 249-257, 2002.
- Palakurthi SS, Aktas H, Grubisich LM, Mortensen RM and Halperin JA: Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and mediated by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61: 6213-6218, 2001.
- Shiau C, Yang C, Kulp S, Chen K, Chen C, Huang J, *et al.*: Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPAR γ . *Cancer Res* 65: 1561-1569, 2005.
- Sohda T, Momose Y, Meguro K, Kawamatsu Y, Sugiyama Y and Ikeda H: Studies on antidiabetic agents. Synthesis and hypoglycemic activity of 5-[4-(pyridylalkoxy)-benzyl]-2,4-thiazolidinediones. *Arzneim Forsch* 40: 37-42, 1990.
- Deguest G, Bischoff L, Fruit L and Marsais F: Anionic, in situ generation of formaldehyde: a very useful and versatile tool in synthesis. *Org Lett* 9: 1165-1167, 2007.
- Lenton K, Therriault H and Wagner J: Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde. *Anal Biochem* 274: 125-130, 1999.
- Atarod EB and Kehrer JP: Dissociation of oxidant production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands from cell death in human cell lines. *Free Radic Biol Med* 37: 36-47, 2004.
- Liu M, Wikonkal NM and Brash DE: Induction of cyclin-dependent kinase inhibitors and G(1) prolongation by the chemopreventive agent N-acetylcysteine. *Carcinogenesis* 20: 1869-1872, 1999.
- Uchida K and Shibata T: 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J₂: an electrophilic trigger of cellular responses. *Chem Res Toxicol* 21: 138-144, 2008.
- Kliwer SA: A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819, 1995.
- Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H and Terano A: Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARgamma) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 50: 658-664, 2002.
- Levonen AL, Dickinson DA, Moellering DR, Mulcahy RT, Forman HJ and Darley-Usmar VM: Biphasic effects of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1846-1851, 2001.
- Polvani S, Tarocchi M and Galli A: PPARgamma and oxidative stress: Con(beta) catenating NRF2 and FOXO. *PPAR Res* 2012: 641087, 2012.
- Schaefer KL, Takahashi H, Morales VM, Harris G, Barton S, Osawa E, *et al.*: PPARgamma inhibitors reduce tubulin protein levels by a PPARgamma, PPARdelta and proteasome-independent mechanism, resulting in cell cycle arrest, apoptosis and reduced metastasis of colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 120: 702-713, 2007.
- Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Fletcher M, *et al.*: Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell* 1: 465-470, 1998.
- Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Masuelli L, Marchese R, *et al.*: Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells. *Exp Cell Res* 317: 1397-1410, 2011.
- Zhou J, Zhang W, Liang B, Casimiro MC, Whitaker-Menezes D, Wang M, *et al.*: PPARgamma activation induces autophagy in breast cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 2334-2342, 2009.
- Rodway HA, Hunt AN, Kohler JA, Postle AD and Lillycrop KA: Lysophosphatidic acid attenuates the cytotoxic effects and degree of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation induced by 15-deoxyDelta^{12,14}-prostaglandin J₂ in neuroblastoma cells. *Biochem J* 382: 83-91, 2004.
- Rao VA, Klein SR, Bonar SJ, Zielonka J, Mizuno N, Dickey JS, *et al.*: The antioxidant transcription factor Nrf2 negatively regulates autophagy and growth arrest induced by the anticancer redox agent mitochinone. *J Biol Chem* 285: 34447-34459, 2010.

27. Perez-Ortiz JM, Tranque P, Burgos M, Vaquero CF and Llopis J: Glitazones induce astrogloma cell death by releasing reactive oxygen species from mitochondria: modulation of cytotoxicity by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 72: 407-417, 2007.
28. Kondo M, Oya-Ito T, Kumagai T, Osawa T and Uchida K: Cyclopentone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress. *J Biol Chem* 276: 12076-12083, 2001.
29. Ghosh S, Patel N, Rahn D, McAllister J, Sadeghi S, Horwitz G, *et al*: The thiazolidinedione pioglitazone alters mitochondrial function in human neuron-like cells. *Mol Pharmacol* 71: 1695-1702, 2007.
30. Brunoldi EM, Zanoni G, Vidari G, Sasi S, Freeman ML, Milne GL, *et al*: Cyclopentenone prostaglandin, 15-deoxy-Delta^{12,14}-PGJ₂, is metabolized by HepG2 cells via conjugation with glutathione. *Chem Res Toxicol* 20: 1528-1535, 2007.
31. Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR and Turner ND: Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492, 2004.
32. Alvarez-Sanchez R, Montavon F, Hartung T and Pähler A: Thazolididione bioactivation: a comparison of the bioactivation potentials of troglitazone, rosiglitazone, and pioglitazone using stable isotope-labeled analogues and liquid chromatography tandem mass spectrophotometry. *Chem Res Toxicol* 16: 1106-1116, 2006.
33. Uchiyama M, Fischer T, Mueller J, Oguchi M, Yamamura N, Koda H, *et al*: Identification of novel metabolic pathways of pioglitazone in hepatocytes: N-glucuronidation of thiazolidinedione ring and sequential ring-opening pathway. *Drug Metab Dispos* 38: 946-956, 2010.
34. Ferguson HE, Thatcher TH, Olsen KC, Garcia-Bates TM, Baglolle CJ, Kottmann RM, *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands induce heme oxygenase-1 in lung fibroblasts by a PPARgamma-independent, glutathione-dependent mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L912-L919, 2009.
35. Li CQ, Kim MY, Godoy LC, Thiantanawat A, Trudel LJ and Wogan GN: Nitric oxide activation of Keap1/Nrf2 signaling in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 14547-14551, 2009.
36. Chia AJ, Goldring CE, Kitteringham NR, Wong SQ, Morgan P and Park BK: Differential effect of covalent protein modification and glutathione depletion on the transcriptional response of Nrf2 and NF-kappaB. *Biochem Pharmacol* 80: 410-421, 2010.
37. Kronke G, Kadl A, Ikonomu E, Bluml S, Furnkranz A, Sarembock IJ, *et al*: Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 1276-1282, 2007.

Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents (Publication soumise à Eur. J. Med. Chem)

Germain Revelant^{1,a}, Sophie Huber^{2,b}, Sandrine Dunand¹, Gilbert Kirsch¹, Hervé Schohn^{2, **} and Stéphanie Hesse^{1, *}

1. Université de Lorraine - UMR CNRS 7565 - Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes – Equipe 3 (HECRIN) - 1 Boulevard Arago, 57070 Metz Technopôle, France

2. Université de Lorraine - UMR CNRS 7565 - Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes – Equipe 5 (2MIC) – Campus Bridoux – rue du Général Delestraint – 57070 Metz Cedex, France

*Corresponding author: Tel.: +33 3 87 54 74 97. Fax: + 33 3 87 31 58 01.

** Corresponding author: Tel.: +33 3 87 37 84 09. Fax:+ 33 3 87 31 58 01

E-mail addresses: herve.schohn@univ-lorraine.fr (H. Schohn), stephanie.hesse@univ-lorraine.fr (S. Hesse)

a and b, Authors contributed equally to this article

Keywords : thiazolidinone, thiophene, thiazole, antiproliferative activity, colon cancer

Abstract

Thiazolidinone derivatives have been shown to behave pharmacological properties and notably antiproliferative activity. Herein, we reported the synthesis of novel 2-(heteroarylimino)-1,3-thiazolidin-4-ones with three different sites of functionalization and the evaluation of antiproliferative activity of 35 compounds. We have shown that substitution on the nitrogen of the thiazolidinone ring (compounds **7-17**) seemed to give less efficient compounds whereas introduction of substitution on 5-position seemed to increase the potency of molecules as compounds **4(a-l)** and **20-24** were more active than the unsubstituted compounds **4** and **19**. Among the 35 tested derivatives, we selected the six compounds having the higher cytotoxic effect on HT29 cells as indicated by their mitotic index namely compounds **4b**, **4c**, **4e**, **4k** (with 4-chlorophenylthienylimino substituent on position 2) and compounds **20** and **22** (with 4-chlorophenylthiazolylimino substituent on position 2). These compounds were deeply investigated to further characterise the impact on human colon HT29 cell survival. We demonstrated that molecule treatment triggered cell to cell death. Molecule treatment was associated with cell accumulation in G2/M phase of cell cycle and in sub G1 fraction, and nuclei chromatin condensation. We showed that autophagy process was induced whatever the molecule tested. Cell exposure to compounds **4b**, **4c**, **4e** and **4k** was related to dissipation of mitochondria membrane potential and to redox changes, notably the production of reactive species together with the decrease of intracellular glutathione content.

Introduction

Colon cancer is one of the most frequent cancer diseases in the world. Most popular anti-cancer drugs belong to molecule groups which interfere with the progression of tumour cell through cell cycle progression by limiting DNA synthesis or DNA damage repair. In addition, another group of drugs consists in the inhibition either of the formation of mitotic spindle or in protein function, especially protein activity, involved in these mechanisms [1]. Other strategies consist in the development of chemotherapeutic drugs which inhibit G2/M transition concomitantly with apoptosis cell death, such as thiazolidinone derivatives [2].

Thiazolidinone moiety belongs to an important family of heterocyclic scaffold presenting diverse biological activities so that it has attracted continuing interest over the years; many reviews have reported the progress on this scaffold [3]. Especially, 2-imino-4-thiazolidinones have also been investigated for their pharmacological properties. For example, darbufelone has showed anti-inflammatory activity [4], whereas 2-heteroaryl-imino-1,3-thiazolidin-4-ones, especially thiazolylimino- and benzothiazolylimino- derivatives, were described as antifungal or antibacterial compounds [5, 6]. 5-Benzylidene-2-phenylimino-1,3-thiazolidin-4-ones **I** were reported for their anticancer activity [7] and a complete SAR study was realized on their anti-tumour activity against non-small cell lung cancer cell line H460 and its paclitaxel-resistant variant H460_{taxR} (Figure 1) [8]. 2-Phenylimino-5-(3-methoxybenzylidene)-3-propyl-1,3-thiazolidin-4-one **II** was proved to induce cell growth arrest after human colon adenocarcinoma-derived HT29 cells exposure for 72h (IC₅₀ = 64.1μM) [9]. Recently thiazolidin-4-ones **III** substituted with indolin-2-one fragment were evaluated against four human cancer cells as HT29, human gastric H460, mammary adenocarcinoma-derived MDA-MB-231 and sarcoma-derived SMMC-7721 cells, and the compounds showed promising antiproliferative activity [10].

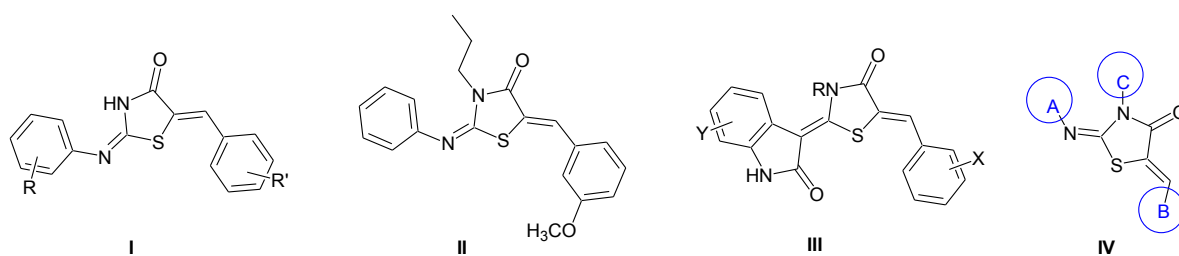


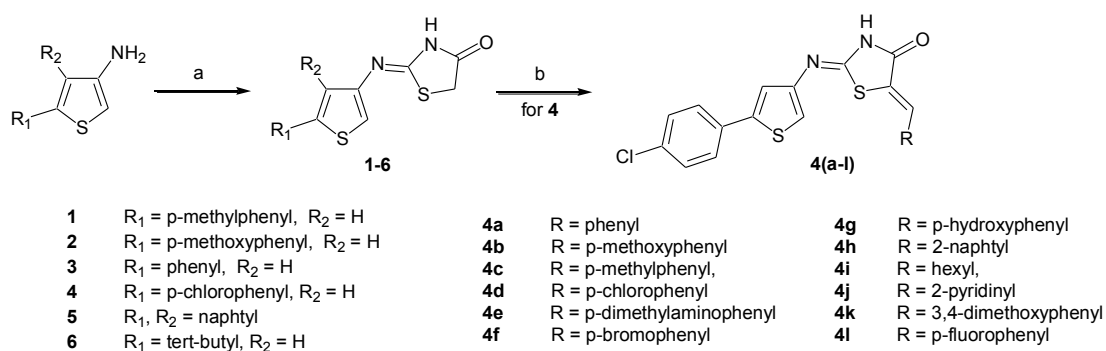
Figure 1: Thiazolidinones described for their pharmacological activities (**I-III**) and target compounds **IV**

We here report the synthesis of novel 2-(heteroaryl-imino)-1,3-thiazolidin-4-ones **IV** with three different sites of functionalization. The antiproliferative effect of the compounds was tested with human colon and also with breast cancer-derived cells. Based on this screening, we investigated the impact of several selected molecules on colorectal cell death. We studied

notably the impact of thiazolidin-4-one derivatives on HT29 cell growth and we demonstrated that molecule treatment was associated to cell accumulation in G2/M concomitantly with cell death. In addition, we showed that cell exposure to the molecule selected led to redox changes *id est* the production of reactive species and glutathione content decrease.

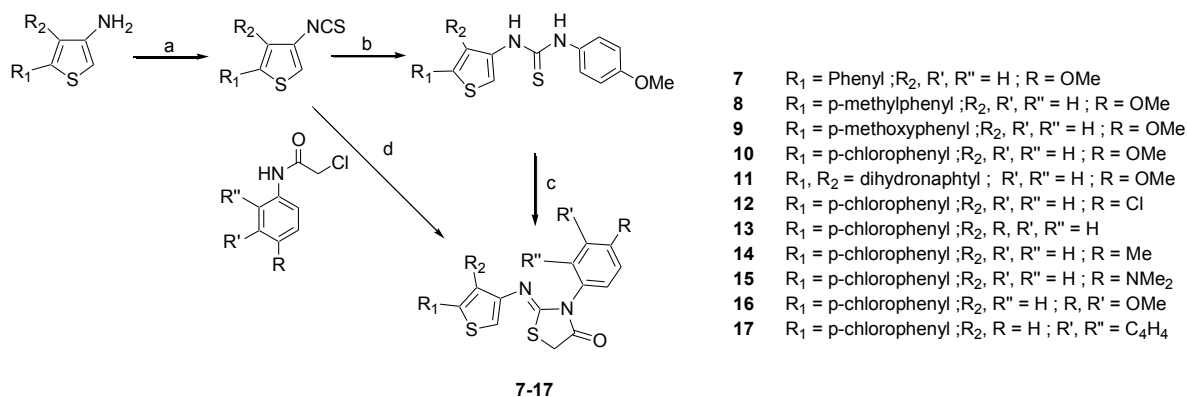
1. Chemistry

A first series of six 2-[5-aryl-3-thienyl]imino-1,3-thiazolidin-4-ones **1-6** were synthesized according to the synthetic pathway described in scheme 1: 3-aminothiophenes were reacted with chloroacetyl chloride and then with ammonium thiocyanate [11]. A second series of compounds **4(a-l)** was synthesized starting from **4**, the most active compound of the first series (on HT29 cells) and reacting it with several aldehydes in presence of pyrrolidine in methanol (Scheme 1).



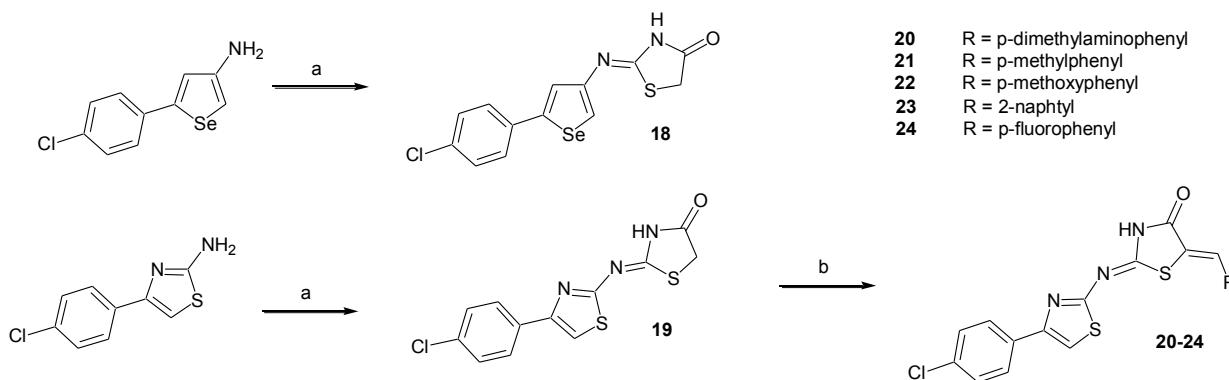
Scheme 1: Reagents and conditions: (a) i) ClCH₂COCl, dry DMF, rt, 2h ii) NH₄SCN, EtOH, reflux, 3h (46-90%); (b) RCHO, pyrrolidine, MeOH, reflux, 20h (60-89%)

To test the effect of nitrogen substitution on antiproliferative activity, the synthesis of a third series of compounds was carried out using two different pathways highlighted in Scheme 2. Firstly, 3-aminothiophenes were converted into the corresponding isothiocyanates. Those compounds were then either condensed with p-anisidine to give the corresponding thioureas which were then reacted with ethyl chloroacetate and cyclized to lead compounds **7-11** [12] or isothiocyanates were condensed with chloroacetamides in basic media to allow formation of compounds **12-17** (Scheme 2).



Scheme 2: Reagents and conditions: (a) CSCl_2 , NaHCO_3 , CHCl_3 , r t, 2h; (b) p-anisidine, dry CH_2Cl_2 , r t, 18h; (c) $\text{ClCH}_2\text{COOEt}$, NaOAc , dry DMF, reflux, 24h; (d) K_2CO_3 , CH_3CN , 40°C

Finally, variation was made on heteroaryl-imino moiety: 2-heteroaryl-imino-1,3-thiazolidin-4-ones **18-19** were synthesized starting from 3-aminoselenophene [13] and aminothiazole (those heterocycles being always substituted with a p-chlorophenyl group). Those thiazolidinones were then modified by introducing substituents on position 5 to give derivatives **20-24** (Scheme 3).



Scheme 3: Reagents and conditions: (a) i) ClCH_2COCl , dry DMF, rt, 2h ii) NH_4SCN , EtOH, reflux, 3h; (b) RCHO , pyrrolidine, MeOH, reflux, 20h

2. Biological evaluation

2.1. Screening of the thiazolidin-4-one derivatives as potential anti-cancer molecules

The antiproliferative *in vitro* screening was performed by the MTT method with human colon cancer cell lines HT29, HCT116 and SW620 and breast cancer cells as MCF7 and MDA-MB-231. Among compounds **1-6** (Table 1), compound **4** inhibited HT29 cell growth with an IC_{50} estimated at $17.1 \pm 7.2 \mu\text{M}$. The molecule had however no effect ($\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$) on the other

cell lines used. It should also be noted that compound **18**, the selenophene analogue of compound **4**, had no cytotoxicity whatever the cell line tested (Table 1).

We evaluated next the impact of compounds **4 (a-l)**. Those molecules corresponded to substitution of diverse groups at 5-position of the thiazolidine ring (Scheme 2 and Table 1). With the exception of derivatives **4g** and **4i** (bearing respectively 4-hydroxybenzylidene and heptylidene), the effect of each compound on cell growth was greater than compound **4**. The IC_{50} of each molecule was less than 12 μ M when the MTT method was performed with HT29 cells. Methoxybenzylidene (**4b**), 4-methylbenzylidene (**4c**), 4-chlorobenzylidene (**4d**), 4-dimethylaminobenzylidene (**4e**), 4-bromobenzylidene (**4f**), 2-naphthylidene (**4h**) and 4-fluorobenzylidene (**4l**) substitutions gave the higher cell growth inhibitory effect. Similar results were obtained when the experiments were performed with the other cell lines with some exceptions: SW620 cell exposure to compounds **4b** and **4k** led to IC_{50} estimated at 28.1 ± 12.4 and > 50 μ M, respectively. A similar IC_{50} was calculated when HT29 (11.5 ± 7.0 μ M) or MDA-MB-231 cells (10.9 ± 0.5 μ M) were treated with compound **4j**, but higher IC_{50} values were obtained when the other cell lines were tested.

We tested next compounds **7-17** which included diverse substitutions on the nitrogen of the thiazolidinone ring (Scheme 2 and Table 1). With the exception of compound **9**, the synthesized derivatives were less efficient to alter colorectal or mammary cell growth than compounds **4a-4l**.

Finally, we investigated the impact of compounds **18-24** bearing a heterocycle other than thiophene on the imino group in 2-position of the thiazolidinone ring. IC_{50} values were at the micromolar range after cell exposure to compounds **20-22**. Similar results were obtained when cells were exposed to compound **23**, with the exception of SW620 cells ($IC_{50} = 20.3 \pm 2.8$ μ M). Finally, cell growth inhibition was obtained when HT29 or HCT116 were treated with compound **19** with IC_{50} values estimated at 8.9 ± 2.1 μ M and 23.8 ± 6.8 μ M, respectively. In addition, treatment with compound **24** (bearing p-fluorobenzylidene substituent) was efficient to inhibit HT29 and HCT116 cell growth, but it had no effect when the other cell lines were used. IC_{50} values were however greater than those obtained for compounds **20-22** (Table 1).

Collectively, compounds **4(a-l)** and **20-23** reduced colorectal cell growth. We studied therefore the mechanisms of HT29 cell death after cell exposure to these selected compounds.

Table 1: IC₅₀ determination for thiazolidin-4-one derivatives

Compound	IC ₅₀ (μM)				
	HT29	HCT116	SW620	MCF7	MDA-MB-231
1	>50	>50	>50	>50	>50
2	>50	>50	>50	>50	>50
3	>50	>50	>50	>50	>50
4	17.1 ± 7.2	>50	>50	>50	>50
5	>50	>50	>50	>50	>50
6	>50	>50	>50	>50	>50
4a	10.5 ± 5.8	11.2 ± 2.2	>50	> 50	18.0 ± 0
4b	3.8 ± 0.9	1.3 ± 0.1	28.1 ± 12.4	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.2
4c	6.4 ± 1.5	1.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.04
4d	2.8 ± 2.0	11.6 ± 3.4	4.6 ± 0.7	6.7 ± 0.3	6.4 ± 0.3
4e	1.5 ± 1.2	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.4 ± 0.05	0.8 ± 0.01
4f	2.0 ± 1.5	3.3 ± 0.1	0.7 ± 0.6	2.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2
4g	>50	ND	ND	> 50	ND
4h	3.7 ± 3.1	3.0 ± 0.6	>50	1.2 ± 0.1	1.8 ± 0.1
4i	33.5 ± 4.4	ND	ND	> 50	ND
4j	11.5 ± 7.0	21.6 ± 1.1	>50	30.2 ± 6.5	10.9 ± 0.5
4k	10.9 ± 3.1	1.7 ± 0.2	>50	7.6 ± 0.7	1.9 ± 0.1
4l	4.1 ± 0.6	7.4 ± 0.7	8.7 ± 1.6	> 50	ND
7	38.3 ± 7.7	ND	ND	ND	ND
8	> 50	41.0 ± 9.0	> 50	>50	>50
9	11.7 ± 1.1	2.7 ± 0.05	3.5 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.7 ± 0.2
10	24.6 ± 7.8	> 50	33.0 ± 6.6	> 50	> 50
11	> 50	ND	ND	> 50	ND
12	36.6 ± 3.9	ND	> 50	>50	ND
13	41.4 ± 7.4	ND	ND	> 50	ND
14	28.9 ± 8.6	ND	>50	> 50	ND
15	29.2 ± 4.3	ND	ND	> 50	ND
16	14.1 ± 2.7	49.8 ± 11.9	> 50	18.7 ± 2.6	46.9 ± 4.8
17	> 50	ND	19.5 ± 1.7	> 50	ND
18	> 50	ND	>50	> 50	ND
19	8.9 ± 2.1	23.8 ± 6.8	>50	> 50	> 50
20	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.02	0.20 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.01
21	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.89 ± 0.1	0.4 ± 0.05	0.8 ± 0.1
22	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.03	0.05 ± 0.03	0.1 ± 0.02	0.3 ± 0.3
23	1.8 ± 0.3	1.2 ± 0.03	20.3 ± 2.8	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.05
24	2.9 ± 0.7	7.5 ± 4.3	> 50	>50	> 50

Cells were grown in 96 well-plates and treated with each compound (0-100μM) for 72 hours. Viability was assessed by the MTT procedure as described in the biological methods section. IC₅₀ values were calculated with the GraphPad software. Values are means ± S.E.M. of at least two 96 well-plates from two independent experiments (n = 16). ND : not determined.

2.2. Impact of thiazolidin-4-one derivatives on HT29 cell growth arrest.

In order to confirm the results obtained by MTT procedure, we treated HT29 cells with each compound at the concentration corresponding to IC_{50} value over three days with daily medium changes. Cells were counted by the Trypan blue method. In these conditions, cell growth inhibition reached 90 % when cell were exposed with compounds **4b**, **4c**, **4e** or **4k** (Figure 2A). Lower inhibitions were obtained with compound **4d** (25%), **4f** (25%), **4h** (50%), **4j** (40%), **4l** (25%) or **9** (50%). However, when HT29 were treated with compounds **20-23** at the concentration corresponding to IC_{50} value, cell growth inhibition was less than 25%. We therefore treated HT29 cells with 1-10 μ M of each compound (Figure 2B). In these experimental cell culture conditions, cell growth inhibition reached 90% and quite 40% when HT29 cells were exposed to 2.5 μ M of compound **20** or **22**, respectively. Similar growth arrest was obtained when cells were treated with 10 μ M of compound **21** (not shown). Little effect was obtained after cell exposure to compound **23** (less than 5 % cell growth inhibition).

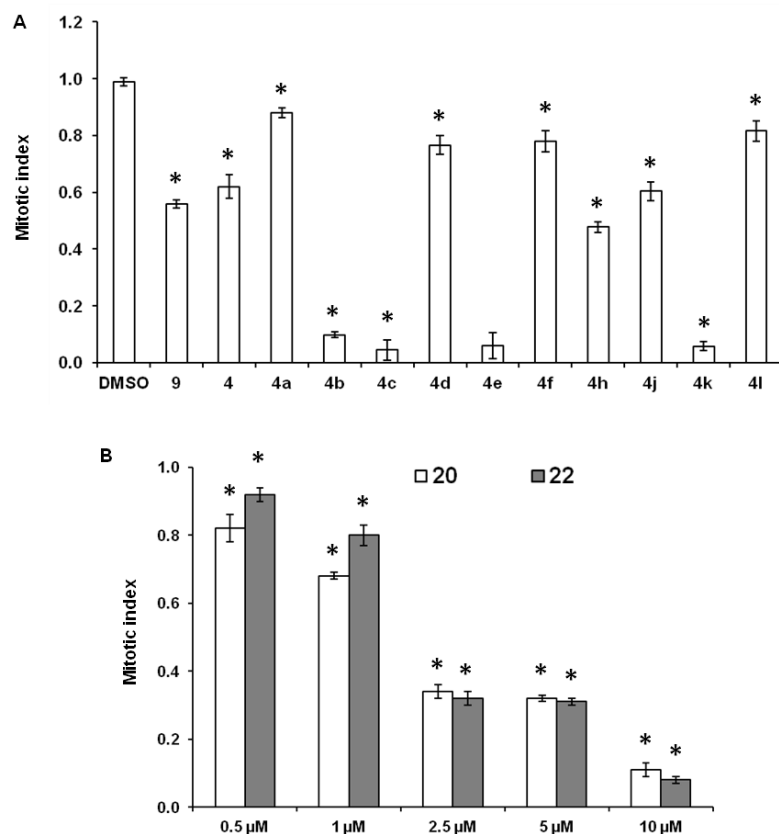


Figure 2: HT29 cell growth inhibition of compound **4** and its derivatives

HT29 cells were grown in 6 well-plates and treated with compounds **4**, **4(a-l)**, and **9** (A) at the concentration corresponding to IC_{50} value, and with 0.5-10 μ M with compounds **20** and **22** (B) for 72 hours with daily medium change. Cell were harvested and counted by the Trypan blue method. Data are means \pm S.E.M of triplicate determination from two independent experiments. Results are expressed as mitotic index (number of compound-treated cells related to control cells treated by 0.1% (v/v) DMSO used as compound diluent.) *, significant difference ($p < 0.05$) at Student's t test between HT29-treated cells with respect to control cells, exposed to DMSO used as compound vehicle.

We further established cell growth kinetic curves and we tested in parallel HT29 cell viability by flow cytometry after treatment with compound **4b**, **4c**, **4e** or **4k** over three days (Figure 3A). Each compound altered dramatically cell growth and the levels of living cells decreased concomitantly (Figure 3B). Similar results were obtained after treatment with 2.5 μ M compound **20** or **22** (Figure 3C and 3D) but the effect on cell death was lower as compared to the results obtained with compound **4** derivatives. We analysed next cell distribution in cell cycle phases after cell exposure to each compound. Cell accumulation in G2/M phase was found after cell exposure to compound **4b**, **4c**, **4e** or **4k** (Table 2). When HT29 cells were treated with compound **20** or **22**, we found that cells accumulated slightly in G2/M phase. Interestingly, we found that cell exposure to compound **4b**, **4c**, **4e**, **4k**, **20** or **22** involved cell accumulations in sub-G1 fraction, supporting that each treatment triggered cells to apoptosis cell death (Table 2). Moreover, we observed that chromatin condensation and nuclear fragmentation occurred in treated cells by the use of DAPI probe loaded on treated cell layers (Supplement data 1). Cell death was associated also with the loss of mitochondrial membrane potential (ψ_m) as demonstrated by the absence of J-aggregates when HT29 cells were exposed to each compound together with JC-1 fluorescent probe (Supplement data 1).

Table 2: Cell cycle distribution after cell exposure to thiazolidin-4-one derivatives

Treatment ^a	Sub G1 fraction ^b	G0/G1 phase ^c	S phase ^c	G2/M phase ^c
DMSO (0.1%)	6.9 \pm 0.5	46.1 \pm 0.4	23.9 \pm 0.3	30.0 \pm 2.0
4b	21.6 \pm 2.4*	1.2 \pm 0.4 [#]	18.2 \pm 1.6 [#]	80.6 \pm 1.2 [#]
4c	21.5 \pm 1.8*	1.2 \pm 0.2 [#]	14.8 \pm 2.0 [#]	84.0 \pm 1.8 [#]
4e	29.0 \pm 1.9*	1.5 \pm 0.2 [#]	14.8 \pm 0.7 [#]	83.7 \pm 0.7 [#]
4k	20.6 \pm 2.2*	2.3 \pm 0.9 [#]	11.3 \pm 0.9 [#]	86.4 \pm 0.6 [#]
DMSO (0.1%)	2.3 \pm 0.1	67.7 \pm 0.5	21.1 \pm 1.5	11.3 \pm 1.0
20	16.2 \pm 0.7*	60.6 \pm 0.1 [#]	20.7 \pm 1.0	18.7 \pm 0.7 [#]
22	20.9 \pm 1.4*	58.7 \pm 0.4 [#]	17.2 \pm 1.3 [#]	24.1 \pm 1.4 [#]

a, HT29 cells were treated with each compound as described in the biological methods section. **b**, results are expressed as percentage of cells in the sub-G1 fraction related to total cells analysed. **c**, results are expressed as percentage of cells in each phase of cell cycle. Data are means \pm S.E.M. of triplicate determinations from three independent experiments. (* and [#], significant statistical difference ($P < 0.05$) at Student's t test; comparison between HT29-treated cells with respect to cells exposed to DMSO).

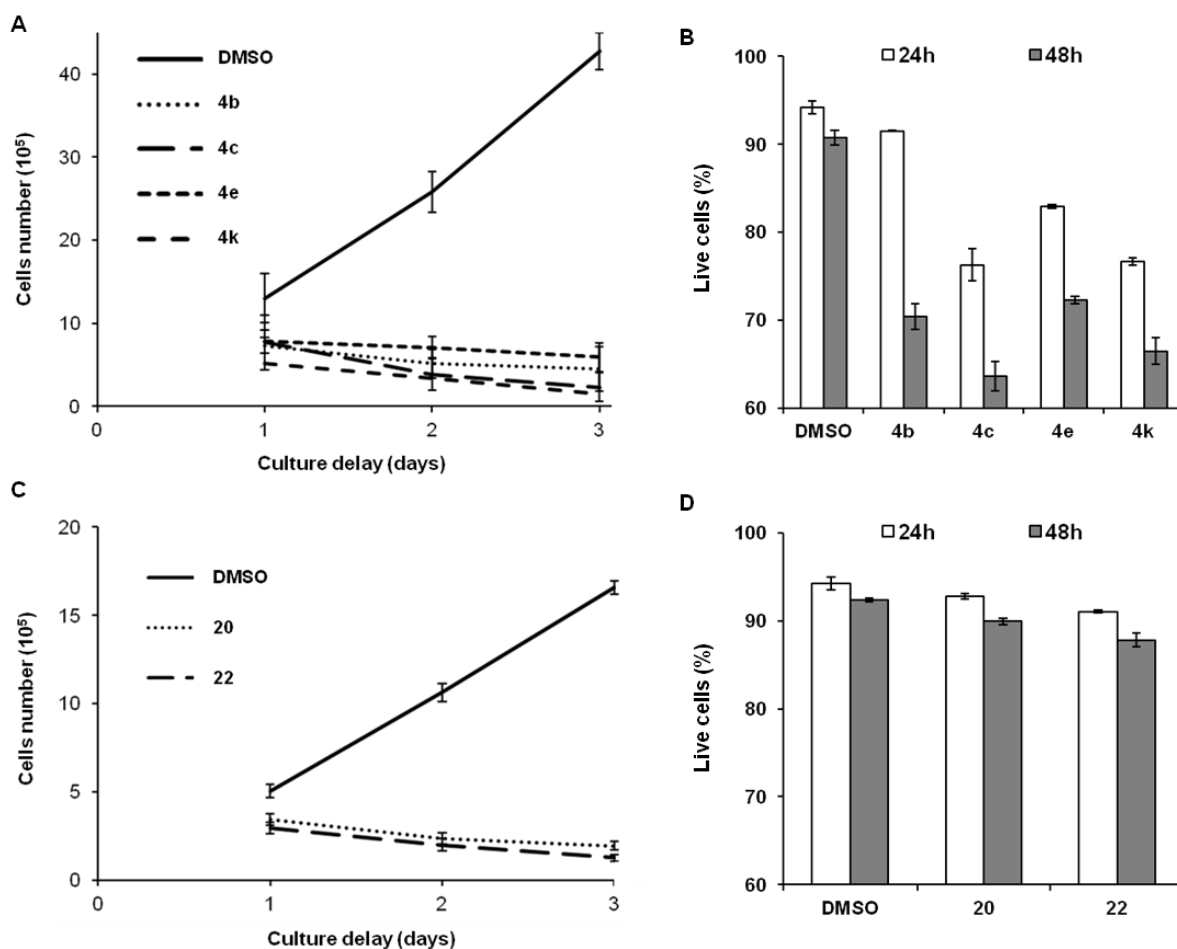


Figure 3: HT29 cell growth kinetic and cell viability after cell exposure to compounds **4b**, **4c**, **4e**, **4k**, **20** and **22**.

A and C: HT29 cells were grown in 6 well-plates and treated with compound **4b**, **4c**, **4e**, **4k** at the concentration corresponding to IC₅₀ value (**A**) and with 2.5 μM of compound **20** and **22** (**C**) for 24, 48 or 72 hours with daily medium change. After treatment, cells were harvested and counted with Trypan blue dye. Results are means ± S.E.M. of triplicate numeration from two independent experiments (n = 6). **B and D:** Cell viability assays were performed with HT29 cells treated with the same conditions in **A** or **C**, loaded with DCFDA and IP probes and analysed by flow cytometry as described in the biological methods section. Results are expressed as percentage of living cells (negative to IP, and positive to DCF-2DA). Data are means ± S.E.M of triplicate determination from three independent experiments. Statistical analysis demonstrated that significant difference (P < 0.05) at Student's t test was obtained in **A-D** (comparison between HT29-treated cells with respect to cells exposed to DMSO).

Since IC₅₀ was near or less than 10 μM (Table 1), we studied similarly the impact of compound **4a**, **4f**, **4j** or **9** (data not shown). In brief, whatever the molecule tested, cell exposure to each compound was not associated to cell accumulation in subG1 fraction. Cell treatment with compound **4a**, **4f** or **4j** increased cell distribution in S-phase of cell cycle whereas cell accumulated slightly in G0/G1 after exposure to compound **9**. Collectively, our results suggested that molecule treatment was associated rather to cytostatic cell growth arrest.

2.3. Redox changes are associated with treatment of thiazolidin-4-one derivatives

We assessed whether HT29 cell exposure to thiazolidin-4-one derivatives **4b**, **4c**, **4e**, **4k**, **20** or **22** induced oxidative stress which in turn could explain why HT29 cells underwent apoptosis as previously described for diverse thiazolidinones [14]. Moreover, oxidative stress is related to the induction of autophagy, the cell defence against cell injury. Ultimately, activation of autophagy process is linked to cell death in association or not with apoptosis [15, 16].

Fluorescent probe DCF-2DA was used to quantify any change in the levels of ROS after cell exposure to thiazolidin-4-one derivatives over 6 hours (Figure 4). ROS levels reached a peak one hour after compound **4b** treatment (figure 4A). ROS levels increased with the maximum reached at 4 hours and they decreased over 6 hours to ROS content found in DMSO-treated cells. A similar situation was obtained when cells were exposed to compound **4k**; but ROS levels reached a peak 30 min after drug treatment. The biphasic ROS production occurred also after **4e** treatment, but ROS levels were markedly increased with the maximum reached at 4 hours and they decreased slightly thereafter. Compound **4e** treatment increased gradually ROS production and reached maximum at 4 hours. It was similar to that obtained when HT29 cells were treated with compound **4c**. Similar ROS production curve was observed when cells were exposed to compound **20**. ROS levels reached a peak at 3 hours whereas compound **22** did not alter ROS content within the cells over 6 hours-treatment duration (Figure 4B).

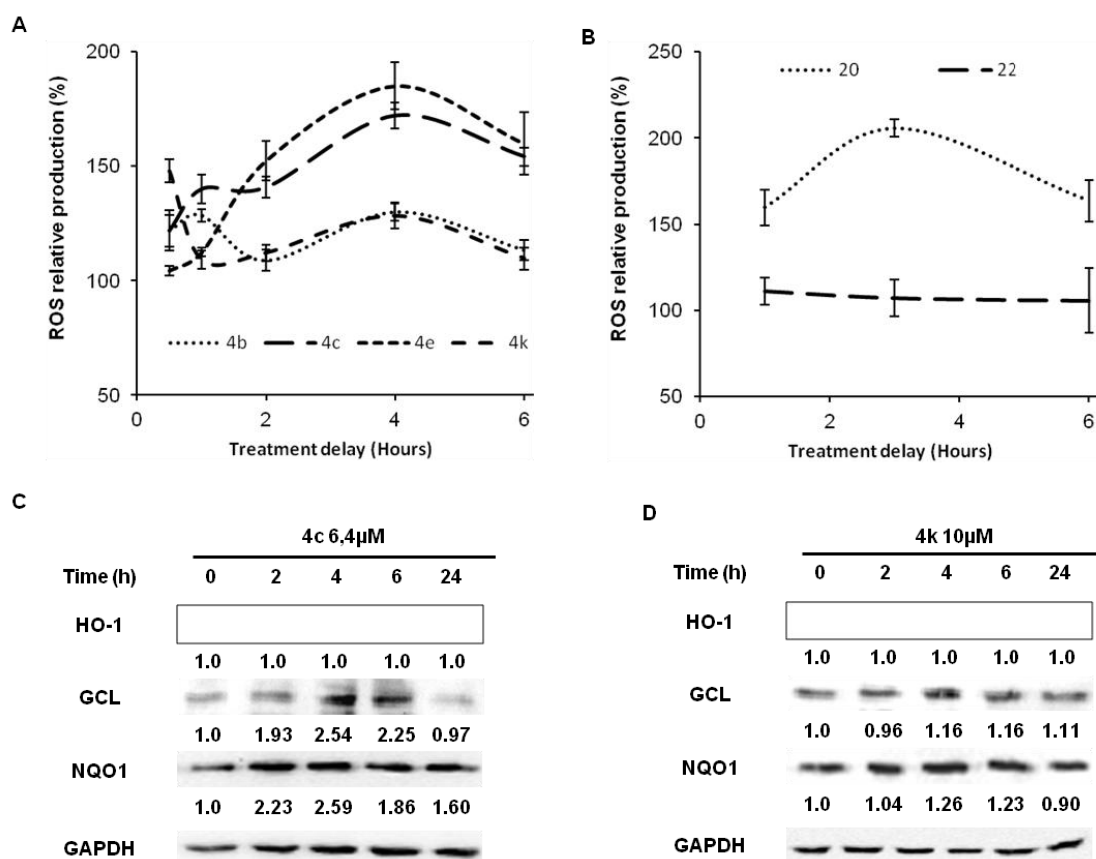


Figure 4: thiazolidin-4-one derivative treatment is associated with ROS production and modulation of antioxidant enzyme expression

A and B: HT29 were grown in 6 well-plates and treated with compound **4a**, **4c**, **4e** or **4k**, and compound **20** or **22** over 6 hours, then loaded with DCF-2DA as described in the biological section. At specified times, cell were harvested by trypsination and analysed by flow cytometry. Data are means \pm S.E.M of triplicate determination from three independent experiments. **C and D:** Western blotting was performed with protein homogenates prepared from HT29 cells treated as described in the Biological methods section. Respective mouse or rabbit diluted antibodies against HO-1 (1: 1 000), NQO1 (1:1 000), GCL (1: 500) were used. Each blot was stripped and used to detect human GAPDH (1: 10 000) using the same protocol. Bands were quantified and normalized to GAPDH content. The ratio, level of protein of interest *versus* GAPDH content, in DMSO-treated cells was considered as 1.00. Results shown are representative of one out of three independent experiments. Typical results obtained when HT29 cells were treated with compound **4c** and **4k**.

We tested also fluorescent DAF-2DA and dihydro-rhodamine 123 probes (Table 3). DAF-2DA detects reactive oxygen- and nitrogen-derived species and notably nitric oxide. DHR123 probe is used to detect peroxynitryl radical. As shown in table 3 and with the exception of compound **22**, each compound treatment involved the production of RNS species detected by DAF-2DA probe. In addition slight but significant decreases of peroxynitryl radical levels were obtained when cells were treated with compound **4b**, **4c**, **4e**, **4k** or **22**, whereas peroxynitryl content increased after cell exposed to compound **20** (Table 3).

Table 3: Redox changes within HT29 cells exposed to thiazolidin-4-one derivatives

Treatment	RNS content		GSH content
	DAF-2DA	DHR 123	
0.1% (v/v) DMSO	100.0 \pm 1.0	100.0 \pm 4.2	100.0 \pm 2.0
4b	169.7 \pm 3.6*	85.9 \pm 3.2*	88.8 \pm 4.1*
4c	155.0 \pm 0.3*	95.0 \pm 3.2*	73.9 \pm 8.3*
4e	294.4 \pm 8.6*	80.1 \pm 2.3*	84.6 \pm 3.7*
4k	116.3 \pm 1.1*	83.6 \pm 4.9*	108.1 \pm 7.9*
0.1% (v/v) DMSO	100.0 \pm 1.0	100.0 \pm 0.5	100.0 \pm 10.5
20	144.4 \pm 10.9*	157.6 \pm 4.6*	109.1 \pm 5.2
22	103.3 \pm 1.7	80.9 \pm 0.7*	117.0 \pm 4.8

RNS and GSH levels were quantified as described in the biological methods section. The results are expressed in percentage obtained from HT29 cells exposed to each compound related to control cells treated with DMSO used as compound vehicle. Data are means \pm S.E.M. of triplicate determinations from three independent experiments. (*, significant statistical result ($P < 0.05$) at Student's t test; comparison between HT29-treated cells with respect to cells exposed to DMSO).

Since thiazolidin-4-one derivative treatment induced the production of reactive species with the exception of compound **22**, we quantified the cytoplasmic GSH content which is often depleted in the presence of an excess of reactive species (Table 3). GSH content was decreased up to 30 % when cells were exposed to compound **4c** whereas 10-15%-GSH decreases were obtained after cell exposure to compounds **4b** and **4e**. In contrast, there was no significant change in GSH levels in cell homogenates treated with compound **4k** or **20**. Finally, pre-treatment with ascorbic acid, an antioxidant, protected cells against stress injury but it did not rescue HT29 cell growth (Table 4) supporting that the oxidative stress observed was not solely involved in cell death observed.

Table 4: Impact of thiazolidin-4-one derivatives on HT29 cells pre-treated with antioxidant.

	ROS content		Mitotic index	
	Compound alone	+ 1mM ascorbic acid*	Compound alone	+ 1mM ascorbic acid
0.1% (v/v) DMSO	100.0 ± 3.5	65.7 ± 4.7	1.00 ± 0.08	1.12 ± 0.03
4b	123.1 ± 0.3	97.0 ± 3.1	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.02
4c	172.0 ± 5.5	102.5 ± 4.8	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
4e	177.8 ± 1.6	133.6 ± 4.8	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
4k	141.6 ± 2.6	112.1 ± 3.9	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
0.1% (v/v) DMSO	100.0 ± 5.6	64.7 ± 2.6	1.00 ± 0.07	1.08 ± 0.04
20	252.5 ± 14.5	158.8 ± 8.5	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.02

ROS levels and mitotic index were calculated as described in the biological methods section. ROS contents are expressed in percentage related to control cells treated with DMSO used as compound vehicle. Results are means ± S.E.M. of triplicate determinations from three independent experiments. Mitotic index values are means ± S.E.M. of triplicate determinations from two independent experiments. (*, significant statistical result (P < 0.05) at Student's t test; comparison between HT29 cells pre-treated with ascorbic acid before addition of each compound with respect to cells exposed to each compound alone).

Moreover, we assessed whether the molecules could activate the NF-2E related factor 2/Kelch like-ECH-associated protein 1 (Nrf2/Keap1) pathway, involved to protect cells against oxidative stress [17]. Activation of the Nrf2/Keap1 pathway leads to the stabilization of Nrf2 which translocates in nuclei and binds to Maf protein. The complex, after binding to specific DNA sequence, defined as antioxidant response element localised in the promoter of Nrf2/Maf target genes, increases the transcription of genes involved in reactive species-mediated response such as Heme Oxygen-1 (HO-1), NADH quinone oxidase-1 (NQO1) or glutamyl-cysteyl ligase (GCL). As shown in figures 4C and 4D, no induction of HO-1

expression was found in cell homogenates prepared from HT29 cells treated with **4c** and **4e**. In contrast, NQO-1 and GCL expression were increased supporting that other pathways could regulate the expression of the enzymes as described previously [18, 19]. However, the increases of GCL expression, which is the rate-limiting enzyme in the synthesis of GSH, correlated well with the decreases of GSH levels observed when cells were treated with thiazolidin-4-one derivatives **4c** and **4e** (Table 3 and figure 4C). Similarly, cell exposure to derivative **4k** did not affect GSH content and GCL expression stayed constant (Table 3 and figure 4D). Finally, we also studied the distribution of Nrf2 protein by cell fractionation. However, Nrf2 protein levels were not increased in nuclei homogenates prepared from treated cells over 6 hours (data not shown).

2.4. Autophagy is associated to HT29 cells exposure to thiazolidin-4-one derivatives

Based on our results demonstrating cell growth arrest and redox changes in treated cells, we assessed whether cell exposure to thiazolidin-4-one derivative was associated with autophagy. As shown in figure 5A, acidic vesicles contents were increased within HT29 treated cells over two days, as demonstrated by the use of acridine orange dye. Moreover, beclin-1 expression, a marker of autophagosome formation, was induced after cell exposed to each molecule (Figure 5B). Thus, our results supported that HT29 exposure to thiazolidin-4-one derivative was associated with autophagy process. However, we could not conclude whether autophagy process results in HT29 cell apoptosis cell death or whether compound treatment is associated to autophagy cell death as previously discussed [20].

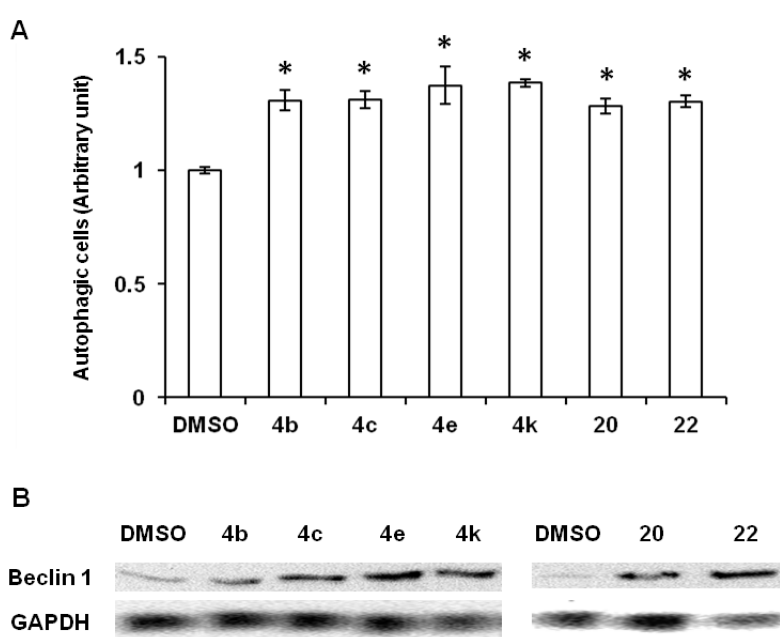


Figure 5: Autophagy processes in HT29 exposure to thiazolidin-4-one derivatives

A. HT29 cells were exposed to each compound over two days and loaded with acridine orange probe (1 μ M) for 15 min. Cells were harvested by trypsination and the red fluorescence was quantified within cells by flow cytometry. Results are means \pm S.E.M. of triplicate determinations from three independent experiments (*, significant difference at Student t test ($P < 0.05$) with respect to DMSO-treated cells). **B.** Detection of beclin-1 expression during autophagosome formation by western blotting. The experiments were performed with rabbit antibody against human beclin-1 as described in the biological section. Typical results out of three independent experiments obtained with protein homogenates prepared from HT29 cells treated with each compound over two days. Mouse antibody against human GAPDH was used as sample loading.

2.5. Conclusion

Herein, we tested 35 thiazolidinone derivatives for their antiproliferative activity against a panel of five cancer cell lines. We showed that substitution with an aryl group on the nitrogen of thiazolidinone ring reduced dramatically the anti-cancer activity whereas substitution by a benzylidene group on position 5 is really important. Especially, we found that compounds with a p-methoxybenzylidene (**4b**), p-methylbenzylidene (**4c**), p-dimethylaminobenzylidene (**4e**) and 3,4-dimethoxybenzylidene (**4k**) enhanced the impact on HT29 cell growth arrest. For these compounds, cell underwent apoptosis cell death after cell accumulation in G2/M phase of the cell cycle, as described previously with another thiazolidinone derivative [2]. In this previous report, the molecule tested was an inhibitor of the Cell Dependent Kinase 1. On the other hand, we demonstrated that cell exposure to the compound selected was associated with the production of reactive species, and the induction of autophagy which could lead to cell death [20]. Of note, increasing the production of reactive species represents also an alternative among the chemotherapeutic strategies against cancer cells (for review, [21]). Therefore, further studies are needed to decipher cell death mechanism involved in HT29 cell exposed to the selected thiazolidin-4-one derivatives.

3. Experimental section

3.1. Chemistry

All solvents were of reagent grade and, when necessary, were purified and dried by standard methods. All chemicals were purchased from Acros or Sigma-Aldrich. All reactions were routinely checked by TLC analysis on an Alugram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) with spots visualized by UV light. The concentration of solutions after reactions and extractions involved the use of a rotary evaporator operating at reduced pressure. Organic solutions were dried over anhydrous magnesium sulfate, and column chromatography was performed using silica gel 60 (50-200 μ m diameter). Melting points were determined in open capillaries on a Stuart SMP3 apparatus and are uncorrected. The ¹H and ¹³C NMR spectra were measured on an AC Bruker 250 MHz spectrometer in CDCl₃ or DMSO-d₆; chemical shifts are reported in parts per million (ppm). All coupling constants (*J*) are given in Hz. MS spectra were recorded on an Agilent Technologies GC-MS instrument equipped with a 7683 injector, 6890N gas chromatograph and a 5973 mass selective detector. The mass spectrometer was operated in EI mode at 70 eV, and MS spectra were recorded from m/z 50 to 650. Elemental analyses (C, H, N, S) were used to confirm the purity of all compounds (>95%) and were performed on a CHN ThermoScientific Flash 2000 apparatus.

Thienyliminothiazolidinones **1-6** and their N-methoxyphenyl derivatives **7-11** were obtained via already reported procedures respectively [11] and [12].

3.1.1. General method for the functionalization of 5-position of the thiazolidinone.
Access to compounds **4(a-l)** and **20-24**

Thiazolidinone **4** or **19** (0.5 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) and pyrrolidine (0.5 mmol) was added. The corresponding aldehyde (0.5 mmol) was added under stirring and the mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, the precipitating product was filtered, washed with methanol (10 mL) and diethyl ether (10 mL), and dried.

It must be noted that ^{13}C NMR of some following products can not be performed due to their low solubility.

3.1.2. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})-3\text{-thienyl}] \text{imino}\}$ -5-benzylidene-1,3-thiazolidin-4-one (**4a**)

Yellow solid ; yield : 56% ; mp 269°C ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} 7.18 (s, 1 H, CH), 7.40 (s, 1 H, CH), 7.45-7.78 (m, 10 H, 10 \times CH), 12.11 (s, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ_{C} 112.8, 118.3, 121.1, 126.8, 129.1, 129.2, 129.6, 129.8, 130.6, 131.9, 132.2, 132.4, 133.3, 133.8, 141.1, 141.8; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 397.0231 ; found : 397.0256.

3.1.3. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})-3\text{-thienyl}] \text{imino}\}$ -5-(4-methoxybenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4b**)

Yellow solid ; yield : 75% ; mp 285°C ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 7.03-7.16 (m, 3 H, 3 \times CH), 7.39-7.77 (m, 8 H, 8 \times CH) , 12.17 (s, 1 H, NH); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ_{C} 55.3, 114.8, 120.9, 126.8, 126.9, 129.1, 129.2, 129.7, 130.9, 131.5, 131.7, 131.9, 132.2, 132.4, 132.6, 141.8, 160.6; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}_2 + \text{H}]^+$: 427.0336 ; found : 427.0354.

3.1.4. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})-3\text{-thienyl}] \text{imino}\}$ -5-(4-methylbenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4c**)

Yellow solid ; yield : 69% ; mp 284°C ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} 2.31 (s, 3 H, CH₃), 7.17 (s, 1 H, CH), 7.27-7.52 (m, 7 H, 7 \times CH), 7.58-7.77 (m, 3 H, 3 \times CH) , 12.26 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 411.0387 ; found : 411.0402.

3.1.5. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})-3\text{-thienyl}] \text{imino}\}$ -5-(4-chlorobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4d**)

Pale Brown solid ; yield : 71% ; mp 282°C ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} 7.16 (s, 1 H, CH), 7.39-7.77 (m, 10 H, 10 \times CH) , 12.27 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 430.9841 ; found : 430.9844.

3.1.6. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})-3\text{-thienyl}] \text{imino}\}$ -5-(4-dimethylaminobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4e**)

Orange solid ; yield : 79% ; mp 288°C ; ^1H NMR (DMSO- d_6) δ_{H} 2.96 (s, 6 H, 2 \times CH₃), 6.75-6.84 (m, 2 H, 2 \times CH), 7.15 (s, 1 H, CH), 7.36-7.71 (m, 8 H, 8 \times CH) , 12.02 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 440.0653 ; found : 440.0655.

3.1.7. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(4-bromobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4f**)

Green solid ; yield : 68% ; mp 298°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.16 (s, 1 H, CH), 7.39 (s, 1 H, CH), 7.45-7.77 (m, 9 H, 9 × CH), 12.33 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₁₂BrClN₂O₂S₂ + H]⁺ : 476.9315 ; found : 476.9322.

3.1.8. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(4-hydroxybenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4g**)

Green solid ; yield : 76% ; mp 253°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H6.84-6.92 (m, 2 H, 2 × CH), 7.13 (s, 1 H, CH), 7.38-7.70 (m, 8 H, 8 × CH) , 12.33 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C 112.4, 116.2, 118.8, 121.0, 124.2, 124.6, 126.8, 129.1, 130.1, 131.8, 132.0, 132.2, 132.4, 141.0, 141.7, 159.3; HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₁₃ClN₂O₂S₂ + H]⁺ : 413.0180 ; found : 413.0218.

3.1.9. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(2-naphtylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4h**)

Yellow solid ; yield : 89% ; mp 288°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.21 (s, 1 H, CH), 7.41-8.17 (m, 13 H, 13 × CH) , 12.29 (s, 1 H, NH), ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C 112.2, 112.8, 118.1, 120.8, 124.1, 126.7, 126.8, 128.1, 128.3, 129.1, 129.2, 129.3, 131.1, 131.3, 131.8, 132.1, 132.2, 132.4, 132.7, 134.4, 141.1, 141.9; HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₄H₁₅ClN₂O₂S₂ + H]⁺ : 447.0387 ; found : 447.0385.

3.1.10. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-heptylidene-1,3-thiazolidin-4-one (**4i**)

Brown solid ; yield : 60% ; mp 191°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H0.78-0.84 (m, 3 H, CH₃), 1.22-1.39 (m, 8 H, 4 × CH₂), 2.10-2.14 (m, 2 H, CH₂), 6.70-6.73 (m, 1 H, CH), 7.07 (s, 1 H, CH), 7.34 (s, 1 H, CH), 7.44-7.52 (m, 2 H, 2 × CH), 7.63-7.71 (m, 2 H, 2 × CH), 12.05 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C 13.9, 21.9, 27.3, 28.3, 30.9, 32.5, 112.4, 118.2, 120.9, 126.7, 129.1, 131.9, 132.2, 132.3, 132.5, 134.6, 141.0, 141.6; HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₂₁ClN₂O₂S₂ + H]⁺ : 405.0857 ; found : 405.0859.

3.1.11. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(2-pyridylmethylene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4j**)

Orange solid ; yield : 76% ; mp 291°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.11 (s, 1 H, CH), 7.31-7.50 (m, 3 H, 3 × CH), 7.59-7.92 (m, 5 H, 5 × CH), 8.67-8.75 (m, 2 H, 2 × CH), 12.19 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C 112.7, 118.3, 121.0, 123.4, 123.6, 126.7, 126.9, 127.3, 129.1, 132.3, 137.3, 137.4, 141.0, 141.7, 149.2, 151.5, 151.6; HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₁₉H₁₂ClN₃O₂S₂ + H]⁺ : 398.0183 ; found : 398.0179.

3.1.12. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(3,4-dimethoxybenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**4k**)

Yellow solid ; yield : 72% ; mp 242°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.82 (s, 3 H, OCH₃), 7.10-7.21 (m, 4 H, 4 × CH), 7.41-7.48 (m, 2 H, 2 × CH), 7.57-7.68 (m, 4 H, 4 × CH), 12.18 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₂H₁₇ClN₂O₃S₂ + H]⁺ : 457.0442 ; found : 457.0442.

3.1.13. 2-*{[5-(4-Chlorophenyl)-3-thienyl]imino}*-5-(4-fluorobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**41**)

Orange solid ; yield : 54% ; mp 223°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.18 (s, 1 H, CH), 7.30-7.51 (m, 5 H, 5 × CH), 7.60-7.77 (m, 5 H, 5 × CH), 12.21 (s, 1 H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ_C 116.2, 116.6, 121.0, 126.8, 126.9, 129.1, 129.2, 130.1, 130.5, 132.0, 132.1, 132.2, 132.4, 132.6, 141.1, 141.8; HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₁₂ClFN₂OS₂ + H]⁺ : 415.0136 ; found : 415.0160.

3.1.14. 2-*{[4-(4-Chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]imino}*-5-(4-dimethylaminobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**20**)

Orange solid ; yield : 86% ; mp > 300°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H3.05 (s, 6 H, 2 × CH₃), 6.89 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.75Hz), 7.51-7.62 (m, 5 H, 5 × CH), 8.01 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.75Hz), 7.93 (s, 1 H, CH), 12.51 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₁H₉ClN₄OS₂ + H]⁺ : 441.0605 ; found : 441.0615.

3.1.15. 2-*{[4-(4-Chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]imino}*-5-(4-methylbenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**21**)

Yellow solid ; yield : 68% ; mp > 300°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H2.38 (s, 3 H, CH₃), 7.40 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.25Hz), 7.53-7.58 (m, 4 H, 4 × CH), 7.66 (s, 1 H, CH), 7.93 (s, 1 H, CH), 7.97 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.25Hz), 12.68 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₁₄ClN₃OS₂ + H]⁺ : 412.0340 ; found : 412.0348.

3.1.16. 2-*{[4-(4-Chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]imino}*-5-(4-methoxybenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**22**)

Yellow solid ; yield : 79% ; mp > 300°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H3.86 (s, 3 H, OCH₃), 7.20 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.5Hz), 7.59-7.71 (m, 5 H, 5 × CH), 7.97 (s, 1 H, CH), 8.01 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.5Hz), 12.74 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₀H₁₄ClN₃O₂S₂ + H]⁺ : 428.0289 ; found : 428.0290.

3.1.17. 2-*{[4-(4-Chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]imino}*-5-(2-naphtylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**23**)

Yellow solid ; yield : 85% ; mp > 300°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.53-7.65 (m, 4 H, 4 × CH), 7.79 (d, 1 H, CH, *J* = 9Hz), 7.88 (s, 1 H, CH), 7.98-8.05 (m, 5 H, 5 × CH), 8.14 (d, 1 H, CH, *J* = 9Hz), 8.29 (s, 1 H, CH), 12.79 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₂₃H₁₄ClN₃OS₂ + H]⁺ : 440.0340 ; found : 440.0346

3.1.18. 2-*{[4-(4-Chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]imino}*-5-(4-fluorobenzylidene)-1,3-thiazolidin-4-one (**24**)

Yellow solid ; yield : 82% ; mp > 300°C ; ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ_H7.46-7.53 (m, 2 H, 2 × CH), 7.60 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.5Hz), 7.73-7.79 (m, 3 H, 3 × CH), 7.96 (s, 1 H, CH), 7.98 (d, 2 H, 2 × CH, *J* = 8.5Hz), 12.79 (s, 1 H, NH); HRMS (ESI) : *m/z* calcd for [C₁₉H₁₁ClFN₃OS₂ + H]⁺ : 416.0089 ; found : 416.0096.

3.1.19. General procedure for the synthesis of *N*-substituted thiazolidinones **12-17**

To a mixture of the corresponding chloroacetamide (0.5 mmol) and potassium carbonate (0.75 mmol) in acetonitrile (5 mL) was added portionwise the corresponding isothiocyanate (0.5 mmol). The mixture was then heated at 40°C overnight. After cooling to room temperature,

the mixture was poured into cold water (25 mL) and extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried with magnesium sulfate, filtered and evaporated under reduced pressure. The expected product was purified using silica gel chromatography (Eluent : Cyclohexane/Ethyl acetate 3/1).

3.1.20. 3-(4-Chlorophenyl)-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (12)

Pale brown solid ; yield : 71% ; mp 80°C ; ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} 4.03 (s, 2 H, CH_2), 6.75 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.01 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.29-7.34 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$), 7.45-7.50 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ_{C} 32.9, 110.9, 120.1, 126.7, 129.1, 129.4, 129.6, 132.6, 133.0, 133.6, 134.9, 142.7, 146.6, 155.2, 171.0; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 418.9841 ; found : 418.9835.

3.1.21. 3-Phenyl-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (13)

Pink solid ; yield : 83% ; mp 152°C ; ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} 4.05 (s, 2 H, CH_2), 6.75 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.01 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.31-7.38 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$), 7.46-7.52 (m, 5 H, $5 \times \text{CH}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ_{C} 41.3, 110.8, 120.3, 119.8, 126.7, 127.9, 129.0, 129.4, 132.7, 133.5, 134.7, 142.5, 146.4, 155.1, 171.3; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 385.0231 ; found : 385.0234.

3.1.22. 3-(4-Methylphenyl)-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (14)

Brown solid ; yield : 90% ; mp 107°C ; ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} 2.33 (s, 3 H, CH_3), 3.97 (s, 2 H, CH_2), 6.67 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 6.91 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.16 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=9\text{Hz}$), 7.18-7.21 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$), 7.39 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=9\text{Hz}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ_{C} 21.3, 32.9, 110.8, 120.3, 126.7, 127.7, 129.2, 130.1, 132.0, 132.7, 133.5, 139.2, 142.4, 147.0, 155.8, 171.4; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 399.0387 ; found : 399.0383.

3.1.23. 3-(4-Dimethylaminophenyl)-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (15)

Brown solid ; yield : 84% ; mp 123°C ; ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} 3.01 (s, 6 H, $2 \times \text{CH}_3$), 4.01 (s, 2 H, CH_2), 6.73 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 6.79 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=9\text{Hz}$), 7.03 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.18 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=9\text{Hz}$), 7.33 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8.5\text{Hz}$), 7.48 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8.5\text{Hz}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ_{C} 32.8, 40.5, 110.7, 112.6, 120.4, 126.6, 128.4, 129.0, 132.8, 133.4, 142.3, 147.3, 149.5, 150.5, 156.4, 171.8; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 428.0653 ; found : 428.0655.

3.1.24. 3-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (16)

Pale brown solid ; yield : 59% ; mp 181°C ; ^1H NMR (CDCl_3) δ_{H} 3.90 (s, 3 H, OCH_3), 3.91 (s, 3 H, OCH_3), 4.02 (s, 2 H, CH_2), 6.75 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 6.83 (d, 1 H, CH, $J=2\text{Hz}$), 6.92 (Dd, 1 H, CH, $J=8.5\text{Hz}$, $J=2\text{Hz}$), 6.95 (d, 1 H, CH, $J=8.5\text{Hz}$), 7.01 (d, 1 H, CH, $J=1.5\text{Hz}$), 7.32 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8\text{Hz}$), 7.47 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8\text{Hz}$) ; ^{13}C NMR (CDCl_3) δ_{C} 32.9, 56.0, 110.9, 111.2, 111.3, 120.3, 120.4, 126.7, 127.3, 129.0, 132.7, 133.5, 142.5, 147.0, 150.0, 155.9, 171.5; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_3\text{S}_2 + \text{H}]^+$: 445.0442 ; found : 445.0427.

3.1.25. 3-(1-Naphtyl)-2- $\{[5-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}3\text{-thienyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (**17**)

Yellow solid ; yield : 92% ; mp 98°C ; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ_{H} 4.10 (s, 2 H, CH_2), 6.65 (d, 1 H, CH, $J=2\text{Hz}$), 7.22 (d, 1 H, CH, $J=2\text{Hz}$), 7.22 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8.5\text{Hz}$), 7.36 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8.5\text{Hz}$), 7.40–7.58 (m, 4 H, $4 \times \text{CH}$), 7.85–7.93 (m, 3 H, $3 \times \text{CH}$) ; $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ_{C} 33.2, 110.8, 120.3, 121.9, 125.6, 126.6, 126.7, 126.9, 127.3, 128.8, 129.0, 129.5, 130.2, 131.5, 132.6, 133.4, 134.6, 142.4, 146.9, 155.3, 171.4; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{23}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 435.0387 ; found : 435.0376

3.1.26. General procedure for the synthesis of heteroaryliminothiazolidinones **18-19** starting from aminoheterocycle

To a solution of the corresponding heteroarylamine (10 mmol) in dry DMF (10 mL) was added dropwise chloroacetyl chloride (11 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 2h. The mixture was then poured into cold water (50 mL) and the formed precipitate was filtered, washed with water (2×10 mL) and dried.

The obtained chloroacetamide (5 mmol) was then dissolved in ethanol (20 mL) and ammonium thiocyanate was added (10 mmol). The mixture was refluxed for 3h and stirred at room temperature overnight. The precipitating product was filtered, washed with water (10 mL) and petroleum ether (10 mL), and dried.

3.1.27. 2- $\{[5-(4\text{-Chlorophenyl})\text{-}3\text{-selenophenyl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (**18**)

Brown solid ; yield : 78% ; mp 264°C ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} 4.00 (d, 2 H, CH_2 , $J=8.6\text{Hz}$), 7.48 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$), 7.61 (m, 2 H, $2 \times \text{CH}$), 7.69 (s, 1 H, CH), 8.19 (s, 1 H, CH) 11.43 (s, 1 H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} 35.4, 116.9, 123.8, 127.1, 129.1, 132.5, 134.2, 138.1, 146.7, 177.5, 187.9; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_2\text{OSSe} + \text{H}]^+$: 356.9359 ; found : 356.9354.

3.1.28. 2- $\{[4-(4\text{-chlorophenyl})\text{-}1,3\text{-thiazol-}2\text{-yl}]\text{imino}\}$ -1,3-thiazolidin-4-one (**19**)

Pink solid ; yield : 68% ; mp > 300°C ; $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ_{H} 4.03 (s, 2 H, CH_2), 7.50 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8\text{Hz}$), 7.89 (s, 1 H, CH), 7.96 (d, 2 H, $2 \times \text{CH}$, $J=8\text{Hz}$), 12.14 (s, 1 H, NH); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} 34.9, 111.2, 127.3, 128.8, 132.4, 132.8, 149.6, 163.6, 169.2, 174.1; HRMS (ESI) : m/z calcd for $[\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClN}_3\text{OS}_2 + \text{H}]^+$: 309.9870 ; found : 309.9876

3.2 Biological methods

3.2.1. Cell culture

HT29 (APC^{mut} , P53^{mut} , K-RAS^{wt}) and HCT116 (APC^{wt} , P53^{wt} , $\text{K-RAS}^{\text{mut}}$) cell lines have been established from colon adenocarcinoma tissue and represented colon cancer cell model behaving chromosomic and microsatellite instability, respectively. SW620 cells (APC^{wt} , P53^{mut} , $\text{K-RAS}^{\text{mut}}$) were originated from a lymphoid nodule and have been characterised as metastatic cells. MCF7 cells derived from mammary adenocarcinoma tissue. MDA-MB-231 cells were isolated from pleural effusion and characterised as metastatic cells. Colon cancer cells were cultivated in Dulbecco minimum essential medium DMEM (Eurobio, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated (30 min at 56°C) fetal calf serum (Eurobio), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin (Invitrogen, Paisley, UK) and 2 mM L-Glutamine (Eurobio). Mammary cancer cell were cultivated in RPMI medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2mM L-Glutamine and 1% Penicillin/streptomycin (Eurobio). Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37°C.

3.2.2. Determination of IC_{50}

IC_{50} was calculated from results obtained by the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) procedure. In brief, cancer cells were seeded in 96 well-plates at 10^4 cells/well (Dutscher, Molsheim, France). 24 hours after seeding, increasing concentrations of each compound (range from 0.01 to $100\mu\text{M}$) were added to each well for 72 hours at 37°C . After incubation, the medium was discarded and $100\mu\text{l}$ /well of MTT solution (0.5 mg/ml diluted in medium) were added and incubated for 2 hours. Water-insoluble MTT formazan blue crystals were finally dissolved in DMSO. Each plate was read at 570 nm. IC_{50} was calculated using GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data are expressed as $IC_{50} \pm \text{S.D.}$ ($n = 16$).

3.2.3. Cell growth kinetics

HT29 cells were seeded in 6 well-plates. 48 hours after seeding, cells were treated daily with each molecule over three days. Dilutions of each drug were performed in DMSO prior to addition in the cell medium. Control cells were treated with 0.1% (v/v) of DMSO. At the indicating time, cells were harvested by trypsination (Trypsin /EDTA solution, Eurobio). $100\mu\text{l}$ of cell suspension were mixed to an equal volume of 0.04% (v/v) Trypan blue dye solution and living cells were counted using a Malassez hematimeter under microscopy.

3.2.4. Cell viability assay

Cell viability assay was performed with a simultaneous double-staining procedure using 2',7' - dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, viable cells) and propidium iodide (PI, dead cells). Two days after seeding, HT29 cells were treated with each molecule corresponding to the concentration of IC_{50} value for various times up to 24 hours with the exception of compound **20** and **22**, tested at $2.5\mu\text{M}$. Cells were loaded with $50\mu\text{M}$ DCF-DA and $25\mu\text{g/ml}$ PI during 15 min at 37°C . After incubation, cells were harvested by trypsination, washed with PBS and finally suspended in 1 ml of the same buffer. Fluorescence was measured in 30 000 cells/sample by flow cytometry (FL-1 and FL-3; FACSCalibur, BD Sciences, Le Pont de Claix, France). Data are means \pm S.E.M. of triplicate determinations from two independent experiments. Results are expressed in percentage of viable cells with respect to total cells/events quantified.

3.2.5. Cell cycle analysis

HT29 cells were seeded in 6 well-plates. 48 hours after seeding, cells were treated with each molecule. Cells layers were washed twice with phosphate buffer saline (PBS), harvested by trypsination and fixed in 70% (v/v) ethanol solution for 2 hours and stored at -20°C at least 1 hour. Cells were then centrifuged at $1000g$ for 5 min at 4°C , washed with PBS and centrifuged again. Pellets were suspended in 1 ml PBS containing $50\mu\text{g/ml}$ propidium iodide, $20\mu\text{g/ml}$ of RNase A (Sigma-Aldrich France, St Quentin Fallavier, France) and 0.1 % (v/v) Triton X100 for 20 min and they were analyzed by flow cytometry (FL2-A; Calibur). Results were quantified using the CellQuest software (BD Sciences) and cell cycle distribution was analysed using Modfit software (Verity Software House, Topsham, Maine, USA). Results are expressed as percentage of treated HT29 cells in each cell cycle phase. Cells in sub-G1 fraction are expressed as the percentage of total cells analysed in each experiment.

3.2.6. Cell-living imaging

HT29 cells were seeded in 35mm petri dishes and treated with each compound over two days. After incubation, cell layers were fixed in 70% (v/v) ethanol solution for 5 min, rinsed twice

with PBS. 1 μM 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) in PBS was added for 15 min. In parallel, similar experimental conditions were carried on with supplementation of 1 μM 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) probe diluted in DMSO. JC-1 was used to demonstrate alteration of mitochondrial membrane potential (Ψm). After compound treatment, JC-1 probe was added to the medium for 15 min at 37°C. The protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) at 50 μM for 15 min was used in order to dissipate Ψm which can be visualized by the absence of J-aggregates under red fluorescent filter. After incubation, cell layers were washed rapidly with warmed PBS (37°C) twice. Pictures were captured under UV fluorescent microscopy (Nikon Eclipse 80i, Nikon) equipped with a digital camera (DXM1200F, Nikon). They were further processed using NIS-Element AR 2.3 software (Nikon).

3.2.7. Quantification of oxygen and nitric oxide-derived species

Two days after seeding, HT29 cells were treated with each molecule corresponding to the concentration of IC_{50} value for various times up to 24 hours with the exception of compound **20** and **22**, tested at 2.5 μM . Cells were loaded with 50 μM DCF-DA during 15 min at 37°C for ROS detection, 1 μM DAF-2DA during 30 min at 37°C for RNS detection, or 25 μM DHR during 20 min at 37°C for peroxynitryl radical detection. Cell exposure to 1mM tert-butyl for one hour was used as a positive ROS-induced control. After incubation, cells were harvested by trypsination, washed with PBS and finally suspended in 1 ml of the same buffer. Fluorescence was measured in 30 000 cells/sample by flow cytometry (FL-1). When used, 1mM ascorbic acid, as an antioxidant, was added one hour before drug treatment and cells were prepared as described. Results were expressed as percentage of results obtained with treated cells related to cells treated with DMSO used as compound diluent.

3.2.8. GSH content determination

HT29 cells were grown in 6 well-plates. 48 hours after seeding, cells were exposed to each molecule corresponding to the concentration of IC_{50} value for 24 hours. Cell layers were washed three times with ice-cold PBS. They were then scrapped with 10% (v/v) perchloric acid ice-cold solution (pH 8.0) containing 2 mM EDTA. The homogenates were centrifuged at 15 000 g for 15 min at 4°C. The supernatant were stored at -80°C until analysis. GSH content was determined by a fluorescence-based microtiter plate method [22]. Perchloric acid-precipitated proteins (pellets) were solubilized in daily made 1 N NaOH prior to protein content determination using a modification of the procedure of Lowry et al. [23]. GSH contents were calculated as nanomole of GSH/mg of protein. Results are expressed in percentage as content of intracellular GSH related to that in DMSO-treated cells (relative GSH content).

3.2.9. Western blotting

HT29 cells were seeded in 25 cm^2 -flasks. Total protein homogenates were prepared from drug- and DMSO-treated cells as follows; cell layers were washed twice with ice cold PBS and they were scrapped with 25 mM Hepes/KOH (pH 7.5) buffer containing 10 mM EDTA, 40 mM KCl, 0.5 % (v/v) Igepal (Nonidet P40), 1 mM DTT and 0.1% (v/v) protease inhibitor mixture (Sigma). Homogenates were collected and left on ice for 30 min before centrifugation at 15,000g for 30 min at 4°C. Supernatants were stored at -80°C until use. 50 μg protein from whole cell homogenates were resolved in 10-15% SDS PAGE and they were transferred onto nitrocellulose membranes. The saturation step was performed in Tris saline buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.4) containing 0.15 M NaCl and 0.01 % (v/v) Tween 20), supplemented with 5% (w/v) non-fat milk or BSA. The primary antibody prepared in the same buffer was then

added. Membranes were incubated overnight at 4°C. The following antibodies were used: antibody against GCL (5529-1; Epitomics), HO-1 (1922-1; Epitomics), NQO-1 (2618-1; Epitomics) and GAPDH (MAB374; Millipore). Washing steps (3 times for 5 min) were performed with Tris saline buffer. The blots were then incubated 45 min in this buffer containing the horseradish peroxidase-conjugated species-specific antibody, and finally washed 3 times for 5 min with the same buffer. Blots were developed by chemo-luminescence detection according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Biotech).

3.2.10. Detection of autophagy process

HT29 cells were seeded in 6 well-plates and they were treated as described before for two days with daily medium changes. Cells were incubated with 1µg/ml acridine orange for 15 min, then harvested by trypsination and suspended in PBS before flow cytometry analysis. Fluorescence (FL-3) was measured in 30 000 cells/sample. Results were analysed using CellQuest and Cyflogic software and they are expressed in arbitrary unit related to those obtained with DMSO-treated cells. In parallel, cells were cultivated in 25 cm²-flasks and treated as described. Total protein homogenates were prepared and western blots were performed as described, using Beclin-1 (1:500, BD Biosciences) and GAPDH antibodies, respectively, as a marker of autophagosome formation and an internal marker for protein loading.

3.2.11. Statistics

Differences between results from control and drug-treated cells were analysed by Student's t test and any difference was considered significant at $p < 0.05$.

Acknowledgments

We thank the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' for Ph.D. grants to G.R. and S. H.-V.

References

1. E. Pasquier, S. Honore, D. Braguer, Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand?, *Drug Resist. Updat.* 9 (2006) 74-86.
2. L.T. Vassilev, C. Tovar, S. Chen, D. Knezevic, X. Zhao, H. Sun, D.C. Heimbrook, L. Chen, Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103 (2006) 10660-10665.
3. A.C. Tripathi, S.J. Gupta, G.N. Fatima, P.K. Sonar, A. Verma, S.K. Saraf, 4-thiazolidinones: the advances continue..., *Eur. J. Med. Chem* 72 (2014), 52-77 and references therein.
4. P.C. Unangst, D.T. Connor, W.A. Cetenko, R.J. Sorenson, C.R. Kostlan, J.C. Sircar, C.D. Wright, D.J. Schrier, R.D. Dyer, Synthesis and biological evaluation of 5-[[3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-4-hydroxyphenyl)methylene]oxazoles, -thiazoles, and -imidazoles: novel dual 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors with anti-inflammatory activity, *J. Med. Chem.* (1994) 322-328.

5. K. Omar, A. Geronikaki, P. Zoumpoulakis, C. Camoutsis, M. Sokovic, C. Ciric, J. Glamoclija, Novel 4-thiazolidinone derivatives as potential antifungal and antibacterial drugs, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 426-432.
6. P. Vicini, A. Geronikaki, M. Incerti, F. Zani, J. Dearden, M. Hewitt, 2-Heteroarylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones analogues of 2-thiazolylimino-5-benzylidene-4-thiazolidinones with antimicrobial activity: synthesis and structure-activity relationship, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 3714-3724.
7. S. Xu, W. Guo, F. Teraishi, J. Pang, K. Kaluarachchi, L. Zhang, J. Davis, F. Dong, B. Yan, B. Fang, Anticancer activity of 5-benzylidene-2-phenylimino-1,3-thiazolidin-4-one (BPT) analogs, *Med. Chem.* (2006) 597-605.
8. H.Y. Zhou, S.H. Wu, S.M. Zhai, A.F. Liu, Y. Sun, R.S. Li, Y. Zhang, S. Ekins, P.W. Swaan, B.L. Fang, B. Zhang, B. Yan, Design, synthesis, cytoselective toxicity, structure-activity relationships, and pharmacophore of thiazolidinone derivatives targeting drug-resistant lung cancer cells, *J. Med. Chem.* 51 (2008) 1242-1251.
9. R. Ottana, S. Carotti, R. Maccari, I. Landini, G. Chiricosta, B. Caciagli, M.G. Vigorita, E. Mini, In vitro antiproliferative activity against human colon cancer cell lines of representative 4-thiazolidinones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3930-3933.
10. S. Wang, Y. Zhao, G. Zhang, Y. Lv, N. Zhang, P. Gong, Design, synthesis and biological evaluation of novel 4-thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3509-3518.
11. I. Abdillahi, G. Revelant, Y. Datoussaid, G. Kirsch, Synthesis of novel 2-thienylimino-1,3-thiazolidin-4-ones, *Synthesis* (2010) 2543-2546.
12. G. Revelant, S. Hesse, G. Kirsch, Synthesis of novel N-substituted 2-(hetero)arylimino-1,3-thiazolidin-4-ones, *Synthesis* (2010) 3319-3324.
13. G. Revelant, S. Hesse, G. Kirsch, Synthesis of novel 2-aminothieno[3,2-d]thiazoles and selenolo[3,2-d]thiazoles, *Tetrahedron* (2011) 9352-9357.
14. F. Teraishi, S. Wu, J. Sasaki, L. Zhang, W. Guo, J.J. Davis, F. Dong, B. Fang, Identification of a novel synthetic thiazolidin compound capable of inducing c-Jun NH2-terminal kinase-dependent apoptosis in human colon cancer cells, *Cancer Res* 65 (2005) 6380-6387.
15. M. Dodson, V. Darley-Usmar, J. Zhang, Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 63 (2013) 207-221.
16. Z. Liu, M.J. Lenardo, Reactive oxygen species regulate autophagy through redox-sensitive proteases, *Dev. Cell* 12 (2007) 484-485.
17. S.K. Niture, J.W. Kaspar, J. Shen, A.K. Jaiswal, Nrf2 signaling and cell survival, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244 (2010) 37-42.
18. T. Xie, A.K. Jaiswal, AP-2-mediated regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) gene expression, *Biochem Pharmacol* 51 (1996) 771-778.

19. J. Wu, H. Xu, P.F. Wong, S. Xia, J. Xu, J. Dong, Icaritin attenuates cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells via activation of PI3K-AKT and Nrf2 signaling, *Food Chem. Toxicol.* 64 (2014) 307-313.
20. D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 579-591.
21. M.M. Hippert, P.S. O'Toole, A. Thorburn, Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer Res.* 66 (2006) 9349-9351.
22. K. Lewicki, S. Marchand S, L. Matoub, J. Lulek, J. Coulon J, P. Leroy, Development of a fluorescence-based microtiter plate method for the measurement of glutathione in yeast. *Talanta* 70 (2006) 876-882.
23. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265-275.

Résumé / Summary

La Pioglitazone appartient à la famille des thiazolidinédiones et le Fénofibrate à la famille des fibrates. Ces molécules sont, respectivement, des agonistes synthétiques du récepteur activable par les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ) et PPAR α , membres de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones. Le traitement de cellules cancéreuses humaines par ces molécules limite la croissance et peut induire leur apoptose. Cependant, l'impact de ces traitements sur la survie des cellules cancéreuses est en partie dû à une action indépendante de l'activation du récepteur et met en cause la génération d'un stress oxydant.

Au cours de ces travaux, l'impact du traitement par la Pioglitazone et le Fénofibrate a été évalué sur la survie de cellules colorectales humaines avec une focalisation sur les variations du statut redox des cellules. Dans le cadre de ces travaux, un analogue de la Pioglitazone, la Δ Pioglitazone, qui ne permet pas l'activation de PPAR γ , a été synthétisé. Concernant PPAR α , nous avons utilisé un antagoniste connu, MK866. Les effets de ces molécules ont été testés sur deux lignées cellulaires établies à partir de cancer colique, HT29 et HCT116.

Le traitement par ces molécules limite la croissance des cellules sans induire de processus apoptotique. La production d'espèces réactives, mise en évidence, est responsable d'une diminution du contenu en glutathion intracellulaire. Le stress oxydant généré suite au traitement par la Pioglitazone et la Δ Pioglitazone induit l'activation de la voie de signalisation antioxydante Nrf2/Keap1 et l'expression de ses gènes-cibles HO-1 et NQO1. En revanche, bien qu'il induise la production d'un stress oxydant, le Fénofibrate n'entraîne aucune activation de cette voie. De plus, ces trois composés sont responsables d'une modification du métabolisme cellulaire en faveur de la glycolyse. En effet, elles augmentent la consommation de glucose et la production de lactates, notamment *via* une augmentation de l'expression de l'hexokinase 2.

Parallèlement, l'impact de dérivés 4-thiazolidinones, analogues des thiazolidinédione, synthétisés au laboratoire, a été testé. L'effet de ces molécules a été évalué sur la survie cellulaire et le statut redox des cellules HT29. Plusieurs composés présentent une activité antiproliférative et sont capables de générer un stress oxydant sans activer la voie Nrf2/Keap1.

Mots clés : ligands de PPAR, dérivé de thiazolidine, stress oxydant, métabolisme, cancer du colon

Peroxisome Proliferator-activated Receptors (PPAR) are members of the nuclear receptor family. Pioglitazone and Fenofibrate belong respectively to the thiazolidinedione and fibrate family. Pioglitazone is an agonist of PPAR γ isotype whereas Fenofibrate is an agonist of PPAR α isotype. Cancer cell exposure to each ligand inhibits cell growth and triggers apoptosis cell death. However, the effects of respective PPAR ligand on cell survival were found to be independent of receptor activation and were associated to redox changes within the cells.

Herein, we assessed whether Pioglitazone or Fenofibrate treatment could block cell growth and alter redox status in colorectal cells. In order to discriminate PPAR independent from PPAR dependent activation, an analogue of Pioglitazone, Δ -Pioglitazone was synthesized. The molecule binds to PPAR γ without activating it. Furthermore, MK866, an antagonist of PPAR α , was used and two cancer cell lines established from human colon adenocarcinoma, HT29 and HCT116 were tested.

Cell exposure to each molecule inhibited cell growth but cells did not undergo apoptosis cell death. Cell treatment induced the production of reactive species and the decrease of intracellular glutathione content. Pioglitazone or Δ -Pioglitazone-mediated oxidative stress triggered the activation of the Nrf2/Keap1 pathway as assessed by the increases of Nrf2 target genes expression such as HO-1 and NQO1. In contrast, Fenofibrate treatment increased reactive species production but did not activate this pathway. Moreover, cell exposure to Pioglitazone, Δ -Pioglitazone or Fenofibrate modulated cell metabolism, notably by enhancing glycolysis as assessed by glucose consumption and lactate production *via* the increase of hexokinase 2 expression.

In parallel, impact of 4-thiazolidinone derivatives synthesized in the laboratory was tested. These molecules are analogues of thiazolidinedione. Effect of 4-thiazolidinone treatments was assessed to cell growth arrest and redox changes within the HT29 cells. Several molecules have anti-proliferative effect and are able to generate oxidative stress without Nrf2/Keap1 pathway activation.

Keywords : PPAR ligands, thiazolidine derivatives, oxidative stress, metabolism, colon cancer