



HAL
open science

Evaluation biologique de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans des lignées d'adenocarcinomes mammaires humains

Elodie Viry

► **To cite this version:**

Elodie Viry. Evaluation biologique de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans des lignées d'adenocarcinomes mammaires humains. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2010. Français. NNT : 2010METZ013S . tel-01752701

HAL Id: tel-01752701

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752701>

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>

UNIVERSITÉ PAUL VERLAINE – METZ – 2010
FACULTÉ DES SCIENCES
ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE SANTÉ ET ENVIRONNEMENT »

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PAUL VERLAINE – METZ
Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue par
Elodie Viry
Le 05 novembre 2010

ÉVALUATION BIOLOGIQUE DE L'INHIBITION DES PHOSPHATASES CDC25 DANS DES LIGNÉES D'ADÉNOCARCINOMES MAMMAIRES HUMAINS

Directeur de thèse : Pr. Denyse BAGREL
Co-encadrant : Dr Marc DIEDERICH

JURY

Rapporteurs

Pr. Bernard DUCOMMUN, Université Paul Sabatier, Toulouse
Dr Grégoire PREVOST, Directeur de Recherche IPSEN, Les Ulis

Examineurs

Pr. Denyse BAGREL, Université Paul Verlaine, Metz
Dr Marc DIEDERICH, Directeur de Recherche LBMCC, Luxembourg
Pr. Claus JACOB, Saarland University, Saarbruecken

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique
Université Paul Verlaine - Metz, EA3940, Dir. G. Kirsch
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées, Campus Bridoux (P7), Rue Claude Bernard, 57070

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (EA 3940) dans l'équipe de Biochimie sous la direction du Pr. Denyse BAGREL – Campus Bridoux, Ufr SciFA, Université Paul Verlaine - Metz, rue du Général Delestraint, 57070, Metz, France.

J'ai été bénéficiaire d'une allocation de recherche attribuée par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche.

Publications :

Viry E., Battaglia E., Deborde V., Müller T., Réau R., Davioud-Charvet E., Bagrel. D. A Sugar-Modified Phosphole Gold Complex with Antiproliferative Properties Acting as a Thioredoxin Reductase Inhibitor in MCF-7 Cells. *Chem. Med. Chem.* 11 (2008) 1667-1670.

Valente S., Bana E., Viry E., Bagrel D., Kirsch G. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin-Based Inhibitors of CDC25 Phosphatases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5827-5830.

Viry E., Anwar A., Kirsch G., Jacob C., Diederich M. and Bagrel D. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *Int. J. Oncol.* (sous presse)

Communications orales :

Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases.

Auditorium of the Kirchberg Hospital, Luxembourg, November 17, 2009.

Inhibition of CDC25A and C by natural tetrasulfides induces G2/M-phase arrest in human breast cancer cells.

Seminar on Health promoting compounds in plants at Gabriel Lippmann Center, Belvaux (Luxembourg), May 7, 2010.

Communications affichées :

Viry E., Begouin A., Hesse S., Bagrel D., Kirsch G. Synthèse et évaluation biologique de thiénoypyrimidinones comme inhibiteurs des phosphatases CDC25.

1er Forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, France, 19 octobre, 2007.

Viry E., Battaglia E., Deborde V., Réau R., Davioud-Charvet E., Bagrel D. A sugar-modified phosphole gold complex as inhibitor of thioredoxin reductase activity with antiproliferative properties in MCF-7 cells.

Apoptosis World 2008 From mechanisms to applications, Luxembourg, January 23-26, 2008.

Viry E., Anwar A., Jacob C., Kirsch G., Bagrel D. Évaluation biologique de composés organosoufrés naturellement présents dans l'ail et l'oignon comme inhibiteurs des phosphatases CDC25.

2^{ème} Forum du Cancéropôle Grand-Est, Vittel, France, 17 octobre, 2008.

Viry E., Anwar A., Diederich M., Jacob C., Kirsch G., Bagrel D. Evaluation du potentiel anticancéreux de dérivés tétrasulfurés naturellement présents dans l'ail et l'oignon sur des cellules de cancer du sein.

3^{ème} Forum du Cancéropôle Grand-Est, Strasbourg, France, 19-20 novembre 2009.

Viry E., Anwar A., Kirsch G., Jacob C., Diederich M., Bagrel D. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases.

Inflammation 2010, Luxembourg, January 27-30, 2010.

Évaluation biologique de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires humains

Résumé :

Les phosphatases CDC25 sont des enzymes clés qui interviennent dans la progression du cycle cellulaire en régulant l'activité des kinases dépendantes des cyclines (Cdk) par une déphosphorylation très spécifique. Ces phosphatases sont des cibles thérapeutiques intéressantes car leur surexpression, notamment dans le cancer du sein, a pu être corrélée au développement de résistance à certains agents anticancéreux ainsi qu'à un mauvais pronostic. Ce projet vise à évaluer le système des phosphatases CDC25 en tant que cibles intéressantes dans le traitement du cancer du sein.

Dans un premier temps, nous avons évalué le pouvoir inhibiteur de nombreuses molécules sur l'activité CDC25 *in vitro*. Ces essais préliminaires nous ont conduit à nous intéresser à deux composés organosoufrés naturellement présents dans l'ail et l'oignon qui restent encore peu étudiés à ce jour, les diallyl- (**DAS₄**) et dipropyl- (**DPS₄**) tétrasulfures. Ces derniers sont capables d'inhiber, de manière irréversible, les phosphatases CDC25A et C *in vitro* ($CI_{50} = 16,4 \pm 5,5 \mu\text{M}$ et $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ pour **DAS₄** et $CI_{50} = 16,6 \pm 5,5 \mu\text{M}$ et $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ pour **DPS₄** vis-à-vis des activités CDC25A et C, respectivement).

Dans un second temps, le potentiel anticancéreux des composés **DAS₄** et **DPS₄** a été confirmé sur des cellules d'adénocarcinome mammaire humain : MCF-7 et MDA-MB-231 (lignées sensibles) et Vcr-R (lignée résistante). La croissance des cellules sensibles et résistantes est apparue significativement altérée par ces deux composés et a pu être associée à un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. Ce blocage concorde avec l'accumulation de pCdk1 et 2 observée après des traitements de courte durée (6 h) des cellules MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄**. D'autre part, ces observations sont en adéquation avec l'inhibition des phosphatases CDC25A et C observée sur les enzymes purifiées *in vitro*. Par ailleurs, l'étude de l'induction de l'apoptose dans le cas des cellules MCF-7 a révélé l'implication des protéines de la famille Bcl-2, et par conséquent de la mitochondrie dans la mise en place de ce processus. Nos résultats ont également suggéré que l'activité pro-apoptotique des composés **DAS₄** et **DPS₄** est indépendante de la production d'espèces réactives oxygénées.

Tous ces résultats suggèrent que l'inhibition des phosphatases CDC25A et C serait un des mécanismes qui contribuerait à l'activité anticancéreuse des composés organosoufrés.

Enfin, l'étude de l'impact cellulaire de l'inhibition post-transcriptionnelle de CDC25A et/ou C reste encore trop préliminaire pour pouvoir préciser le rôle de chaque isoforme dans les cellules MCF-7. La comparaison des résultats obtenus avec les approches d'inhibition chimique et post-transcriptionnelle n'a pas permis de confirmer ou d'infirmer l'efficacité inhibitrice de **DAS₄** et **DPS₄** vis-à-vis des deux isoformes de CDC25 ciblés dans les cellules.

Mots clés : Cancer du sein, inhibiteur de CDC25, cycle cellulaire, apoptose, tétrasulfures.

Biological evaluation of the inhibition of the CDC25 phosphatases in human breast cancer cells

Abstract :

The CDC25 phosphatases are important regulators of eukaryotic cell cycle progression and play a crucial role in the activation of cyclin-dependent kinases (Cdk) by dephosphorylating the phospho-Thr14 and phospho-Tyr15 residues. CDC25s are attractive targets in cancer therapy because their over-expression was reported in various types of human malignancies, including breast cancer, and this has been correlated with either poor prognosis or tumor aggressiveness. Our study aims to evaluate the CDC25s as interesting targets in breast cancer treatment.

First, we have investigated the inhibitory potential of various compounds towards the CDC25 phosphatases *in vitro*. These preliminary screenings have reported the inhibitory activity of tetrasulfides occurring naturally in garlic and onion towards the human CDC25 phosphatases. Diallyl- (**DAS₄**) and dipropyltetrasulfides (**DPS₄**) have emerged as interesting irreversible inhibitors of the CDC25 isoforms A and C *in vitro* ($IC_{50} = 16.4 \pm 5.5 \mu\text{M}$ and $1.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for **DAS₄** and $IC_{50} = 16.6 \pm 5.5 \mu\text{M}$ et $1.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$ for **DPS₄** towards CDC25A and C, respectively).

Then, we have investigated the anticancer properties of **DAS₄** et **DPS₄** on both sensitive (MCF-7 and MDA-MB-231) and resistant (Vcr-R) human breast carcinoma cell lines. Experiments performed on cultured cells have showed that growth of both sensitive and resistant cells was significantly decreased by these tetrasulfides and appeared to be associated with a G2/M cell cycle arrest. Furthermore, these compounds appeared to induce accumulation of pCdk1 and 2 after short time treatment (6 h) of MCF-7 cells. These results obtained in cells are in agreement with the inhibition of CDC25C and A observed *in vitro* on purified enzyme. In addition, analysis of apoptosis induction in MCF-7 cells after treatment with **DAS₄** et **DPS₄** have shown the involvement of the Bcl-2 family members and mitochondria in this process. Our results also suggested that of **DAS₄** and **DPS₄** induce the apoptosis in MCF-7 cells without affecting reactive oxygen species production.

Taken together, these results suggest phosphatases CDC25A and C as possible targets of naturally occurring polysulfides contributing to their anticancer properties.

Finally, we have studied the cellular impact of the post-transcriptional inhibition of CDC25A and/or C in MCF-7 by using specific siRNA. However, the results obtained did not allow us to confirm or to discard the involvement of the inhibition of CDC25A and C by **DAS₄** and **DPS₄** leading to their antiproliferative effects.

Keywords: Breast cancer, CDC25 inhibitor, cell cycle, apoptosis, tetrasulfides

Liste des abréviations

ADN : Acide DéoxyriboNucléique
APC : Anaphase Promoting Complex
ARN : Acide RiboNucléique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : ATM and Rad3 related
CAK : Cdk Activating Kinase
CCCP : Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CDC25 : Cell Division Cycle 25
Cdk : Cyclin-Dependent Kinase
Chk : Checkpoint kinase
CI₅₀ : Concentration Inhibitrice 50
CKI : Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
C-TAK1 : CDC25C Associated Kinase 1
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DCF : 2',7'-DiChloroFluoresceine
DMSO : DiMéthylSulfOxide
DNase : DéoxyriboNucléase
DSP : Phosphatases à Double Spécificité
DTT : DiThioThréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétra acétique
EGCG : EpiGalloCatéchine-3-Gallate
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
GSH : Glutathion réduit
GST : Glutathion-S-Transférase
H₂DCF-DA : 2',7'-DiChlorodihydroFluoresceine DiAcétate
IP : Iodure de Propidium
IPTG : IsoPropyl-Thio-β-Galactoside
LB : Luria-Bertani
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MTT : Bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium ou bleu de thiazole
NES : Nuclear Export Signal
NLS : Nuclear Localisation Signal
OMF : 3-O-MéthylFluorescéine
OMF-P : 3-O-MéthylFluorescéine Phosphate
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OSC : OrganoSulfur Compounds
PAL : Phosphatase alcaline
PARP : Poly-(ADP-ribose) polymérase
PBS : Phosphate-Buffer Saline
P-gp : GlycoProtéine P
Plk : Polo-Like Kinase
PMSF : Phénylméthylsulphonyl fluoride
pRb : protéine du Rétinoblastome
PTP : Protéines Tyrosine Phosphatase
RNase A : RiboNucléase A
RT-PCR : Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate- PolyAcrylamide Electrophoresis

SiRNA : Small interfering RNA

UV : Ultra- Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	15
1 Le cancer	16
1.1 Généralités	16
1.2 Cancer et substances naturelles	17
1.3 Les approches thérapeutiques	24
2 Le cycle cellulaire	26
2.1 La régulation du cycle cellulaire	27
2.1.1 La transition G0/G1	29
2.1.2 La progression en G1 et la transition G1/S	30
2.1.3 La phase S	30
2.1.4 La phase G2 et la transition G2/M	31
2.1.5 La mitose	32
2.2 Les points de contrôle	33
2.2.1 Le point de contrôle G1/S	33
2.2.2 Le point de contrôle G2/M	34
2.2.3 Le point de contrôle métaphase/anaphase	35
3 Les phosphatases CDC25 (<i>Cell Division Cycle 25</i>)	35
3.1 Généralités	35
3.2 Structure	35
3.3 Mécanisme catalytique	38
3.4 Rôles de différentes isoformes de CDC25 au cours du cycle cellulaire	39
3.5 Régulation	41
3.5.1 Régulation de l'abondance cellulaire	41
3.5.2 La localisation subcellulaire	43
3.5.3 Régulation de l'activité par phosphorylation	45
3.5.4 Régulation redox de l'activité CDC25	46
4 CDC25 et cancer	48
4.1 Phosphatases CDC25 : cibles d'intérêt dans le cancer ?	48
4.2 Les approches thérapeutiques	51
4.2.1 Le développement d'inhibiteurs de CDC25	52
4.2.2 Les activateurs de CDC25	52
5 Les inhibiteurs des phosphatases CDC25	53
5.1 Les produits naturels	53
5.2 Les composés de synthèse	57
5.2.1 Les quinones	57
5.2.1.1 Les para-quinones	58
5.2.1.2 Les ortho-quinones	61
5.2.1.3 Composé bis-quinonique	63
5.2.2 Les composés non-quinoniques	63
5.2.2.1 Les composés mimant le groupement phosphate	64
5.2.2.2 Les inhibiteurs électrophiles	65
5.2.2.3 Les autres composés	66

OBJECTIFS ET STRATÉGIES	71
1 Objectifs	72
2 Stratégies	72
2.1 Recherche d'inhibiteurs chimiques de CDC25	72
2.2 Effets cellulaires d'inhibiteurs chimiques de CDC25	73
2.3 Validation de la cible pharmacologique	73
RÉSULTATS ET DISCUSSION	74
1 Criblage <i>in vitro</i> d'inhibiteurs des phosphatases CDC25	75
1.1 Production des enzymes purifiées	75
1.2 Optimisation de la mesure d'activité phosphatase en fluorimétrie	76
1.3 Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25	79
1.3.1 Dérivés pyrazole	80
1.3.2 Dérivés aminothiophène carboxylate	81
1.3.3 Sels de pyridinium	82
1.3.4 Composés mésoioniques dérivés de pyridine	83
1.3.5 Dérivé thienopyrrolizone	84
1.3.6 Dérivés benzopyrones	85
1.3.7 Dérivés quinoniques	85
1.3.8 Dérivés stéroïdiens	87
1.3.9 Composés naturels organosoufrés	88
2 Effets cellulaires des polysulfures DAS4 et DPS4, inhibiteurs de CDC25	94
2.1 Caractérisation des modèles cellulaires	95
2.2 Activité antiproliférative des inhibiteurs de CDC25	97
2.2.1 Effets sur les lignées cellulaires sensibles	97
2.2.2 Effets sur la lignée cellulaire résistante (Vcr-R)	100
2.3 Analyse du cycle cellulaire	101
2.4 Induction de l'apoptose	106
2.4.1 Mise en évidence de l'apoptose	106
2.4.2 Caractérisation du mécanisme apoptotique	108
2.4.3 Implication du stress oxydant	111
2.5 Inhibition des phosphatases CDC25 dans les cellules MCF-7	111
2.6 Conclusion	114
3 Validation de la cible pharmacologique	116
3.1 Validation de la transfection des cellules MCF-7 par les siRNA	117
3.2 Etude de la prolifération cellulaire	119
3.3 Analyse du cycle cellulaire	121
3.4 Induction de l'apoptose	123
3.5 Inhibition post-transcriptionnelle vs inhibition chimique de CDC25A et C	124

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	126
MATÉRIELS ET MÉTHODES	130
1 Production des phosphatases CDC25 purifiées et mesure d'activité <i>in vitro</i>	131
1.1 Expression et purification des protéines de fusion GST-CDC25A, B et C	131
1.1.1 Préparation des cellules compétentes	132
1.1.2 Transformation des cellules compétentes	132
1.1.3 Cultures bactériennes	132
1.1.4 Extraction des protéines de fusion GST-CDC25	133
1.1.5 Purification des GST-CDC25	133
1.2 Mesure de l'activité phosphatase des CDC25 <i>in vitro</i>	133
2 Culture cellulaire	135
2.1 Les lignées cellulaires	135
2.2 Conditions de culture	135
2.3 Congélation et décongélation des cellules	135
2.4 Traitement et récupération des cellules en culture	136
2.5 Transfection transitoire des cellules MCF-7 par des ARN interférents (siRNA)	136
3 Mesure de la viabilité cellulaire	137
3.1 Test de cytotoxicité au MTT	137
3.2 Test d'exclusion au bleu Trypan	138
3.3 Détection de l'apoptose en microscopie à fluorescence	138
3.4 Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial	138
4 Etude de l'expression des gènes (RT-PCR)	139
4.1 Extraction des ARN totaux à partir des culots cellulaires	139
4.2 Rétrotranscription des ARNm	140
4.3 Amplification des ADNc par PCR	140
5 Western blot	142
5.1 Préparation des échantillons cellulaires	142
5.2 Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)	143
5.3 Immunoblot	143
6 Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	144
7 Evaluation du stress oxydant cellulaire	145
8 Dosage de protéines par la méthode de Lowry	145

9 Analyses statistiques	145
BIBLIOGRAPHIE	146
ANNEXES	160
Annexe 1.....	162
Annexe 2.....	163
Annexe 3.....	166
Annexe 4.....	168
Annexe 5.....	169
Annexe 6.....	170
Annexe 7.....	172
Annexe 8.....	174
Annexe 9.....	175

INTRODUCTION

1 Le cancer

1.1 Généralités

Le cancer est une pathologie qui survient à la suite de la modification d'une seule cellule. Cette modification peut être provoquée par des agents exogènes ou des facteurs génétiques héréditaires. La transformation cellulaire tumorale se traduit notamment par une perte de contrôle du cycle cellulaire, une prolifération rapide des cellules anormales et une insensibilité à l'apoptose. Ces transformations peuvent conduire à l'apparition d'une tumeur qui est un ensemble hétérogène constitué de plusieurs populations cellulaires possédant des phénotypes différents. Certaines tumeurs peuvent laisser échapper des cellules tumorales qui vont envahir d'autres organes, formant des métastases. Celles-ci sont la principale cause des décès par cancer.

Avec 7,9 millions de décès en 2007 (soit 13 % de la mortalité mondiale), le cancer constitue un problème de santé majeur dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que d'ici 2030, le nombre de décès par cancer devrait poursuivre sa progression pour atteindre 12 millions de personnes. Les cancers du poumon, de l'estomac, du foie, du colon et du sein sont parmi les plus meurtriers.

Les estimations les plus récentes concernant l'incidence et la mortalité des cancers en Europe reposent sur les statistiques publiées par diverses organisations comme l'OMS, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC), le Réseau Européen des Registres des Cancers (ENCR)... On estime à 3,2 millions le nombre de cas de cancers diagnostiqués en Europe en 2008 et à 1,72 millions le nombre de morts (Ferlay *et al.* 2010). Comme indiqué en **figure 1**, le cancer du sein demeure le cancer le plus fréquent chez la femme (28,2 % des cas de cancer) et représente également le premier cancer en terme de mortalité (17 % des cas de mort par cancer chez la femme).

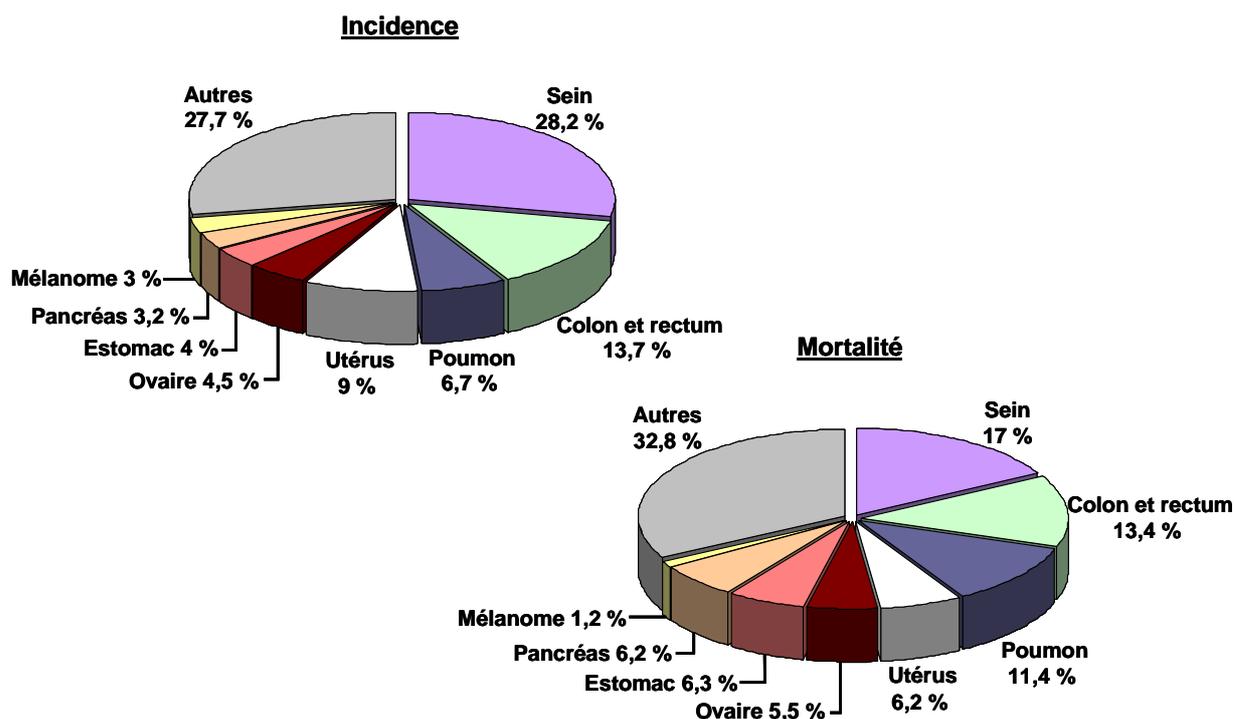


Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers chez la femme en Europe en 2008 (adaptée de Ferlay *et al.* 2010)

En Europe, la France est un pays à fort taux d'incidence du cancer du sein (36,7 % des cancers féminins d'après Belot *et al.* 2008). On estime qu'une femme sur dix développera un cancer du sein au cours de sa vie. Cette incidence croît régulièrement depuis 1980 (+ 2,4 % en moyenne par an) mais, à l'inverse, le taux de mortalité décroît doucement depuis les années 2000 (- 1,3 % en moyenne par an). Cette évolution peut s'expliquer, d'une part, par les changements de comportements et d'habitudes de vie, et d'autre part, par un meilleur dépistage et un diagnostic plus précoce des cancers.

Le cancer demeure donc un problème majeur de santé publique du fait de sa morbidité élevée. Ainsi, les améliorations qui peuvent être obtenues en matière de mortalité vont dépendre non seulement de la mise en place de programmes de prévention et de dépistage précoce des cancers mais aussi du développement des nouvelles approches thérapeutiques.

1.2 Cancer et substances naturelles

Le cancer est une maladie chronique multifactorielle dont la survenue dépend de facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux. Parmi les facteurs environnementaux, l'alimentation joue un rôle essentiel et fait partie des facteurs sur lesquels il est possible

d'agir. Depuis quelques années, la prévention est devenu un enjeu majeur dans la lutte contre le cancer. En effet, selon une étude réalisée par l'OMS en 2005, il serait possible de diminuer d'environ 30 % l'incidence des cancers en évitant les principaux facteurs de risque (le tabagisme, l'obésité, la sédentarité, la consommation d'alcool...) et en adoptant une alimentation saine, riche en fruits et légumes. Depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence le lien entre la consommation de certains aliments et l'existence d'activités chimiopréventives vis-à-vis du cancer. Ces recherches confrontent des données issues d'études épidémiologiques et de travaux réalisés sur des modèles cellulaires et animaux de cancer. L'efficacité d'une molécule chimiopréventive est évaluée par sa capacité à interférer avec les différentes étapes de la cancérogenèse : l'initiation, la promotion et la progression (**figure 2**). La cancérogenèse peut être définie comme l'ensemble des processus conduisant à la formation d'une tumeur (Surh 2003). L'initiation, qui est la première étape, est l'acquisition par une cellule de modifications génétiques irréversibles. Lors de la promotion, des changements épigénétiques conduisent à la prolifération anormale des cellules initiées et à la formation de foyers préneoplasiques. L'apparition de tumeurs dotées de pouvoir invasif se fait lors l'étape de progression. Un grand nombre de substances naturelles, potentiellement chimiopréventives, ont été isolées et font à présent l'objet de nombreuses études (pour des revues voir Aggarwal et Shishodia 2006, Stan *et al.* 2008).

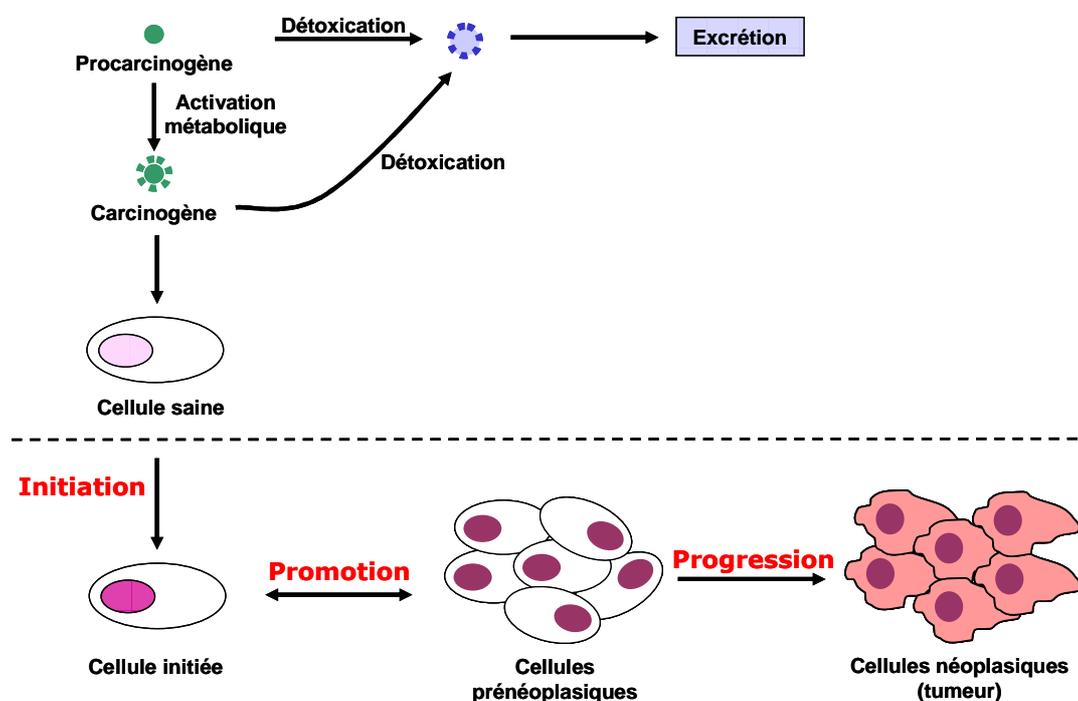


Figure 2 : Représentation schématique des étapes de la cancérogenèse (adaptée de Surh 2003).

L'une des molécules potentiellement chimiopréventive très étudiée actuellement est le **resvératrol** (3, 5, 4' trihydroxy-*trans*-stilbène) (**figure 3**). Ce polyphénol est produit par une large variété de végétaux comme les légumineuses (rhubarbe), les arachides (cacahuète), les fruits rouges (raisin, mûre, cassis, myrtille). Néanmoins, c'est dans la peau du raisin rouge que la concentration en **resvératrol** est la plus importante.

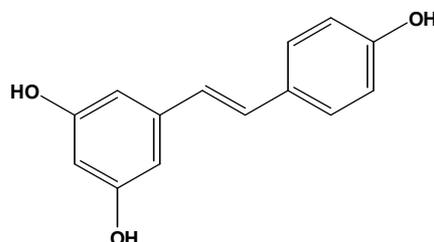


Figure 3 : Structure du **resvératrol** (3, 5, 4' trihydroxy-*trans*-stilbène)

Le potentiel chimiopréventif du **resvératrol** a été mis en évidence *in vivo* sur différents modèles d'induction expérimentale de tumeur par des carcinogènes. L'une des premières études réalisées en 1997 a montré que l'application topique de **resvératrol** réduisait de 98 % l'apparition de cancer de la peau chez des souris CD-1 après induction par deux carcinogènes, le DMBA (7,12-diméthylbenz[a]anthracène) et le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Jang *et al.* 1997). Comme décrit dans la revue de Athar *et al.* en 2007, le potentiel chimiopréventif du **resvératrol** a été confirmé dans de nombreux modèles animaux de cancers (sein, poumon, œsophage, prostate, foie, pancréas, colon et rectum...). Par la suite, de multiples études *in vitro* ont permis de mieux comprendre les mécanismes d'action cellulaires de ce composé. Ainsi, il est apparu que le **resvératrol** est capable de prévenir l'initiation tumorale en inhibant l'activation des carcinogènes et en stimulant leur élimination. Par exemple, le **resvératrol** empêche l'activation des xénobiotiques en inhibant l'activité d'enzymes de phase I du métabolisme, les cytochromes P450. De plus, il induit l'expression et/ou l'activité d'enzymes de phase II qui interviennent dans la détoxification (glutathion S-transférase (GST, glutathion peroxydase, l'UDP-glucuronyl transférase, quinone réductase...) (Kundu et Surh 2008).

De plus, ce composé possède des propriétés antiprolifératives et apoptogéniques qui, non seulement participe à l'inhibition de la cancérogenèse, mais permettent également d'envisager le **resvératrol** comme un agent chimiothérapeutique (Kundu et Surh 2008). L'activité antiproliférative du **resvératrol** a notamment été reportée sur la lignée cellulaire A431 (carcinome épidermoïde humain). Cet effet est accompagné d'une modulation de l'expression de régulateurs clés du cycle cellulaire (répression des cyclines D1 et D2, des Cdk2, 4 et 6

associée à l'augmentation d'expression de l'inhibiteur de Cdk, p21) (Ahmad *et al.* 2001). L'induction de l'apoptose par le **resvératrol** a été reportée dans de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses. Dans le cas des cellules MCF-7 (cancer du sein), celle-ci a été liée à une activation de la voie intrinsèque mitochondriale *via* l'induction de la libération du cytochrome *c*, la modulation d'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et l'activation des caspases (Kim *et al.* 2004). De plus, le **resvératrol** a montré une activité anti-angiogénique. Les études de Cao *et al.* et Zhang *et al.* ont montré que le **resvératrol** diminuait l'expression du facteur angiogénique VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) dans les cellules cancéreuses OVCAR-3 (ovaire), SCC-9 (langue) et HepG2 (foie) (Cao *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2005).

Actuellement, des essais cliniques de phase I sont en cours sur des patients sains et atteints de cancer du colon. Le premier vise à évaluer les effets de la prise de **resvératrol** chez des patients sains. Le second permettra d'étudier l'impact de la prise de **resvératrol** sur l'activation de la voie de signalisation cellulaire Wnt, qui est activée dans 85 % des cancers coliques (descriptifs des études disponibles sur www.clinicaltrials.gov).

Un autre polyphénol naturel, l'**EGCG** (épigallocatechine-3-gallate) du thé vert (**figure 4**), a également montré des propriétés chimiopréventives remarquables.

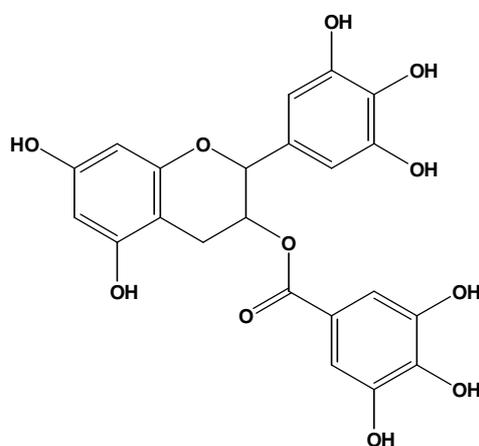


Figure 4 : Structure de l'**EGCG** (épigallocatechine-3-gallate)

Près de 120 études ont été réalisées *in vivo* et la majorité d'entre elles a permis de confirmer l'activité chimiopréventive du thé et de ses constituants sur différents modèles animaux de cancer (poumon, œsophage, intestin, colon, peau, prostate, sein...) (Ju *et al.* 2007). Une étude de Mimoto *et al.* a montré que l'administration orale d'**EGCG** réduisait significativement l'apparition de cancer du poumon chez des souris A/J après induction par le cisplatine

(Mimoto *et al.* 2000). Comme pour beaucoup de substances naturelles, l'activité anti-cancérogène de l'**EGCG** peut s'expliquer par sa diversité d'action cellulaire. En effet, ce dernier est capable d'induire un arrêt du cycle et de promouvoir l'apoptose de cellules cancéreuses. Par exemple, le traitement de cellules de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) et de la prostate (LNCaP et DU145) par l'**EGCG** induit un arrêt du cycle en phase G1. Celui-ci a été associé à une diminution d'expression des Cdk (Cdk 2, 4 et 6) et des protéines régulatrices cyclines (cyclines D1, D2 et E) dans le cas du cancer de la prostate et une augmentation des inhibiteurs de Cdk (p21 et p27 dans le cas du cancer du sein et p21, p27, p16, p18 dans le cancer de la prostate) (Stuart *et al.* 2006).

L'**EGCG** est également capable d'inhiber l'activation de voies de signalisation impliquées dans les processus de croissance, de survie et de prolifération cellulaire comme celles des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*), de NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*), de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), du VEGF... (Khan *et al.* 2005, Aggarwal et Shishodia 2006).

Actuellement, plusieurs essais cliniques sont en cours. Comme exemple, nous pouvons citer un essai de phase II qui vise à évaluer l'impact de la prise quotidienne de thé vert *vs* placebo avant chirurgie chez des patients atteints de cancer de la vessie. Un autre permettra d'étudier les effets à court terme de la prise d'**EGCG** sur la progression de cancer de la prostate chez des patients récemment diagnostiqués (descriptifs des études disponibles sur www.clinicaltrials.gov).

D'autres types de substances naturelles, comme les composés organosoufrés (OSC) (**figure 5**), retrouvés notamment dans les alliacées (ail, oignon, échalote...), ont montré des propriétés anti-cancérogènes.

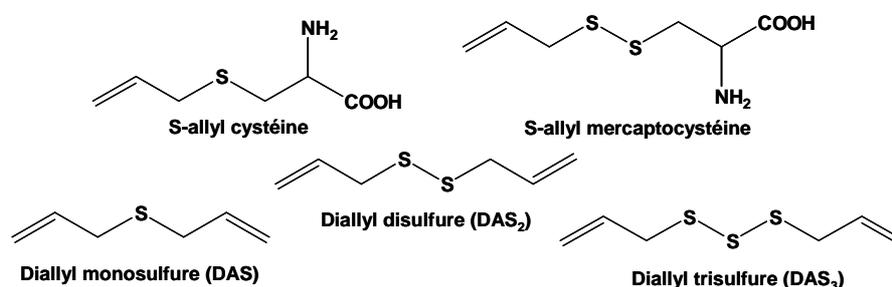


Figure 5 : Exemples de structure de quelques composés organosoufrés (OSC).

L'ail est connu depuis longtemps pour ses effets bénéfiques pour la santé. Des études épidémiologiques sont venues conforter l'idée admise que la consommation d'ail pouvait

réduire le risque d'apparition de certains cancers dont celle de Hsing *et al.* qui a révélée que la consommation d'alliacées (> 10 g/jour) réduirait significativement le risque d'apparition de cancer de la prostate (Khanum *et al.* 2004, Hsing *et al.* 2002). Cette activité chimiopréventive a largement été confirmée à partir des années 1990 par la réalisation d'études utilisant des modèles animaux de cancers chimio-induits (foie, œsophage, colon, sein, peau...) (Stan *et al.* 2008). Schaffer *et al.* ont notamment montré que la **S-allylcystéine** et le **diallyl disulfure (DAS₂)**, deux molécules actives de l'ail, réduisaient l'apparition de tumeur mammaire induite par le N-méthyl-N-nitrosourée chez des rates (Schaffer *et al.* 1996). Des études précliniques indiquent clairement que certains OSC jouent un rôle protecteur contre l'induction de cancer par des carcinogènes chimiques chez différents modèles animaux. Les différentes données de la littérature impliquent des mécanismes d'action cellulaires multiples des OSC comme l'inactivation des carcinogènes, l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire, la modification des histones, l'inhibition de l'angiogenèse... (Herman-Antosiewicz *et al.* 2007, Iciek *et al.* 2009, Scherer *et al.* 2009). Comme nous l'avons décrit précédemment pour le **resvératrol**, les OSC sont capables de prévenir l'initiation tumorale en inhibant l'activation des carcinogènes et en stimulant leur élimination. Cependant, les effets observés sur la modulation des enzymes de phase I du métabolisme sont contradictoires. En effet, Wu *et al.* ont montré que l'administration orale de diallyl di- (**DAS₂**) et trisulfures (**DAS₃**) chez des rats induisait une diminution du cytochrome P450 2E1 mais augmentait parallèlement les niveaux de transcrits et de protéines des cytochromes P450 1A1, 2B1 et 2E1 (Wu *et al.* 2002). Par contre, l'induction d'enzymes de phase II du métabolisme par les OSC a été clairement reportée. Notamment, une étude de Fukao *et al.* a montré que l'administration intrapéritonéale de **DAS₂** et **DAS₃** chez le rat conduisait à une augmentation des activités GST et quinone réductase hépatiques (Fukao *et al.* 2004). En plus de cibler les enzymes du métabolisme des xénobiotiques, les OSC peuvent moduler l'activité de transporteurs, comme la glycoprotéine P (P-gp), qui permettent l'expulsion des xénobiotiques de la cellule. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour palier à l'apparition de phénotype de résistance multiple aux agents chimiothérapeutiques. Par exemple, le traitement de cellules leucémiques K562R rendues résistantes à la vinblastine, par une dose non cytotoxique de diallyl sulfure (**DAS**) permet d'augmenter l'activité cytotoxique de la vinblastine et d'autres *vinca* alcaloïdes sur ces cellules. Les auteurs ont montré que le **DAS** réduisait le niveau protéique de P-gp des cellules résistantes K562R pour atteindre celui observé dans la lignée non résistante K562 (Arora *et al.* 2004).

En plus d'exercer une activité chimiopréventive, les OSC présentent également un potentiel thérapeutique intéressant. En effet, des effets antiprolifératifs, associés à une induction de la mort cellulaire et/ou un arrêt du cycle cellulaire, ont été confirmés et les mécanismes d'action cellulaires impliqués ont été étudiés en détail sur les lignées SH-SY5Y (neuroblastome), PC-3 et DU145 (cancer de la prostate), SW480 (cancer du colon) (pour une revue récente voir Scherer *et al.* 2009). Ainsi, Xiao *et al.* ont montré que le **DAS₃** inhibait sélectivement la prolifération de cellules cancéreuses humaines de prostate (PC-3 et DU145) en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M sans affecter la croissance des cellules épithéliales prostatiques PrEC (Xiao *et al.* 2005). De manière intéressante, cette sélectivité d'action a été confirmée *in vivo* par une étude montrant que le traitement par **DAS₃** de souris « nude » greffées avec des cellules PC-3 n'induisait pas d'effets secondaires (absence de perte de poids dans ce cas) (Xiao *et al.* 2006). L'étude approfondie des mécanismes cellulaires impliqués suggère que le **DAS₃** conduit à l'hyperphosphorylation puis à la destruction de CDC25C, un régulateur du cycle cellulaire, dans les cellules PC-3 (Xiao *et al.* 2005). De plus, l'induction de l'apoptose des cellules PC-3 après traitement par le **DAS₃** a été associée à l'activation des pro-caspases 9 et 3 ainsi qu'à une diminution des interactions entre les protéines anti-apoptotique Bcl-2 et pro-apoptotique Bax. La mise en place du processus apoptotique a pu être également relié à l'activation de voies de signalisation ERK1/2 et JNK dans les cellules PC-3 et DU145 après traitement par **DAS₃** (Xiao *et al.* 2004).

Enfin, certains OSC, comme la **S-allylmercaptocystéine**, ont montré des propriétés anti-métastatiques *in vivo*. L'administration de ce composé à des souris xéno-gréffées avec des cellules PC-3 permet de réduire de 85 % la formation de métastases pulmonaires et surrenaliennes. Ceci a été associé à une diminution de l'expression de la molécule d'adhésion E-cadhérine dans ces cellules (Howard *et al.* 2007).

Enfin, des études sont actuellement menées en phase clinique. Comme exemple, nous pouvons citer un essai à venir qui vise à évaluer les bénéfices potentiels de l'administration conjointe d'ail, sous forme de complément alimentaire, et de docétaxel chez des patientes atteintes de cancer du sein (descriptif de l'étude disponible sur www.clinicaltrials.gov).

Ces trois exemples illustrent le fait que de nombreuses substances naturelles (polyphénols, terpènes, alcaloïdes, composés organosoufrés...), largement retrouvées dans notre alimentation, présentent un intérêt majeur dans la lutte contre le cancer. C'est pourquoi, leur utilisation, en tant que chimioprotecteur ou agent thérapeutique, a suscité un engouement grandissant ces dernières années.

1.3 Les approches thérapeutiques

Depuis plusieurs dizaines d'années, l'arsenal des moyens diagnostiques et thérapeutiques s'est considérablement accru et a largement contribué à réduire la mortalité liée aux cancers. Actuellement, les principales méthodes de traitement du cancer sont des associations de chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie. Cependant, il apparaît néanmoins important de continuer à développer de nouvelles approches thérapeutiques afin d'améliorer encore la prise en charge des centaines de types et sous-types de cancers référencés. Dans le cas du cancer du sein, le traitement d'une tumeur localisée comprend en principe une chirurgie qui est le plus souvent complétée par un autre traitement (nommé traitement adjuvant) en vue de prévenir une éventuelle rechute. Ce traitement complémentaire peut être de la chimiothérapie, de la radiothérapie, de l'hormonothérapie ou des thérapeutiques ciblées. Ceux-ci peuvent également être administrés en prétraitement afin de réduire la taille de la tumeur avant intervention chirurgicale. Dans ce cas, on parle de traitement néo-adjuvant.

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la chimiothérapie qui est l'administration de substances chimiques cytotoxiques visant à ralentir, voire stopper, la multiplication anarchique des cellules cancéreuses. Elle s'effectue généralement par administration de cocktail de molécules selon des protocoles thérapeutiques clairement établis. Dans le cas du cancer du sein, les agents anticancéreux les plus fréquemment utilisés sont les suivant :

- Agents altérant l'ADN : agents alkylants (cyclophosphamide par exemple), agents intercalants (la plupart des antibiotiques antitumoraux comme la doxorubicine et l'épirubicine), les inhibiteurs de topoisomérases I et II, les intermédiaires électrophiles...
- Poisons du fuseau mitotique appartenant à la classe des taxanes (paclitaxel et docétaxel)
- Antimétabolites comme le 5-fluorouracile
- Inhibiteurs enzymatiques comme le méthotrexate qui agit sur la dihydrofolate réductase

Différentes associations d'agents anticancéreux, cités ci-dessus, peuvent être utilisées (protocoles dits FAC, FEC, AC, TAC...). Les cures sont généralement réparties sur plusieurs séances espacées de quelques semaines.

Malgré son utilisation encore très répandue, la chimiothérapie ne peut épargner les cellules saines et induit donc de nombreux effets secondaires. Ainsi, en parallèle de ces

chimiothérapies dites conventionnelles s'est développé l'usage de chimiothérapies « ciblées » (notamment les anticorps monoclonaux) dont l'activité s'adresse aux mécanismes mêmes de l'oncogène impliqué. Par exemple, l'Herceptin®, un anticorps monoclonal qui agit sur les récepteurs membranaires HER2, est indiquée dans le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de cette protéine (16 % des cas de cancer du sein). Ce traitement a montré une efficacité majeure en terme de risque de rechute (de l'ordre de 50 %).

Depuis plusieurs dizaines d'année, de nombreux projets de recherche sont apparus pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et ainsi mettre au point des molécules de chimiothérapie qui pourraient contrer certaines résistances aux traitements disponibles ou être simplement plus efficaces. Dans cet objectif, de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont apparues comme des cibles de choix. En effet, beaucoup de ces régulateurs du cycle cellulaire jouent un rôle important dans le processus de cancérogenèse ainsi que dans le développement de phénomène de résistance (Schwartz et Shah 2005, Deep et Agarwal 2008). Des études précliniques visant à identifier des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (*Cyclin Dependent-Kinases* ou Cdk), des phosphatases CDC25 (*Cell Division Cycle 25*) ou d'autres protéines intervenant au niveau des différents points de contrôle, ont été menées. Actuellement, l'utilisation de la plupart des inhibiteurs du cycle cellulaire identifiés reste toujours au stade d'essais préclinique ou clinique pour quelques uns (Deep and Agarwal 2008). Notamment, la **R-roscovitine**, un inhibiteur sélectif de Cdk, est entrée en phase d'essais cliniques mais son activité est apparue modeste et peu sélective vis-à-vis des cellules cancéreuses. Une nouvelle génération d'inhibiteurs de Cdk est actuellement en cours d'évaluation clinique et préclinique. La **Silibinin**, par exemple, est passée en phase II d'essais cliniques et son efficacité est évaluée sur des patients atteints de cancer de la prostate. Le composé **ARQ-501**, un inhibiteur du facteur de transcription E2F1, est testé en phase I d'essais cliniques sur des patients atteints de tumeurs solides ne répondant pas à la chimiothérapie.

2 Le cycle cellulaire

L'un des mécanismes fondamentaux de la cancérogenèse est la prolifération incontrôlée des cellules tumorales. La majorité des cellules de l'organisme se trouve dans un état quiescent (phase G0), elles ne se divisent pas. Sous l'effet de signaux mitogènes, le cycle cellulaire est déclenché, les cellules passent alors en phase proliférative.

Le cycle cellulaire est l'ensemble des modifications qu'une cellule subit entre sa formation à partir d'une cellule mère et le moment où cette cellule finit de se diviser en deux cellules filles identiques (Vermeulen *et al.* 2003, Meijer 2003). On distingue deux stades au cours du cycle cellulaire (**figure 6**) :

- la mitose qui est la division de la cellule en deux cellules filles
- l'interphase qui est la période entre deux mitoses

L'interphase est en moyenne vingt fois plus longue que la mitose et comprend trois phases distinctes :

- une phase de croissance initiale (G1) pour laquelle la cellule possède une quantité d'ADN (n)
- une phase de synthèse de l'ADN (S) pendant laquelle les chromosomes sont dupliqués et la quantité d'ADN est doublée (2n)
- une phase de croissance G2 qui précède la division proprement dite (mitose)

Au cours de la mitose, les chromosomes dupliqués sont répartis dans les deux cellules filles grâce au fuseau mitotique. La mitose est classiquement découpée en 5 étapes successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase puis s'achève par la cytodierèse. Les deux cellules filles recommencent alors un nouveau cycle en G1 ou entrent en quiescence G0. La plupart des cellules eucaryotes ont un cycle qui dure entre 10 et 24 h.

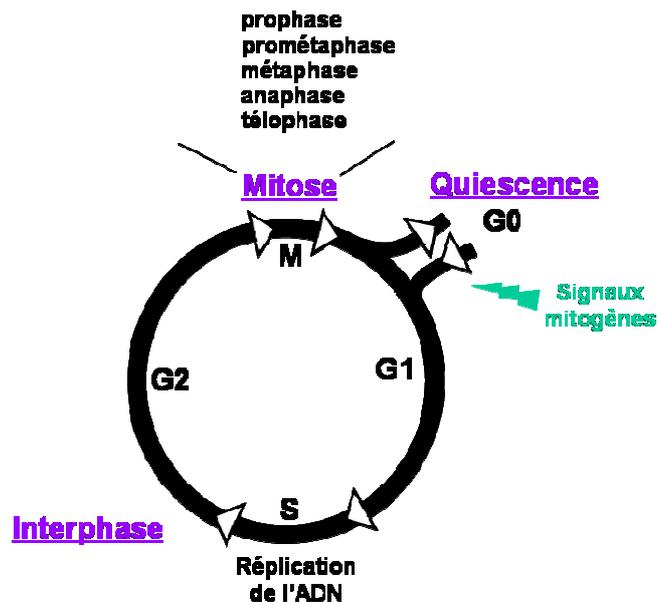


Figure 6 : Le cycle de division cellulaire

Pour assurer la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire ainsi que l'obtention de deux cellules filles rigoureusement identiques, la cellule dispose de nombreux systèmes de régulation hautement perfectionnés. La régulation du cycle cellulaire s'effectue principalement par l'action séquentielle de protéines spécifiques, les kinases dépendantes des cyclines (Cyclin dependent-kinases ou Cdk). Des mécanismes de surveillance s'ajoutent à cette régulation de la succession correcte des différentes phases du cycle. En effet, il existe différents points de contrôle, appelés « checkpoints », qui permettent de s'assurer du bon déroulement de chaque phase avant de commencer la suivante.

2.1 La régulation du cycle cellulaire

La prolifération cellulaire nécessite l'action d'une famille de protéines bien particulière : les Cdk. Ces kinases ne pourront être activées uniquement lorsqu'elles seront associées à leurs sous-unités régulatrices, les cyclines. Les cyclines sont des protéines qui n'ont pas d'activité enzymatique par elles-mêmes, mais c'est leur cycle de synthèse/dégradation qui va permettre la régulation de l'activité des Cdk. Ces complexes Cdk/cycline vont jouer un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle (pour des revues voir Schwartz et Shah 2005 et Hochegger *et al.* 2008). Selon les phases, différents types d'association Cdk/cycline vont intervenir (**figure 7**).

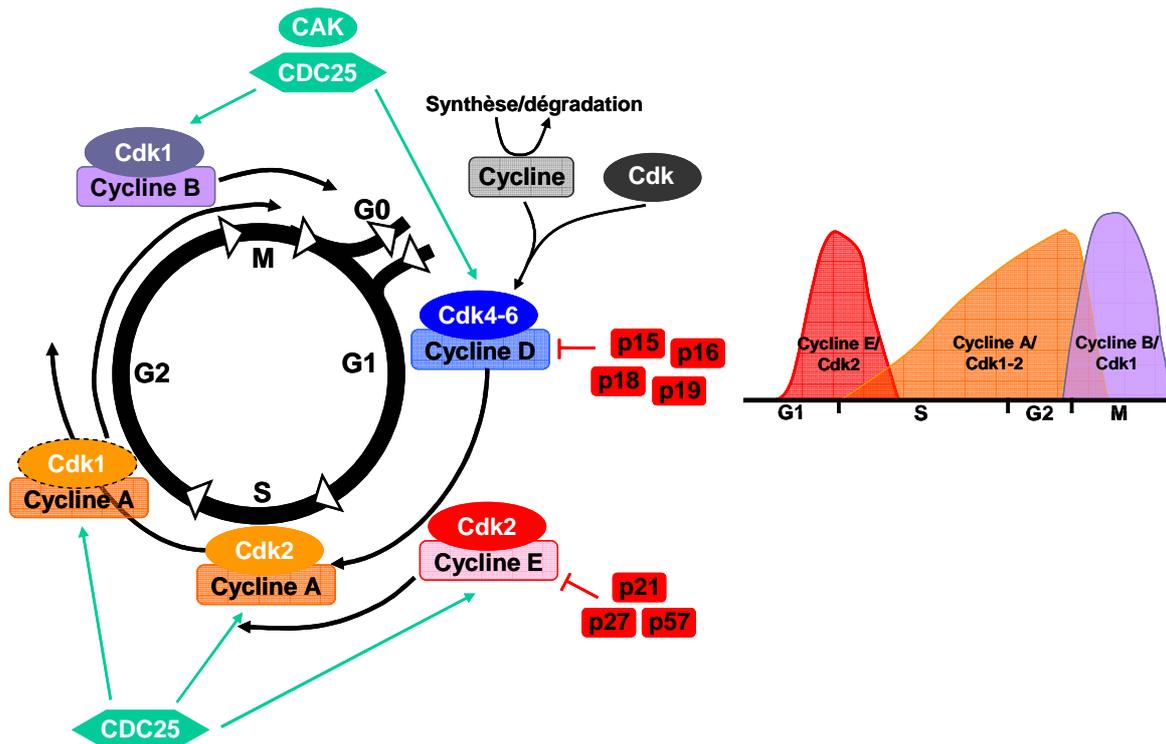


Figure 7 : Les régulateurs du cycle cellulaire (adaptée de Schwartz et Shah 2005 et Hohegger *et al.* 2008)

En plus de l'assemblage transitoire aux cyclines, d'autres mécanismes vont permettre l'activation ou l'inhibition des différentes Cdk au cours du cycle cellulaire (**figure 7**).

L'activité des Cdk va être inhibée lorsque celles-ci seront associées à des inhibiteurs protéiques, les CKI (*Cyclin-dependent kinase inhibitors*). Deux familles de CKI ont été identifiées :

- la famille INK4 (*Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*), composée des protéines p15, p16, p18 et p19, qui inactive les Cdk en empêchant leur liaison aux cyclines au cours de la phase G1.

- la famille CIP/KIP (*Cdk inhibiting protein*), regroupant les protéines p21, p27 et p57. L'activité des CKI est dépendante de signaux intra- et extracellulaires comme, par exemple, l'expression de p21 qui est sous le contrôle du suppresseur de tumeur p53.

Un autre mécanisme de régulation de l'activité des Cdk met en jeu des événements de phosphorylation et déphosphorylation. Ces phosphorylations peuvent être activatrice, comme par exemple celle des résidus Thr161 de Cdk1, Thr160 de Cdk2 et Thr172 de Cdk4 par les complexes CAK (*Cdk activating kinase*) (Lolli et Johnson 2005). Cette phosphorylation provoque un changement conformationnel des Cdk qui favorise leur liaison aux cyclines. Même si elle ne conduit pas directement à un complexe actif, cette phosphorylation est

indispensable à l'activité des kinases Cdk. Au contraire, la phosphorylation des résidus Thr14 et Tyr15 des Cdk1 et 2 par les kinases Wee1/Myt1 conduit à l'inhibition de l'activité enzymatique. Inversement, cette inhibition peut être levée suite à la déphosphorylation de ces mêmes résidus (Thr et Tyr) par les phosphatases CDC25 (**figure 8**).

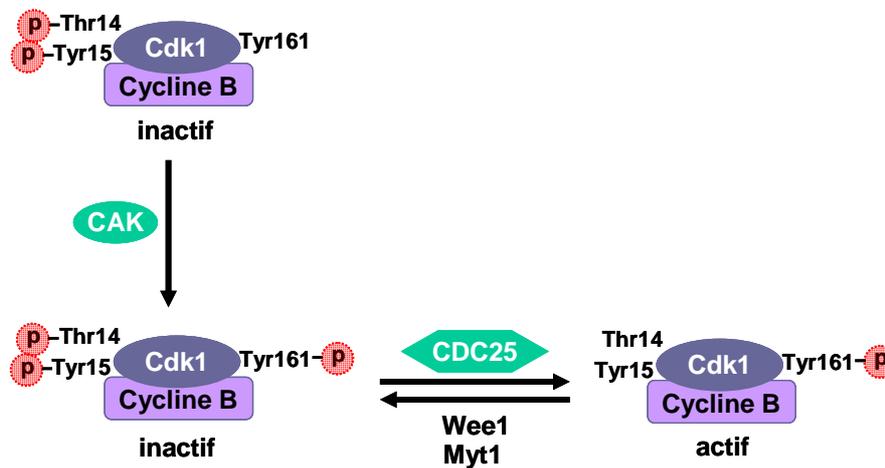


Figure 8 : Régulation de l'activité du complexe Cdk1/cycline B par phosphorylation/déphosphorylation (adaptée de Aressy et Ducommun 2008)

2.1.1 La transition G0/G1

La présence de signaux mitogènes va conduire la cellule quiescente (G0) à entrer en phase proliférative. L'intégration cellulaire de ces signaux induit la stimulation de la transcription de certains gènes dont le facteur de transcription c-Myc. Par la suite, c-Myc va activer la transcription de gènes essentiels à l'entrée en phase G1 comme les cyclines D et E, CDC25 et Cdk4.

Au cours de la phase G1, la cellule va passer par une étape spécifique, le point de restriction, désigné comme étant le moment où la cellule n'a plus besoin de stimuli mitogènes pour avancer dans le cycle (**figure 9**). On considère que ce point de restriction est atteint lorsque la cellule possède suffisamment de complexes Cdk2/cycline E activés. Une fois ce seuil dépassé, la cellule va continuer irréversiblement son cycle sans pouvoir retourner en quiescence.

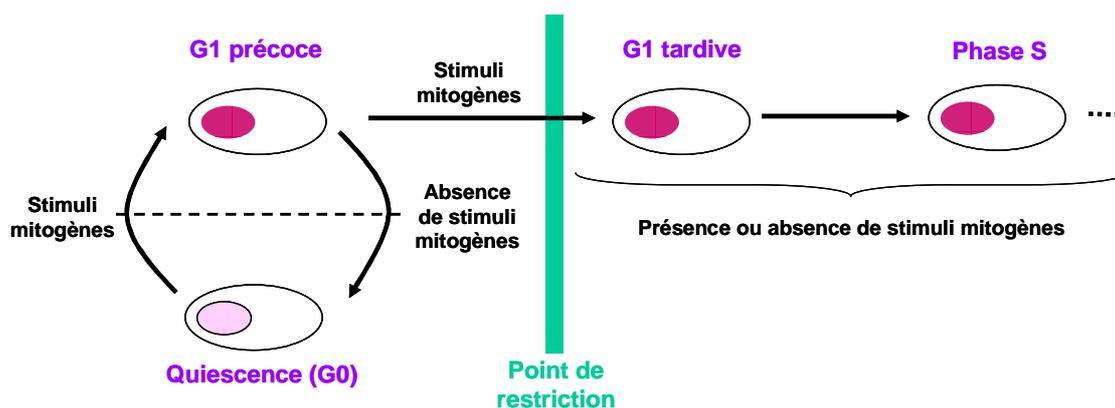


Figure 9 : La transition G0/G1 : le point de restriction

2.1.2 La progression en G1 et la transition G1/S

Au début de la phase G1 (G1 précoce), les complexes Cdk4-cycline D et Cdk6-cycline D se forment et vont être peu à peu activés grâce aux actions phosphorylantes des complexes CAK et des phosphatases CDC25. Les complexes Cdk4-6/cycline D activés vont alors initier la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRb). Sous sa forme phosphorylée, pRb libère les facteurs de transcription E2F/DP qui vont induire l'expression des gènes nécessaires à la progression en phase S comme les cyclines E et A, Cdk1, CDC25A et des enzymes de la réplication. Une phosphorylation supplémentaire de pRb par les complexes Cdk2/cycline E va augmenter l'activation des facteurs transcriptionnels E2F/DP qui conduit à l'accumulation de la protéine CDC25A. Les complexes Cdk2/cycline E vont alors phosphoryler leur propre régulateur, CDC25A, créant ainsi une boucle d'autoamplification juste avant l'entrée en phase S. De plus, Cdk2/cycline E est capable de phosphoryler son propre inhibiteur, p27, qui est ensuite dégradé par le protéasome. Ce phénomène d'autoamplification de l'activité Cdk2/cycline E permet le déclenchement de la phase S (**figure 10**).

2.1.3 La phase S

La progression de la réplication de l'ADN est sous la dépendance de l'activité du complexe Cdk2/cycline A. Au début de la phase S, les cyclines D et E sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome. Le complexe Cdk2/cycline A joue un rôle important dans l'initiation de la réplication en phosphorylant et donc en activant l'ADN polymérase. Puis, ce

complexe va inhiber l'activité des facteurs de transcription E2F/DP par phosphorylation afin de mettre fin à la phase S (**figure 10**).

Parallèlement à la duplication de son ADN, la cellule doit également assurer la duplication du centrosome au cours de la phase S. Le centrosome constitue le centre organisateur des microtubules qui jouera un rôle essentiel dans la formation du fuseau mitotique lors de la mitose. C'est l'activation des complexes Cdk2/cyclines E-A, au niveau du centrosome, qui induit la duplication de ce dernier.

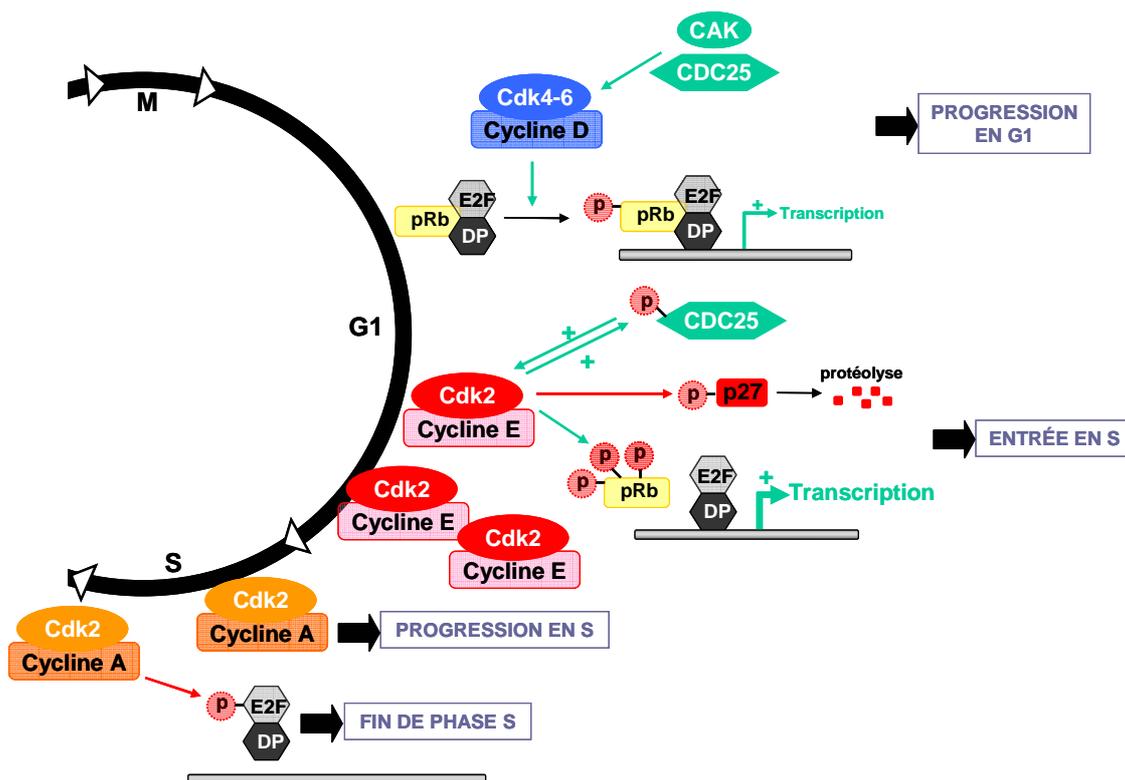


Figure 10 : Régulation de la progression en G1 et de la transition G1/S (adaptée de Schwartz et Shah 2005)

2.1.4 La phase G2 et la transition G2/M

A partir de la fin de la phase S et jusqu'à la fin de la phase G2, la cellule se prépare à l'entrée en mitose. Au cours de cette période, les complexes Cdk1/cycline A sont actifs mais leurs fonctions restent encore méconnues. De plus, il y a formation progressive des complexes Cdk1/cycline B qui seront activés brutalement juste avant l'entrée de la cellule en mitose.

La cycline B s'accumule progressivement pendant les phases S et G2, ce qui conduit à l'accumulation progressive des complexes Cdk1/cycline B qui restent, dans un premier temps, sous forme inactive. Juste avant l'entrée en mitose, Cdk1 est phosphorylée par CAK mais

reste néanmoins inactive du fait de la présence de Wee-1 qui phosphoryle les deux acides aminés Tyr15 et Thr14. Cependant, l'activation des phosphatases CDC25 va permettre la déphosphorylation des résidus Tyr15 et Thr14 de Cdk1. L'activation complète des complexes Cdk1/cycline B met en jeu un mécanisme d'autoamplification car ils sont capables d'activer par phosphorylation leur propres activateurs, les CDC25, ainsi que d'inhiber leur inhibiteur, Wee-1. Ce mécanisme de rétrocontrôle positif permet d'obtenir rapidement un niveau protéique important en complexes Cdk1/cycline B actifs qui déclenche l'entrée en mitose (figure 11).

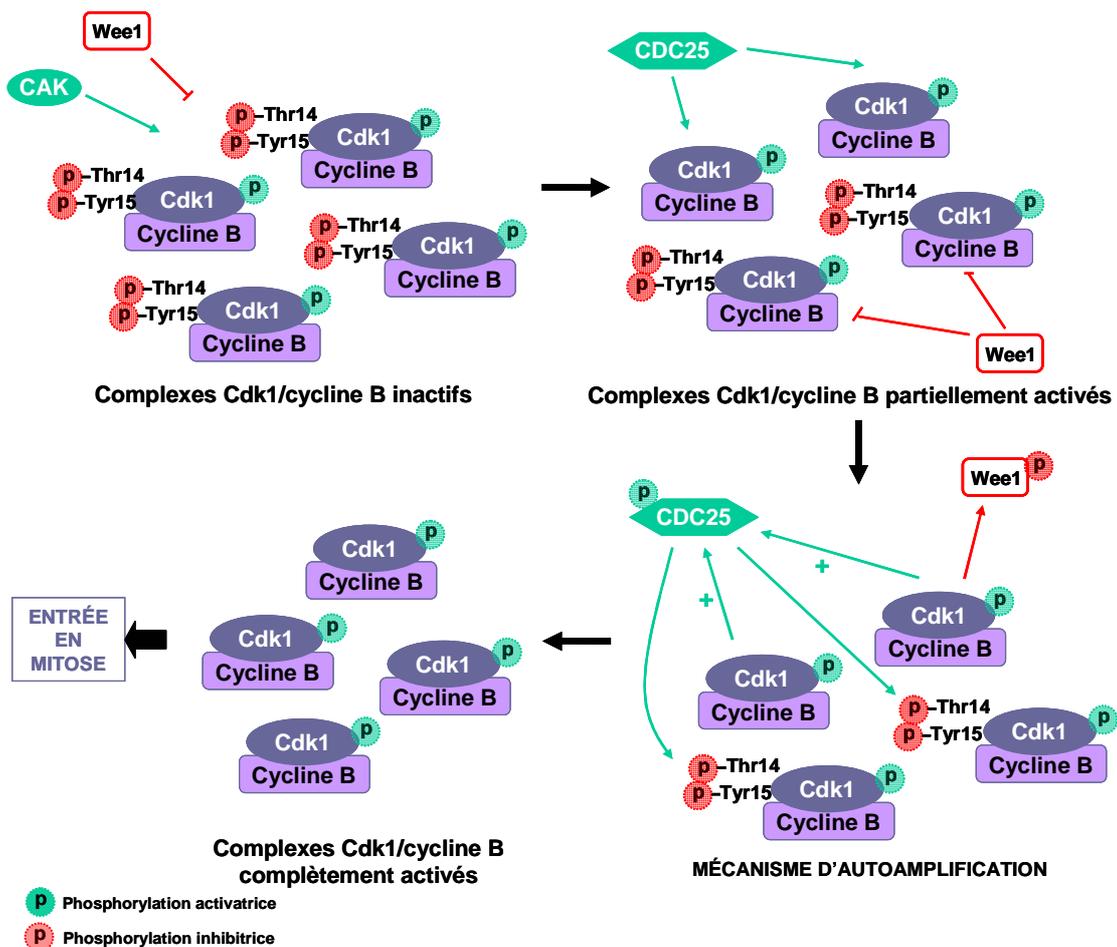


Figure 11 : Activation des complexes Cdk1/Cycline B lors de la transition G2/M.

2.1.5 La mitose

Les complexes Cdk1/cycline B, une fois activés, vont permettre le déclenchement de nombreux évènements lors de la mitose en phosphorylant différentes protéines, telles que :

- La condensine et l'histone H1, impliqués dans la condensation des chromosomes
- Les lamines, qui permettent la désorganisation de l'enveloppe nucléaire

- Les protéines associées aux microtubules (MAP), qui permettent l'assemblage du fuseau mitotique
- Le complexe APC (*Anaphase Promoting Complex*) dont l'activité est nécessaire à la dégradation de la cycline B et permet la sortie de la mitose

2.2 Les points de contrôle

Trois points de contrôle ont été identifiés lors des transitions G1/S, G2/M et métaphase/anaphase. Lorsqu'une anomalie est détectée (dommages à l'ADN ou anomalies de la réplication par exemple), la cellule est capable, grâce à la présence de ce « contrôle qualité », de stopper la progression du cycle et d'activer des processus de réparation ou de mort cellulaire par apoptose lorsque ces lésions s'avèrent irréparables.

2.2.1 Le point de contrôle G1/S

Plusieurs voies métaboliques distinctes agissent au niveau du point de contrôle G1/S (**Figure 12**) (Sancar *et al.* 2004). Ces mécanismes impliquent l'activation des kinases ATM (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et ATR (*ATM and Rad3-Related*). Tout d'abord, une réponse rapide se met en place au cours de laquelle ATM/ATR phosphorylent et activent les kinases Chk1 et Chk2 (*Checkpoint Kinase*). Ces dernières vont ensuite phosphoryler et, par conséquent, induire la protéolyse et/ou la séquestration cytoplasmique des phosphatases CDC25 qui ne pourront pas activer Cdk2. De plus, Chk1 et 2 induisent une augmentation de l'activité de la kinase Wee-1, ce qui amplifie l'inhibition des complexes Cdk-cycline.

En parallèle, un second mécanisme retardé, p53-dépendant, se met en place. Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes impliqués, notamment, dans l'arrêt du cycle cellulaire ou le déclenchement de l'apoptose. En réponse aux dommages à l'ADN, différents mécanismes vont conduire à la stabilisation de la protéine p53 et, par conséquent, à l'augmentation de son activité transcriptionnelle. Par exemple, les kinases ATM/ATR vont pouvoir phosphoryler directement, ou par l'intermédiaire de Chk1 et 2, la protéine p53, renforçant ainsi sa stabilité. L'un des gènes cibles de p53 est le gène codant l'inhibiteur de Cdk, p21. L'augmentation du niveau protéique de p21 va contribuer à l'inhibition des complexes Cdk/cycline et renforcer le blocage en G1/S. P53 induit également la transcription d'enzymes de réparation de l'ADN.

La voie p38 MAPK intervient également au niveau du point de contrôle G1/S. C'est une réponse qui se met en place rapidement car elle ne nécessite pas de synthèse protéique *de novo* pour fonctionner. La kinase MAPKAP-2 est capable, tout comme Chk1 et 2, de phosphoryler et d'induire la protéolyse des CDC25.

2.2.2 Le point de contrôle G2/M

Ce point de contrôle permet à la cellule de ne pas déclencher la mitose tant que la réplication n'est pas totalement et/ou correctement achevée ou tant que des lésions de l'ADN sont détectées. Les mêmes mécanismes que ceux intervenant au point de surveillance G1/S sont impliqués (**figure 12**). Si l'ADN est endommagé, l'activation séquentielle des kinases ATM/ATR et Chk1/2 conduit à l'inactivation des phosphatases CDC25, rendant impossible l'activation des complexes Cdk1/cycline B. La voie p38 MAPK est également capable d'induire la séquestration cytoplasmique des CDC25B et C suite à leur phosphorylation par la kinase MAPKAP-2. Enfin, le mécanisme retardé, faisant intervenir p53, va permettre également l'inhibition des complexes Cdk1/cycline B.

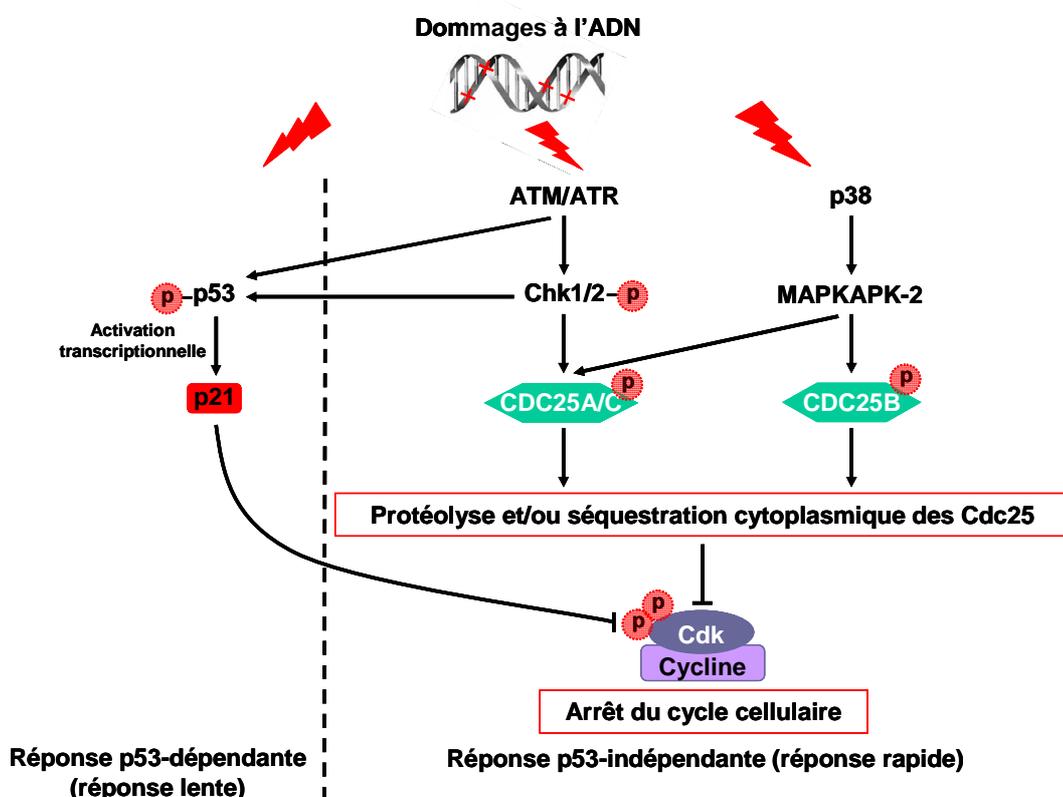


Figure 12 : La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (adaptée de Aressy et Ducommun 2008).

2.2.3 Le point de contrôle métaphase/anaphase

Le contrôle de l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique lors de la métaphase est un élément indispensable au déclenchement de l'anaphase. Lorsque au moins un chromosome n'est pas correctement attaché au fuseau, l'activation du complexe enzymatique APC est bloquée. Son inhibition permet de maintenir en place les protéines qui empêchent la séparation des chromatides-sœurs au moment de l'anaphase.

3 Les phosphatases CDC25 (*Cell Division Cycle 25*)

3.1 Généralités

Les phosphatases CDC25 (*Cell Division Cycle 25*) ont été identifiées pour la première fois en 1979 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Fantes 1979). Ensuite, ces protéines ont été décrites chez tous les eucaryotes, à l'exception des plantes. Ces phosphatases appartiennent à la famille des phosphatases à double spécificité (DSP) car elles sont capables d'hydrolyser les liaisons ester phosphate au niveau de résidus phosphotyrosine (pTyr) et phosphothréonine (pThr) présents au niveau de séquences GEGTYG de leurs substrats. Les CDC25 permettent ainsi l'activation des Cdk par déphosphorylation des résidus pTyr15 et pThr14 et, par conséquent, jouent un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire (Nilsson et Hoffmann 2000).

3.2 Structure

Chez l'homme, il existe trois isoformes de CDC25 (CDC25A, B et C) qui sont chacune codées par des gènes présents sur des chromosomes différents (3p21, 20p13 et 5q31, respectivement). Ces protéines sont constituées de 470 à 580 acides aminés et peuvent être subdivisées en deux régions bien distinctes.



Le domaine régulateur se situe à l'extrémité N terminale et est constitué par des séquences très divergentes entre les différentes isoformes de CDC25. Cette région contient notamment de nombreux sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation qui permettent la régulation de l'activité protéique, le contrôle du niveau intracellulaire en protéine et l'interaction avec d'autres partenaires. Certaines séquences consensus sont cependant retrouvées, qui jouent un rôle dans la localisation intracellulaire des CDC25 (séquences de localisation nucléaire NLS et d'export nucléaire NES). De plus, cette région régulatrice contient de nombreux sites d'épissage alternatif. Par conséquent, chaque isoforme de CDC25 présente différents variants d'épissage (**figure 13**) :

- 2 variants d'épissage pour CDC25A (A1 et A2)
- 4 variants d'épissage pour CDC25B (B1 à B4) et un potentiel 5^{ème} variant qui n'a pas encore été séquencé
- 5 variants d'épissage pour CDC25C (C1 à C5)

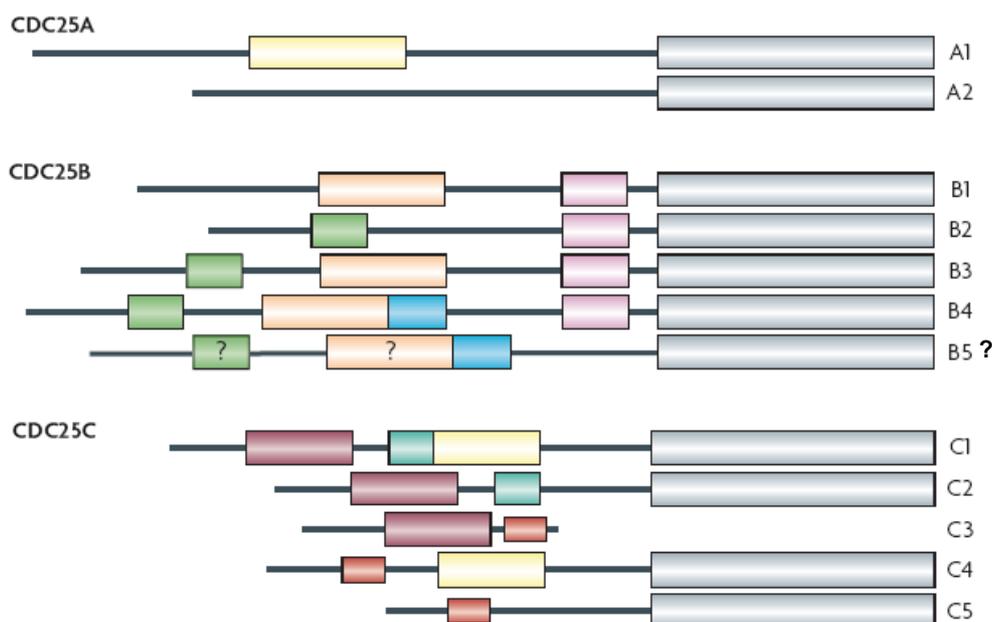


Figure 13 : Les différents variants d'épissage des phosphatases CDC25 (d'après Boutros *et al.* 2007 [b]).

La fonction de chacun de ces variants n'a pas encore été clairement établie mais ils ont probablement un rôle à jouer dans l'activation spatio-temporelle ordonnée des différents complexes Cdk/cycline lors des différentes phases du cycle cellulaire.

Le domaine catalytique, constitué d'environ 200 acides aminés, est une région hautement conservée (environ 70 % d'homologie) qui se situe à l'extrémité C terminale de la protéine. Ce domaine contient le motif HCX₅R, qui caractérise le site actif de toutes les phosphatases à double spécificité, et au sein duquel est localisée la cystéine catalytique (Cys431 pour CDC25A, Cys473 pour CDC25B et Cys377 pour CDC25C). Cependant, la présence de ce motif conservé est le seul point commun entre les CDC25 et les autres protéines tyrosine phosphatases (PTP) car la structure tridimensionnelle de leurs domaines catalytiques montrent de nombreuses divergences. La mise en évidence des structures cristallines des domaines catalytiques de CDC25A et B (Fauman *et al.* 1998, Reynolds *et al.* en 1999) a permis d'identifier certaines caractéristiques remarquables de ces enzymes. Contrairement aux autres phosphatases, les CDC25 possèdent un domaine catalytique superficiel, peu profond qui autorise uniquement l'accès du groupement phosphate du substrat sans permettre la reconnaissance de sites spécifiques en amont et en aval du site de déphosphorylation. Cette particularité rend ainsi possible la double spécificité des phosphatases CDC25 car elles acceptent indifféremment des résidus pThr- et pTyr- comme substrat. De plus, ce domaine catalytique est constitué de cinq feuillets β parallèles entourés de part et d'autre par des hélices α . Le site catalytique, constitué du motif HCX₅R, se situe au niveau d'une boucle (appelée boucle P pour *Phosphate binding-loop*) au sommet d'une hélice α , ce qui a pour but de faciliter la déprotonation de la cystéine catalytique. Au sein du motif HCX₅R, le résidu arginine (R) ainsi que les cinq résidus X vont former de multiples liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène présents au niveau du groupement phosphate ($-PO_3^-$) du substrat à déphosphoryler (**figure 14**).

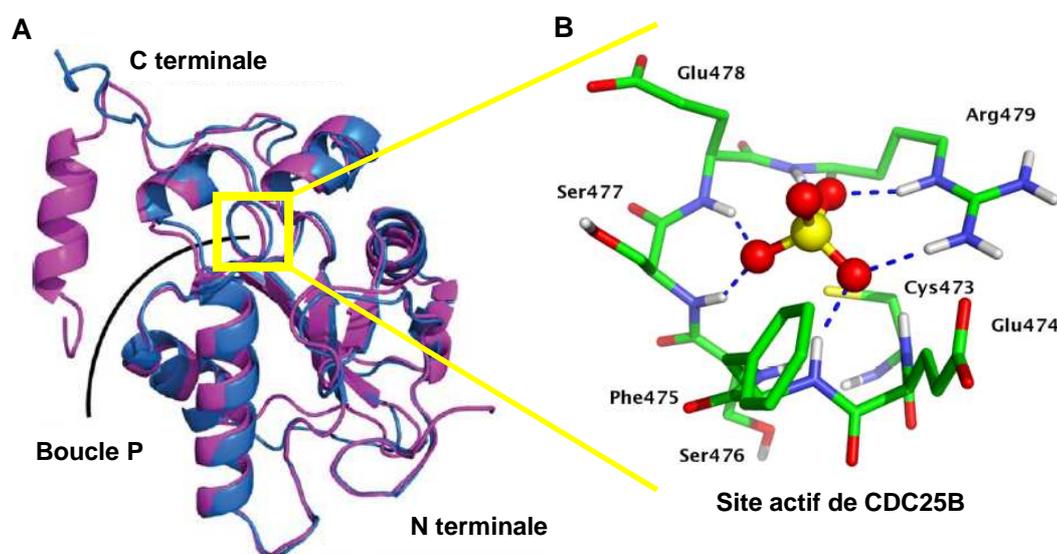


Figure 14 : Superposition des domaines catalytiques de CDC25A (bleu) et CDC25B (mauve) (A). Site actif de CDC25B en présence d'un groupement sulfate. La Cys473 catalytique est présentée sous sa forme thiolate (B) (d'après Arantes 2010 et Parks *et al.* 2009).

L'étude comparative des structures cristallines des isoformes A et B de CDC25A permis de mettre en évidence quelques différences au niveau de leurs domaines catalytiques et notamment au niveau leur extrémité C terminale. Comme indiqué en **figure 14**, une hélice α est présente à l'extrémité C terminale de CDC25B alors que cette région est mal structurée dans le cas de CDC25A. Il a été suggéré que cette « queue » C terminale permettrait la reconnaissance et l'orientation du substrat pTpY-Cdk2 /cycline A vers le site actif de CDC25B. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier plusieurs résidus essentiels comme Arg488, Arg492 et Tyr497 (Sohn *et al.* 2004 et 2005). Les progrès réalisés sur la compréhension du mécanisme de reconnaissance du substrat par CDC25B a initié l'utilisation de techniques de modélisation moléculaire qui permettent de prédire la liaison enzyme-substrat. Ce type d'approche est de plus en plus fréquemment utilisé pour le design de nouveaux ligands de CDC25B.

3.3 Mécanisme catalytique

Un mécanisme catalytique général des DSP, contenant le motif HCX₅R, a pu être décrit (**figure 15** d'après Rudolph 2007). Le groupement phosphate du substrat à déphosphoryler est maintenu dans le site actif grâce à la formation de liaisons hydrogène avec les résidus arginine et X du motif HCX₅R. Ensuite, la réaction catalytique va être possible grâce à l'intervention successive de deux résidus clés du site actif, un résidu contenant un thiol non protoné et un acide catalytique protoné. Lors de la première étape de la réaction, l'anion thiolate de la cystéine catalytique attaque la liaison P-O du groupement phosphate du substrat. Le départ du substrat et la formation de l'intermédiaire phospho-enzyme sont facilités par la protonation de l'oxyanion par un acide catalytique, un résidu aspartate localisé dans une boucle au voisinage du site catalytique. Lors de la seconde étape de la catalyse, l'hydrolyse de l'intermédiaire phospho-enzyme est rendue possible par l'action d'une molécule d'eau, qui sert de nucléophile, et du résidu aspartate qui agit, cette fois-ci, comme base pour activer cette molécule d'eau. Dans le cas des phosphatases CDC25, différents travaux ont confirmé ce mécanisme catalytique mais, contrairement aux autres DSP, ces enzymes ne possèdent pas de boucle contenant un résidu aspartate au voisinage du site actif. L'identité de l'acide catalytique des CDC25 est longtemps restée inconnue et ce n'est que récemment que Arantes a suggéré que le résidu Glu474 (pour CDC25B) pouvait jouer ce rôle (Arantes 2008).

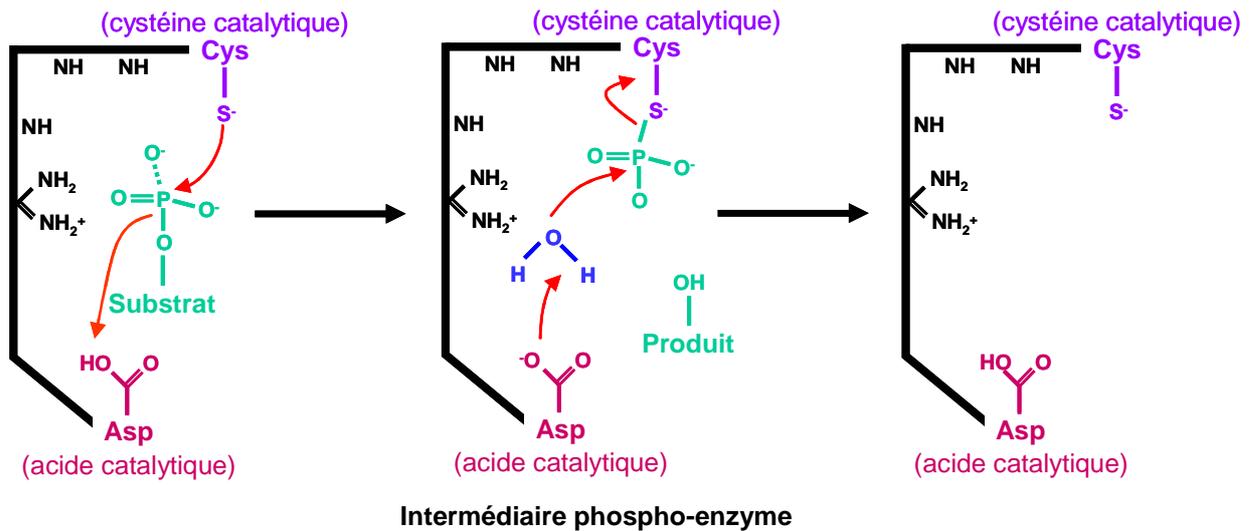


Figure 15 : Mécanisme catalytique général des phosphatases à double spécificité (adapté de Rudolph 2007).

3.4 Rôles de différentes isoformes de CDC25 au cours du cycle cellulaire

L'existence de différentes isoformes de CDC25 pouvaient laisser penser que chacune était capable d'activer des complexes Cdk/cycline distincts à différents moments du cycle cellulaire. En effet, pendant de nombreuses années, CDC25A était considérée comme un activateur précoce intervenant principalement pendant les phases G1 et S, alors que CDC25B et C n'étaient considérées actifs qu'en phases G2 et M. Cependant, de récentes études ont montré que les trois isoformes de CDC25 avaient un rôle à jouer au cours des transitions G1/S, G2/M et pendant la mitose (**figure 16** adaptée de Boutros *et al.* 2006).

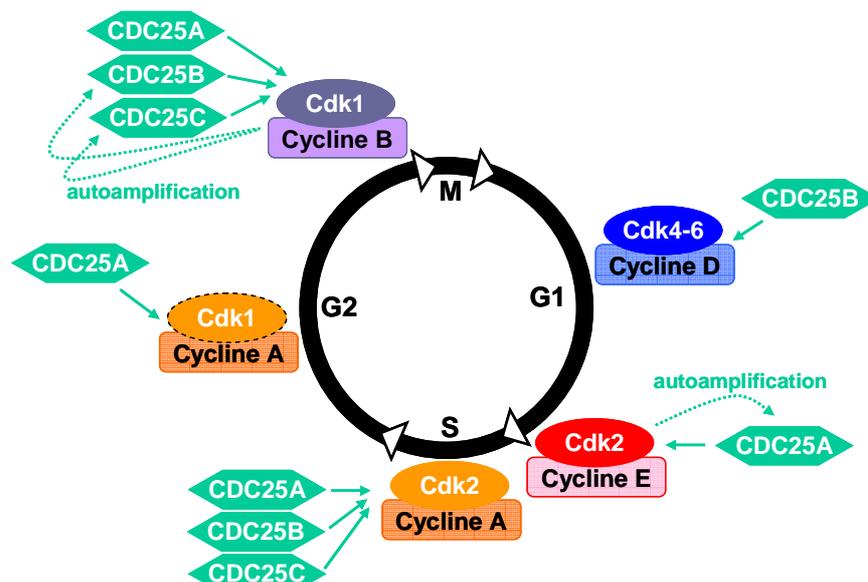


Figure 16 : Implication des différentes isoformes de CDC25 dans la régulation du cycle cellulaire (adapté de Boutros *et al.* 2006)

Il a été clairement établi que la progression de G1 à S est principalement contrôlée par l'isoforme A des CDC25. Des expériences de surexpression de la protéine ont conduit à l'accélération de la transition en phase S, associée à une augmentation d'activité des complexes Cdk2/cycline E (Blomberg et Hoffmann 1999). A contrario, des expériences de micro-injection d'anticorps anti-CDC25A ont induit un arrêt des cellules en phase G1 (Jinno *et al.* 1994). Cependant, des études réalisées en présence d'ARN antisens et interférant ont révélé que les isoformes B et C avaient aussi un rôle à jouer à la transition G1/S (Garner-Hamrick et Fisher 1998, Turowski *et al.* 2003). Notamment, l'activation des complexes Cdk2/cycline A par CDC25B au cours de la phase S permettrait la duplication du centrosome (Boutros *et al.* 2007 [a]).

Au cours de la phase G2, l'activation des complexes Cdk1-2/cycline A serait exclusivement effectuée par la phosphatase CDC25A, comme l'a suggérée une étude récente de Timofeev *et al.* (Timofeev *et al.* 2009). Par la suite, les trois isoformes des phosphatases CDC25 participeraient à l'activation des complexes Cdk1/cycline B lors de la transition G2/M. Au cours de ce processus, la phosphatase CDC25B agirait précocement en amorçant l'activation des complexes Cdk1/cycline B au niveau des centrosomes (Lindqvist *et al.* 2005). Cependant, des travaux récents ont révélé l'existence de « pools » centrosomaux de CDC25A (Shreeram *et al.* 2008) et C (Busch *et al.* 2007, Bonnet *et al.* 2008) et suggèrent que ces deux isoformes interviendraient également dans l'activation précoce des complexes Cdk1/cycline B et lors de la duplication des centrosomes. Par la suite, l'activation des complexes Cdk1/cycline B par CDC25A se poursuivrait au niveau du noyau et induirait dans le phénomène de condensation de la chromatine (Lindqvist *et al.* 2005). CDC25C achèverait l'activation complète des complexes Cdk1/cycline B dans le noyau à l'entrée en mitose (Gabrielli *et al.* 1997).

Enfin, les résultats d'une étude récente de Timofeev *et al.* ont suggéré, qu'en plus d'activer les complexes Cdk1/cycline B, les phosphatases CDC25A et B pourraient favoriser leur formation. L'inhibition des deux phosphatases par des ARN interférents spécifiques permet de réduire significativement la formation du nombre de complexes Cdk1/cycline B dans les cellules HeLa (Timofeev *et al.* 2010).

Il apparaît donc que le rôle de chaque isoforme des phosphatases CDC25 au cours du cycle cellulaire est loin d'être clairement établi et leur apparente redondance fonctionnelle reste plus que jamais controversée. Des expériences de « knock-out » réalisées chez des souris (CDC25B^{-/-} et CDC25C^{-/-}) suggèrent que CDC25A serait capable de remplir les fonctions des trois isoformes alors qu'aucune souris CDC25A^{-/-} n'est apparue viable (Ferguson *et al.* 2005).

3.5 Régulation

Pour assurer une activation appropriée des complexes cycline/Cdk au cours des différentes phases du cycle cellulaire, l'activité des phosphatases CDC25 est finement régulée (**figure 17**) (Aressy et Ducommun 2008). Divers mécanismes concourent au maintien correct de l'activité des CDC25 :

- l'abondance cellulaire de ces protéines
- leur localisation subcellulaire
- leur état de phosphorylation
- leur état redox

3.5.1 Régulation de l'abondance cellulaire

Au cours du cycle, l'abondance cellulaire des phosphatases CDC25 est dépendante d'un équilibre entre synthèse et dégradation protéique. Le niveau protéique des CDC25A et B varie selon les phases alors que celui de CDC25C reste quasi stable tout au long du cycle cellulaire normal.

CDC25A est exprimée à partir du milieu jusqu'à la fin de la phase G1 suite à son activation transcriptionnelle par les facteurs E2F et c-Myc (Galaktionov *et al.* 1996). Cette synthèse *de novo* continue de CDC25A est contrebalancée par une dégradation de la protéine afin de maintenir un niveau constant d'activation de Cdk2 pendant les phases G1 et S. Au cours de l'interphase, la protéolyse ubiquitine-dépendante de CDC25A nécessite l'intervention du complexe SCF^{βTrCP}. L'ubiquitinylation de CDC25A par SCF^{βTrCP} exige la phosphorylation préalable de certains résidus sérine au niveau de motifs DSG de cette phosphatase qui va agir comme comme un signal de protéolyse. Ces phosphorylations sont effectuées sur les résidues Ser124, 178, 279, 293 et Ser76, 82, 88 par les protéines Chk1/2 et une autre kinase encore inconnue (Busino *et al.* 2004). L'identité de cette kinase a récemment été discutée suite aux résultats de deux études contradictoires. En effet, Melixetian *et al.* ont proposé que NEK11 serait responsable de la phosphorylation des résidus Ser79, 82 et 88 de CDC25A alors que Honaker et Piwnica-Worms ont identifié la caseine-kinase 1 α (Melixetian *et al.* 2009 et Honaker et Piwnica-Worms 2010).

Ensuite, à l'entrée de la mitose, CDC25A va être phosphorylée par les complexes Cdk1/cycline B au niveau des résidus Ser18 et Ser116 (Mailand *et al.* 2002). Ces

phosphorylations stabilisent la protéine qui participe ainsi au phénomène d'amplification de l'activité des complexes Cdk1/cycline B nécessaire au déroulement de la phase M. La disparition complète de la protéine CDC25A ne s'effectue qu'à la fin de la mitose après ubiquitinylation par le complexe APC/C^{Cdh1} (Donzelli *et al.* 2002). L'ubiquitinylation par APC/C^{Cdh1} ne nécessite pas la présence de modifications post-traductionnelles de CDC25A mais est dépendante de la présence d'un motif KEN. La disparition de CDC25A est nécessaire pour mettre un terme à la mitose car elle conduit à l'inactivation des complexes Cdk1/cyclineB.

La phosphatase CDC25B s'accumule depuis la phase G1 jusqu'à atteindre un maximum au moment de la mitose (Gabrielli *et al.* 1996). L'accumulation de cette phosphatase est cruciale lors de la transition G2/M car elle permet l'activation précoce des complexes Cdk1/cycline B qui est suivie par la dégradation rapide de CDC25B par le protéasome après la métaphase (Kieffer *et al.* 2007). Tout comme nous l'avons décrit précédemment pour CDC25A, l'activation de la protéolyse de CDC25B nécessite une phosphorylation préalable de la protéine qui sera effectuée, dans ce cas, par les complexes Cdk1/cycline A (Baldin *et al.* 1997). Cependant, une étude de Kanemori *et al.* suggère qu'il existe également une voie de dégradation de CDC25A et B indépendante de la phosphorylation des motifs DSG de ces protéines mais nécessite la présence d'un motif apparenté, nommé DDG, qui sera reconnu par l'ubiquitine-ligase SCF^{βTrCP} (Kanemori *et al.* 2005).

L'expression de CDC25C est également régulée au cours du cycle cellulaire pour atteindre un maximum en phase G2 (Sadhu *et al.* 1990). Le niveau protéique de cette phosphatase reste quasi constant tout au long du cycle cellulaire car, contrairement aux isoformes A et B, CDC25C est une protéine plus stable (demi-vie de 12 h approximativement). Ainsi, la régulation de son activité se fait principalement grâce à des modifications de localisation subcellulaire.

Comme nous venons de le décrire, la régulation de l'abondance cellulaire de CDC25A joue un rôle primordial dans le déroulement du cycle cellulaire « normal » mais également dans le cas de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Ainsi, la dégradation de CDC25A peut être stimulée en phase S ou G2 suite à la détection d'une anomalie. L'activation de la voie ATM/ATR-Chk1/2 conduit à l'hyperphosphorylation des résidus sérine (Ser124, 178, 279, 293 et Ser76, 82, 88) de CDC25A, ce qui conduit à la dégradation massive de la phosphatase (Busino *et al.* 2004). La prolifération de cellule endommagée est alors stoppée pour permettre la réparation de l'anomalie détectée. De plus, une autre voie de

signalisation, ATM/ATR indépendante, a également été mise en évidence (Bulavin *et al.* 2001). La détection de dommages à l'ADN induit l'activation de la p38 MAP kinase (p38 MAPK) qui active ensuite la kinase MAPKAP-2 qui phosphoryle CDC25A au niveau des résidus Ser76 et Ser124. Cette phosphorylation de CDC25A induit la protéolyse de la protéine (**figure 17**). Récemment, Demidova *et al.* ont révélé l'existence d'un mécanisme de régulation, p53-dépendant, qui se met en place plus tardivement afin de maintenir l'arrêt du cycle cellulaire. En réponse aux dommages de l'ADN, la protéine p53 va activer le répresseur transcriptionnel ATF3 qui est capable d'inhiber l'expression de CDC25A (Demidova *et al.* 2009).

De même, il semblerait que CDC25B soit un acteur important de la réponse cellulaire au stress. Par exemple, Uchida *et al.* ont récemment montré que l'activation des voies de signalisation JNK (*c-Jun NH₂-terminal Kinase*) et p38 conduisait à la dégradation de CDC25A et B après traitement des cellules HeLa par l'anisomycine. C'est la phosphorylation de CDC25B au niveau du résidu Ser101 par ces kinases qui induirait sa dégradation (Uchida *et al.* 2009). Enfin, Lemaire *et al.* ont mis en évidence un autre mécanisme de régulation de CDC25B qui est indépendant de l'activation des voies JNK et p38. En effet, l'induction d'un stress par irradiation UV réduit le niveau protéique de CDC25B. Cette diminution n'est pas associée à une altération de la stabilité de CDC25B mais est probablement due à une inhibition de sa traduction (Lemaire *et al.* 2010).

3.5.2 La localisation subcellulaire

Au cours du cycle cellulaire « normal », les phosphatases CDC25 vont également subir des changements de localisation intracellulaire. Ces modifications sont dues, d'une part, à des interactions avec le facteur de relocalisation cytoplasmique 14-3-3, et d'autre part, à la présence de séquences NES et NLS au niveau des CDC25. C'est la phosphorylation de résidus sérine spécifiques au niveau des CDC25 par les protéines Chk1/2 ou C-TAK1 (CDC25-associated kinase 1) qui va conduire à la formation de sites de liaison à la protéine 14-3-3. Dans ces conditions, les CDC25, séquestrés dans le cytoplasme, sont mises hors de contact de leurs substrats et sont, par conséquent, inactives (Conklin *et al.* 1995).

Ainsi, la phosphatase CDC25C, lorsqu'elle est phosphorylée au niveau de la sérine 216 par la kinase C-TAK1, est retenue dans le cytoplasme tout au long de l'interphase par liaison à la protéine 14-3-3 (Peng *et al.* 1998). Au début de la mitose, il y a dissociation du complexe

CDC25C/14-3-3 et translocation rapide vers le noyau grâce au système d'importation nucléaire qui peut alors reconnaître la séquence NLS. De plus, il a été montré que la phosphorylation de la séquence NES de CDC25C contribue également à sa relocalisation nucléaire (Toyoshima-Morimoto *et al.* 2002, Bahassi *et al.* 2004). C'est la phosphorylation des résidus Ser191 et 198 par les kinases Plk3 et Plk1 (*Polo-Like Kinase*), respectivement, qui provoquerait la translocation nucléaire de CDC25C (Myer *et al.* 2005).

Concernant CDC25A, jusqu'à la publication de récentes études, il était admis que cette protéine était principalement localisée au niveau du noyau. Ces études ont révélé que CDC25A faisait constamment la navette entre le noyau et le cytoplasme, ceci grâce à la présence de séquences NLS et NES (Källström *et al.* 2005). Cependant, la localisation subcellulaire de CDC25A joue un rôle primordial avant le passage en mitose. La phosphorylation de CDC25A (Ser178 et Thr507) par Chk1 contribue à sa séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3, empêchant ainsi une entrée prématurée des cellules en mitose (Chen *et al.* 2003).

La localisation subcellulaire de CDC25B au cours du cycle reste encore incertaine. Celle-ci est plus difficile à déterminer du fait de la localisation spécifique de chaque variant d'épissage. Les transports nucléo-cytoplasmiques sont, une fois encore, régulés par la fixation à la protéine 14-3-3 et par la présence de séquences NLS et NES (Uchida *et al.* 2004).

Tous ces mécanismes, qui coordonnent la localisation cellulaire des différentes isoformes des CDC25 au cours du cycle « normal », ont aussi un rôle à jouer lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Notamment, la séquestration cytoplasmique des phosphatases CDC25, et donc leur inactivation, pourra être maintenue suite à l'activation des kinases Chk1/2 (voie ATM/ATR) et MAPKAP-2 (réponse ATM/ATR-indépendante). Par exemple, la phosphorylation du résidu Ser216 de CDC25C par Chk1/2 contribue à la création d'un site de liaison à la protéine cytoplasmique 14-3-3 (Matsuoka *et al.* 1998, Blasina *et al.* 1999). De même, la phosphorylation du résidu Ser323 de CDC25B induit sa séquestration dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. Il semblerait que cette phosphorylation puisse être réalisée par les kinases MAPKAP-2 (voie p38) (Manke *et al.* 2005) et pEg3 (Davezac *et al.* 2002) mais l'intervention d'autres kinases et sites de phosphorylation restent toujours en question (Lemaire *et al.* 2006).

3.5.3 Régulation de l'activité par phosphorylation

L'activité enzymatique des phosphatases CDC25 va aussi être régulée, positivement ou négativement, par phosphorylation (**figure 17**).

Comme nous l'avons décrit précédemment (§ « 2.1.4. La phase G2 et la transition G2/M »), l'entrée en mitose nécessite l'activation séquentielle des phosphatases CDC25B et C par phosphorylation. Les travaux de Dutertre *et al.* suggèrent que la phosphorylation de CDC25B par Aurora-A (Ser353), au niveau du centrosome, initie l'activation des complexes Cdk1/cycline B (Dutertre *et al.* 2004). De plus, d'autres phosphorylations activatrice (des résidues Ser186 et 187 par la kinase CK2) et inhibitrice (du résidu Ser169 par pEg3) de CDC25B participeraient à la régulation de l'activité de cette phosphatase au moment de la transition G2/M (Theis-Febvre *et al.* 2003 et Mirey *et al.* 2005).

Par la suite, CDC25B et C sont activés, au niveau du noyau, par leur substrat, le complexe Cdk1/cycline B. Ainsi, il y a création d'une boucle d'autoamplification qui provoque l'activation complète des complexes Cdk1/cycline B et induit l'entrée en mitose (Lammer *et al.* 1998, Hoffmann *et al.* 1993). Par exemple, l'activation de CDC25C nécessite la phosphorylation du résidu Ser214 qui empêche la phosphorylation de la Ser216 à proximité, et ceci interdit ainsi la création d'un site de fixation à la protéine 14-3-3 (Bulavin *et al.* 2003). D'autres sites de phosphorylation ont également été identifiés sur CDC25C et participent à l'activation de cette protéine (Thr48, 67, 130 qui sont susceptibles d'être reconnus par des kinases telles que Cdk, MAPK, CamK2...).

A la transition G1/S, l'activité de CDC25A est induite grâce à un mécanisme d'autoamplification suite à la phosphorylation de cette phosphatase par le complexe Cdk2/cycline E (Hoffmann *et al.* 1994).

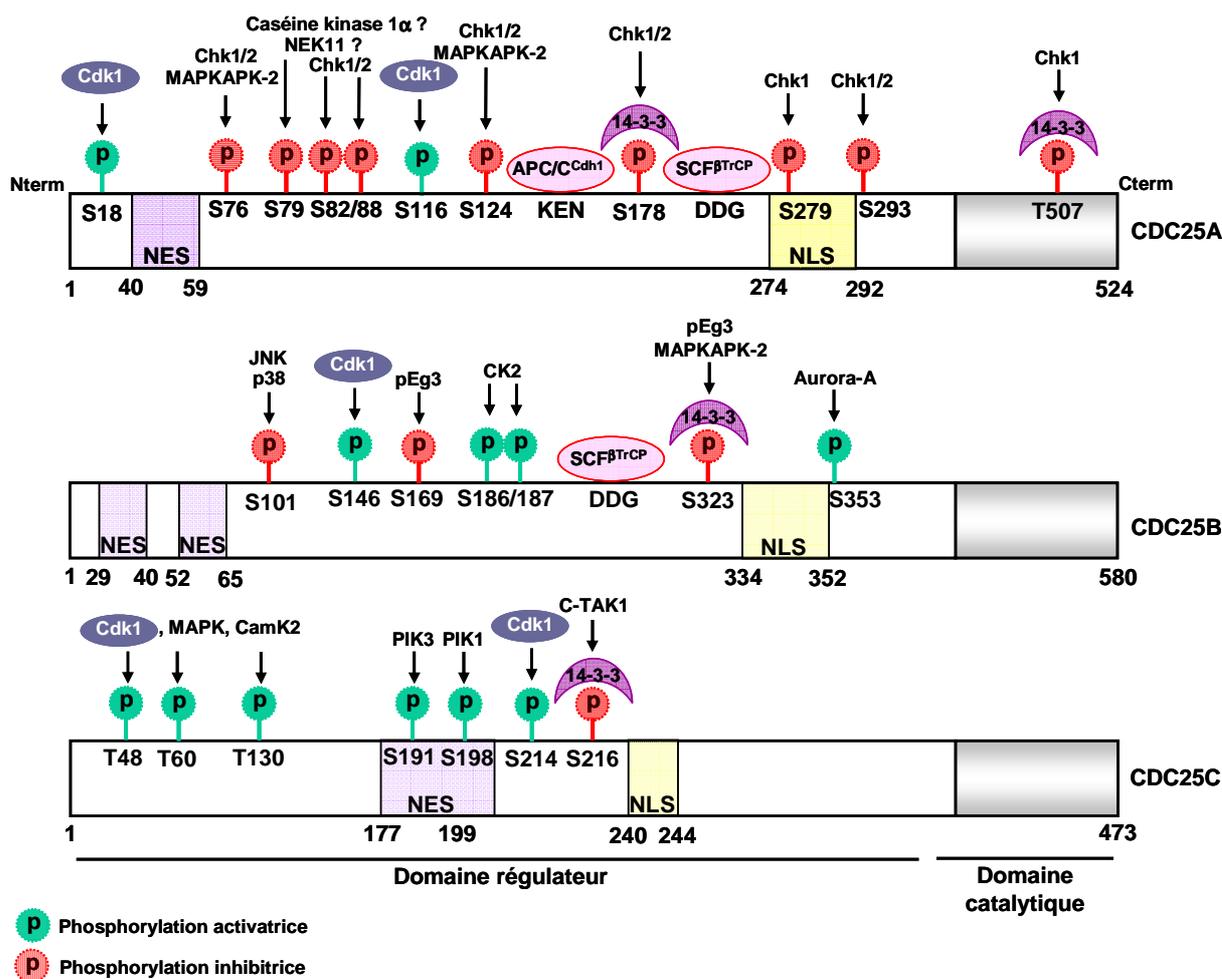


Figure 17 : Régulation de l'activité des phosphatases CDC25. Les différents domaines régulateurs ne sont pas représentés à l'échelle afin d'identifier plus clairement les principaux sites de phosphorylation (adaptée de Aressy et Ducommun 2008).

3.5.4 Régulation redox de l'activité CDC25

La cystéine du site catalytique des CDC25 est indispensable au mécanisme réactionnel de l'enzyme. Comme nous l'avons décrit précédemment, le motif H₅CX₅R, contenant la cystéine catalytique, est localisé au niveau d'une boucle à l'extrémité d'une hélice- α . Or, l'environnement créé par l'hélice- α , l'arginine (R) et les liaisons peptidiques entre les 5 résidus X fait que le pKa de la cystéine catalytique des CDC25 est particulièrement faible (par exemple pour CDC25B, pKa Cys473 = 5,8 vs 8,3 retrouvé classiquement pour un résidu Cys). Cette caractéristique confère à la cystéine catalytique des CDC25 une importante réactivité et la rend extrêmement sensible à l'oxydation (pour une revue voir Rudolph 2005). Une étude de Sohn et Rudolph en 2003 a montré qu'il était possible d'oxyder ce résidu *in vitro*, en conditions pro-oxydantes, et que ceci conduisait à une perte d'activité de l'enzyme.

L'oxydation de la cystéine catalytique conduit à la formation d'un acide sulfénique (SO^-), très instable. En présence de forte concentration en ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène), cet acide sulfénique va subir une oxydation supplémentaire pour conduire à la formation d'un acide sulfinique (SO_2^-) puis d'un acide sulfonique (SO_3^-). Ce mécanisme conduit à une inhibition irréversible de l'activité enzymatique (**figure 18**).

Par contre, en condition faiblement oxydante, un pont disulfure intramolécule va se former entre l'acide sulfénique et une cystéine voisine au sein de la protéine (Cys384 pour CDC25A, Cys426 pour CDC25B, Cys339 pour CDC25C) (**figure 18**). Dans ces conditions, la phosphatase peut être réactivée car la formation de ce pont disulfure est un phénomène réversible. En effet, sa réduction peut être effectuée par l'intervention du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (TR/TRR) (Sohn et Rudolph 2003).

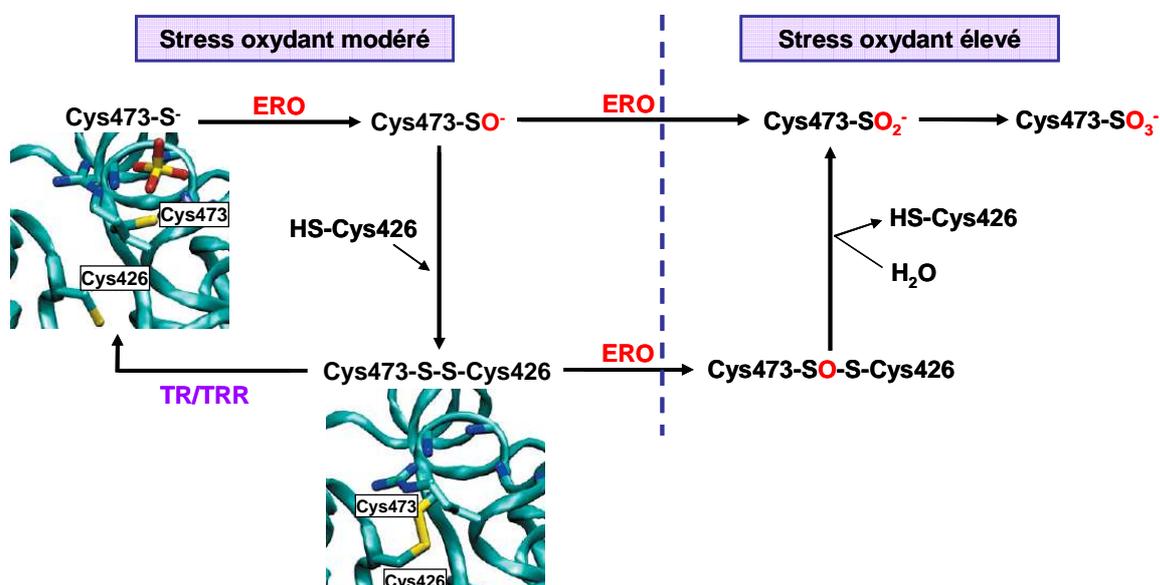


Figure 18 : Réaction d'oxydo-réduction de la cystéine catalytique (Cys473) de CDC25B (d'après Sohn et Rudolph 2003).

Cette régulation redox de l'activité des phosphatases CDC25 semblerait aussi intervenir dans le cas de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. La présence d'un pont disulfure intramolécule au sein de l'isoforme C des CDC25 contribuerait à la séquestration de l'enzyme dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3. Ceci a pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M (Savitsky et Finkel 2002).

4 CDC25 et cancer

Le cancer est une pathologie caractérisée par une prolifération anormale des cellules. En effet, dans la plupart des cas, le processus de cancérisation s'accompagne d'une altération des principaux régulateurs du cycle cellulaire (inactivation des CKI, mutation des Cdk, surexpression des cyclines et des CDC25 par exemple). Contrairement à une cellule normale, une cellule cancéreuse est incapable d'arrêter sa prolifération du fait de la perte d'intégrité des points de contrôle, ce qui conduit à une accumulation d'aberrations génétiques. Ces dernières décennies, les avancées effectuées sur la compréhension des mécanismes moléculaires régulant le cycle de division cellulaire ont conduit à considérer les régulateurs du cycle comme des cibles privilégiées de nouveaux traitements anti-cancéreux.

4.1 Phosphatases CDC25 : cibles d'intérêt dans le cancer ?

De par leurs fonctions, les phosphatases CDC25 apparaissent être des cibles de choix dans le traitement du cancer qui est LA maladie du cycle cellulaire par excellence. Comme décrit précédemment, ces phosphatases interviennent dans la régulation du cycle cellulaire en contrôlant finement l'activité des Cdk. Depuis plusieurs années, de nombreuses approches visent à inhiber de manière directe ou indirecte l'activité de ces kinases. De plus, les CDC25 jouent aussi un rôle clé lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Une inactivation de ces phosphatases conduit à l'arrêt temporaire du cycle cellulaire pour permettre à la cellule de réparer son ADN ou d'entrer en apoptose. Ainsi, une dérégulation du système des phosphatases CDC25 pourrait participer à la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

C'est pourquoi, depuis quelques années, le développement de nouvelles molécules anticancéreuses ciblant les phosphatases CDC25 a connu un essor important. Néanmoins, tout comme les agents pharmacologiques utilisés en chimiothérapie, ces molécules n'agiraient pas sélectivement sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines qui présentent une prolifération rapide. Cependant, des données issues de la bibliographie laissent penser le contraire du fait de l'existence d'une surexpression des CDC25A et B dans de nombreux types de cancer. Cette hypothèse a été confortée par des résultats récents qui montrent que des cellules cancéreuses, surexprimant CDC25B, sont plus sensibles à l'activité d'inhibiteurs de CDC25 (Guo *et al.* 2004). Or, différentes études cliniques ont rapporté qu'il existait une surexpression des CDC25 dans de nombreux types de cancers humains et que ce phénomène

était fréquemment associé à une tumeur de haut grade ainsi qu'à un mauvais pronostic vital (Kristjansdottir et Rudolph 2004). De plus, cette surexpression a pu être associée à la présence d'autres marqueurs tumoraux caractéristiques. Notamment, Yamashita *et al.* ont mis en évidence la corrélation existant entre le niveau élevé de transcrits de CDC25A et la présence du marqueur de prolifération Ki-67 lors d'une étude réalisée sur 25 échantillons tumoraux provenant de patients atteints de gliome (Yamashita *et al.* 2010).

Une surexpression, des isoformes A et B préférentiellement, a été décrite dans le cas du cancer du sein, des ovaires, de la prostate, du poumon, du colon, de l'œsophage, du pancréas, de la tête et du cou... (**Figure 19** d'après Boutros *et al.* 2007 [b]). Les données présentées sur la **figure 19** tiennent compte uniquement des études au cours desquelles une surexpression du niveau protéique des CDC25 a été rapportée. Dans le cas du cancer du sein, une surexpression de l'ARNm et de la protéine CDC25B est observée dans 32 % et 57 % des cas, respectivement (Galaktionov *et al.* 1995). De même, une surexpression de CDC25A, au niveau transcriptionnel et protéique, a été reportée dans 52 % et 70 % des patients atteints de cancer du sein (Cangi *et al.* 2000). Récemment, une étude de Mehdipour *et al.* a suggéré une possible valeur pronostic de CDC25A chez des patientes atteintes de carcinomes mammaires invasifs, sa surexpression étant associée à un mauvais pronostic vital (Mehdipour *et al.* 2009). La diversité des études réalisées laisse apparaître clairement que CDC25A et B sont très souvent surexprimées dans le cancer du sein et doivent avoir un rôle important à jouer dans le développement de cette pathologie.

Concernant l'isoforme C, seulement un nombre de cas limité de surexpression a été reporté dans la littérature. Par exemple, une étude récente a montré qu'une surexpression de CDC25C (dans 63 % des carcinomes de la vulve) était associée à un stade tumoral avancé, à la présence de métastases ganglionnaires, à un diamètre tumoral important... (Wang *et al.* 2010).

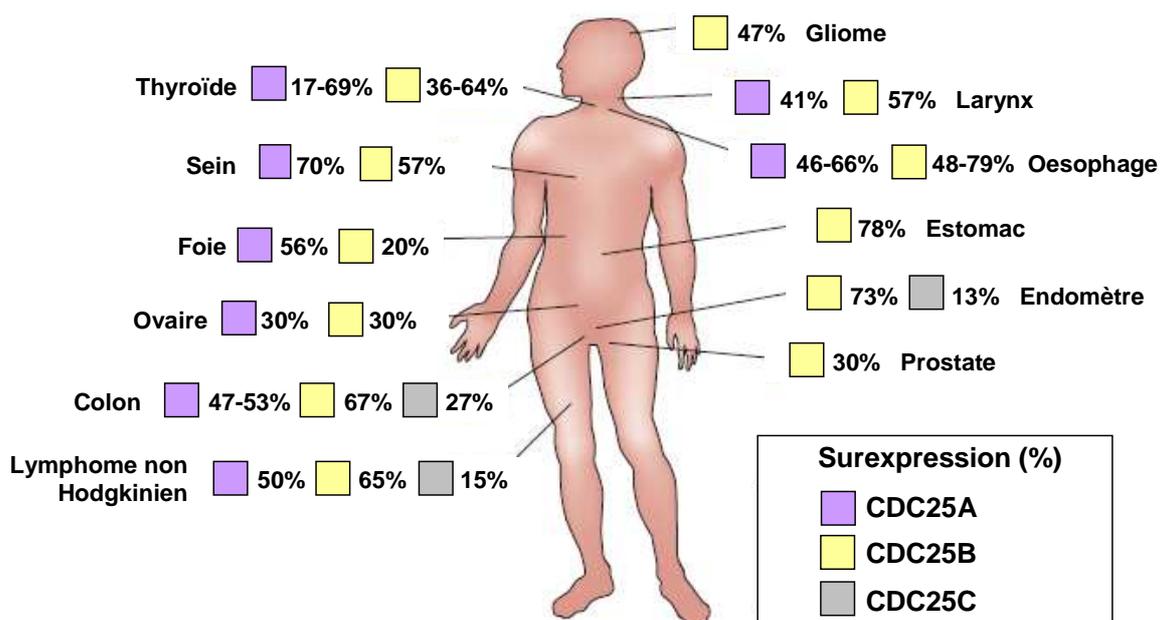


Figure 19 : Surexpression des phosphatases CDC25 dans différents types de cancer humain (adaptée de Boutros *et al.* 2007 [b]).

A ce jour, les mécanismes impliqués dans la surexpression des CDC25 restent encore mal compris car il est apparu qu'il n'existait pas forcément de corrélation entre l'induction du niveau d'ARN et de protéines. Ceci suggère que la dérégulation des CDC25 peut se faire à différents niveaux : transcriptionnel, traductionnel et même post-traductionnel. Par exemple, il a été montré que la transcription de CDC25A et B était dépendante du proto-oncogène c-Myc. Ainsi, une activation de c-Myc conduit à une augmentation du niveau d'ARNm CDC25A et B, qui est associée à une induction du niveau protéique de ces deux phosphatases (Galaktionov *et al.* 1996). D'autres phénomènes, comme une infection virale des cellules, peut également conduire à une augmentation du niveau de transcrits CDC25A et B (Spitkovsky *et al.* 1996). Des modifications post-traductionnelles peuvent aussi influencer sur le niveau protéique de CDC25 dans les cellules cancéreuses. Löffler *et al.* ont montré que la demi-vie de la phosphatase CDC25A était augmentée dans des lignées cellulaires de cancer du sein (Löffler *et al.* 2003). Dans ce cas, la surexpression protéique de CDC25A serait due à une augmentation de la stabilité de la protéine et non pas à une induction du niveau de transcrit. Récemment, il a été confirmé que la stabilisation de CDC25A dans les cellules cancéreuses faisait intervenir une régulation post-traductionnelle de la protéine par l'ubiquitine hydrolase Dub3. Dub3 est capable d'hydrolyser la queue polyubiquitinylée de CDC25A qui est un signal pour sa dégradation par le protéasome. Ainsi, une surexpression de

Dub3 est responsable d'un niveau élevé de CDC25A dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein (BT-20, MDA-MB-435, ZR-75-1, MT3, MDA-MB-231...) (Pereg *et al.* 2010).

Enfin, des travaux ont suggéré que cette surexpression des phosphatases CDC25A et B pourrait contribuer au phénomène de cancérisation des cellules. Cependant, il est apparu, que même si cette surexpression contribuait à la cancérisation, elle n'était pas suffisante pour l'induire seule. En effet, des expériences réalisées *in vivo* chez la souris ont montré qu'une surexpression de CDC25A ou B induisait une hyperplasie tissulaire sans induire de cancérisation. Des altérations cellulaires additionnelles sont nécessaires au développement de cellules tumorales (Ma *et al.* 1999, Ray *et al.* 2007). Une hypothèse concernant le rôle des CDC25 dans le processus de cancérisation serait qu'une surexpression des phosphatases CDC25A et/ou B induirait une suractivation des complexes Cdk/cycline associés, ce qui obligerait les cellules à progresser dans le cycle cellulaire de manière inappropriée. Ainsi, le cycle cellulaire se poursuivrait malgré l'accumulation potentielle d'aberrations génétiques. Bugler *et al.* ont conforté cette hypothèse en montrant qu'une induction modérée de CDC25B dans les cellules cancéreuses U2OS était suffisante pour franchir de manière inappropriée le point de contrôle G1/S (Bugler *et al.* 2010).

4.2 Les approches thérapeutiques

L'intérêt grandissant pour le développement d'agents pharmacologiques ciblant les protéines tyrosine phosphatases (PTP) n'a cessé de s'accroître suite à l'identification que 42 % des PTP connues, chez l'homme, intervenaient dans la survie ou la mort des cellules cancéreuses (MacKeigan *et al.* 2005). Cependant, contrairement au développement d'inhibiteurs de protéines kinases, celui des phosphatases a pris d'avantage de retard car, actuellement, aucun inhibiteur de PTP n'a encore été validé en vue d'une utilisation clinique (Lazo et Wipf 2008). Ceci s'explique par différentes raisons :

- Une identification et une caractérisation des PTP tardives
- Un désintérêt par rapport à ces protéines dont l'activité a longtemps été considérée comme inhibitrice
- La difficulté de concevoir des composés potentiellement actifs car ce sont des molécules chargées qui ne pénètrent pas la membrane plasmique des cellules

- Une similarité importante du site actif des différentes classes de PTP, ce qui réduit la sélectivité d'action des agents pharmacologiques

Malgré cela, le développement des connaissances concernant les PTP a permis de donner un essor considérable à la recherche de nouveaux agents pharmacologiques, et notamment ceux ciblant les phosphatases à double spécificité CDC25.

4.2.1 Le développement d'inhibiteurs de CDC25

Dans un premier temps, la stratégie thérapeutique paraissant la plus adaptée, fut le développement d'inhibiteurs agissant directement au niveau du site catalytique de l'enzyme. Depuis 1994, date à laquelle le premier inhibiteur naturel des CDC25 a été identifié, de nombreux laboratoires se sont lancés dans la recherche de nouveaux et puissants inhibiteurs de CDC25. Les différents inhibiteurs qui ont été identifiés au cours de ces dernières années seront décrits plus en détail dans la section « 5. Inhibiteurs des phosphatases CDC25 ». Une interrogation persiste concernant la spécificité d'action des inhibiteurs de CDC25 : faut-il cibler une ou plusieurs isoformes de CDC25 ? Il semblerait que privilégier une inhibition globale de l'activité des CDC25 permettrait d'éviter toute redondance fonctionnelle éventuelle qui pourrait exister entre les différentes isoformes.

Une limite à cette stratégie d'inhibition directe des CDC25 est néanmoins apparue. En effet, les phosphatases CDC25 sont des protéines possédant une demi-vie courte, ce qui laisse supposer que l'action d'agent pharmacologique vis-à-vis de l'activité enzymatique pourrait être rapidement réversée à cause du turn-over rapide de l'enzyme (Ducruet et Lazo 2003). Cependant, il a été observé dans de nombreux modèles qu'un redémarrage inapproprié ou partiel du cycle cellulaire pouvait tout de même conduire les cellules à entrer en apoptose.

4.2.2 Les activateurs de CDC25

Un autre type d'approche, l'activation des CDC25, a également été envisagé suite à la mise en évidence du rôle primordial des phosphatases CDC25 lors de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Notamment, suite à un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, l'augmentation d'expression de CDC25B semble cruciale lors du redémarrage après réparation des dommages de l'ADN (Van Vugt *et al.* 2005, Bansal et Lazo 2007). En 2008, Aressy *et al.* ont montré qu'une faible induction du niveau de CDC25B permettait d'abolir le point de contrôle

G2/M et de sensibiliser les cellules à l'action d'agents génotoxiques et de radiations ionisantes (Aressy *et al.* 2008). Ainsi, en dépit de la présence de dommages à l'ADN, une induction de CDC25B forcerait la cellule à entrer en mitose, conduisant à une accumulation d'anomalies génétiques qui favoriserait la mort de la cellule par apoptose. Cette stratégie thérapeutique n'a de sens que si l'activateur de CDC25B est associé à un traitement susceptible de provoquer des dommages à l'ADN (la radiothérapie ou la chimiothérapie utilisant des molécules clastogènes par exemple). Actuellement, aucune molécule permettant l'activation directe des phosphatases CDC25 n'a été reportée. Cependant, une incertitude persiste quant à l'efficacité d'un tel type d'approche thérapeutique. En effet, si cette stratégie ne mène pas à la mort des cellules cancéreuses par apoptose, ces dernières pourraient acquérir d'avantage d'aberrations génétiques qui risqueraient de rendre le cancer plus agressif.

5 Les inhibiteurs des phosphatases CDC25

A ce jour, différentes classes d'inhibiteurs de CDC25 ont été répertoriées dans la littérature (pour des revues récentes voir Contour-Galcera *et al.* 2007, Brezak *et al.* 2008 et Lavecchia *et al.* 2008, 2009 et 2010). Parmi ceux-ci, il existe des composés :

- d'origine naturelle qui présentent, généralement, un potentiel inhibiteur modeste (CI₅₀ de l'ordre du μ M) ainsi qu'une faible sélectivité
- de synthèse qui dérivent pour la plupart d'inhibiteurs naturels connus et dont la structure a été modifiée afin améliorer l'activité inhibitrice

5.1 Les produits naturels

En 1994, les premiers inhibiteurs des phosphatases CDC25 ont été mis en évidence par Horiguchi *et al.*. Ces composés, nommés **dnacins**, sont des alcaloïdes naturels qui ont été isolés de culture de bactéries *Nocardia sp.* Notamment, les **dnacins A1** et **B1** (**figure 20**) sont apparues comme des inhibiteurs non compétitifs de la phosphatase CDC25B (Horiguchi *et al.* 1994).

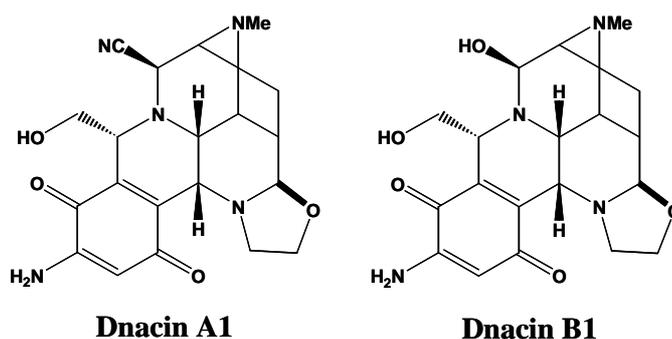


Figure 20 : Structures des dnacins A1 et B1

Par la suite, dès 1996, la recherche d'inhibiteurs de CDC25 va s'accélérer après la découverte de nouveaux inhibiteurs naturels, la **dysidiolide** (**figure 21**) et ses dérivés (Gunasekera *et al.* 1996). Ces derniers vont être les premiers inhibiteurs de CDC25 dont l'activité va être étudiée avec attention. La **dysidiolide** est une molécule qui est retrouvée en faible quantité dans une espèce d'éponge de mer, *Dysidea etheria*, qui vit à une trentaine de mètres de profondeur dans les eaux des Caraïbes. Ce composé a été présenté, dans un premier temps, comme un inhibiteur relativement spécifique de CDC25A (CI_{50} de 9,4 μ M) (Gunasekera *et al.* 1996). Cependant, ce potentiel inhibiteur va être remis en question suite à la synthèse *de novo* de la molécule indiquant que le composé pur ne présente qu'une $CI_{50} > 50$ μ M pour CDC25A (Blanchard *et al.* 1999). Malgré cela, il a été admis que l'activité inhibitrice de la **dysidiolide** est due à la présence du groupement γ -hydroxybuténolide, qui mimerait le groupement phosphate, et à une région hydrophobe, représentée par la chaîne latérale associée au motif octahydronaphtalène, qui se lierait à une poche hydrophobe au niveau de l'enzyme. Sur la base de cette structure, des analogues de **dysidiolide** et de **vitamine D3** (**figure 21**) ont été synthétisés et évalués comme inhibiteurs des phosphatases CDC25 (Dodo *et al.* 2000, Takahashi *et al.* 2000, Shimazawa *et al.* 2004a-b). En 2000, Dodo *et al.*, ont synthétisé un composé (**composé 3b** présenté en **figure 21**) capable d'inhiber CDC25A *in vitro* ($CI_{50} = 7,7$ μ M) et d'induire un arrêt en phase G1 des cellules HL-60 en culture. D'autres de ces composés se sont révélés être de puissants inhibiteurs des isoformes A et B *in vitro* comme le **composé 5b** ($CI_{50} = 0,44$ μ M et 1,9 μ M pour CDC25A et B, respectivement) (**figure 21**). Cependant, aucune étude concernant les effets cellulaires de ce composé n'a été réalisée à ce jour (Shimazawa *et al.* 2004a).

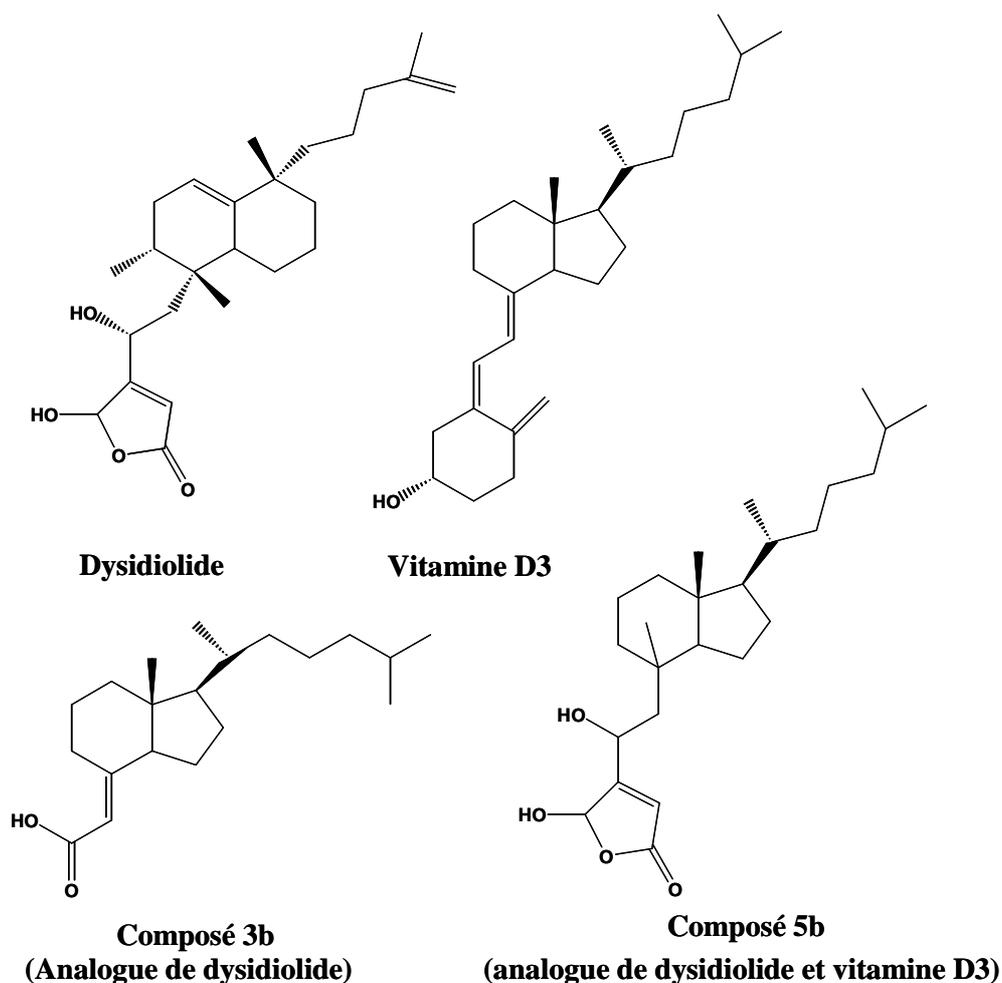


Figure 21 : Structures de la dysidiolide et ses dérivés

Par la suite, de nombreuses molécules biologiquement actives ont pu être isolées à partir d'autres organismes marins. En effet, plusieurs équipes ont pu extraire et isoler des composés capables d'inhiber les phosphatases CDC25 à partir de diverses espèces d'éponges marines. Dès 1997, la **sulfircine** (**figure 22**), un sesquiterpène sulfate isolé d'une éponge du genre *Ircinia*, a été identifié comme inhibiteur de CDC25A *in vitro* ($CI_{50} = 7,8 \mu\text{M}$) (Cebula *et al.* 1997). En 2001, Loukaci *et al.* ont isolé et purifié un autre sesquiterpène sulfate (**coscinosulfate**, présenté en **figure 22**) d'une espèce d'éponge de Nouvelle Calédonie, *Coscinoderma matthewsi*. Une inhibition de l'activité CDC25A a été reportée ($CI_{50} = 3 \mu\text{M}$) mais aucune activité antiproliférative n'a pu être mise en évidence lors de traitements de cellules Jurkat (lymphoblastes T leucémiques) et HBL-100 (cellules épithéliales mammaires saines) par $20 \mu\text{M}$ de **coscinosulfate**.

Un autre composé naturel, l'**adociaquinone B** (**figure 22**), isolé de l'éponge marine *Xestospongia*, a été identifié comme étant un inhibiteur puissant de CDC25B *in vitro* ($CI_{50} = 70 \text{ nM}$). Ce composé, contenant un motif naphtoquinone, agirait par oxydation de la

cystéine catalytique de l'enzyme (Cao *et al.* 2005). Des expériences complémentaires, utilisant des analogues synthétiques d'**adociaquinone B**, ont permis d'affiner le mécanisme d'action de ce composé. Il semblerait que le groupement tricyclique benzofuranone jouerait un rôle primordial dans le positionnement de la molécule pour permettre l'oxydation de la cystéine catalytique de CDC25B (Cao *et al.* 2009).

Des **polyprenyl-hydroquinones (figure 22)** ont été extraits et isolés de trois espèces d'éponges de Méditerranée (*Spongia officinalis*, *Ircinia spinulosa* et *Ircinia muscarum*). Ils ont été identifiés comme inhibiteurs de CDC25A *in vitro* (CI₅₀ de l'ordre du micromolaire) et agiraient en se liant de façon covalent au groupement thiol de la cystéine catalytique (Erdogan-Orhan *et al.* 2004).

Plus récemment, l'équipe de Lazo (Université de Pittsburgh, MA, USA) a mis en évidence quatre nouveaux inhibiteurs de CDC25 appelés **caulibugulones (figure 22)**. Ces **caulibugulones (A-D)** sont des quinones retrouvées, à l'état naturel, dans un bryozoaire marin, *Caulibugula intermis* (Wipf *et al.* 2004). L'inhibition des 3 isoformes de CDC25 (CI₅₀ = 1,51 - 19,1 μ M *in vitro*) a pu être corrélée à un arrêt de croissance des cellules tumorales. Le mécanisme d'action cellulaire de la **caulibugulone A** a été étudié plus en détail. Ce composé inactive directement l'activité enzymatique par oxydation, ERO dépendante, de la cystéine catalytique. Parallèlement à cela, un deuxième mécanisme se met en place, la **caulibugulone A** active la voie p38 MAPK qui va induire la dégradation de CDC25A (Brisson *et al.* 2007).

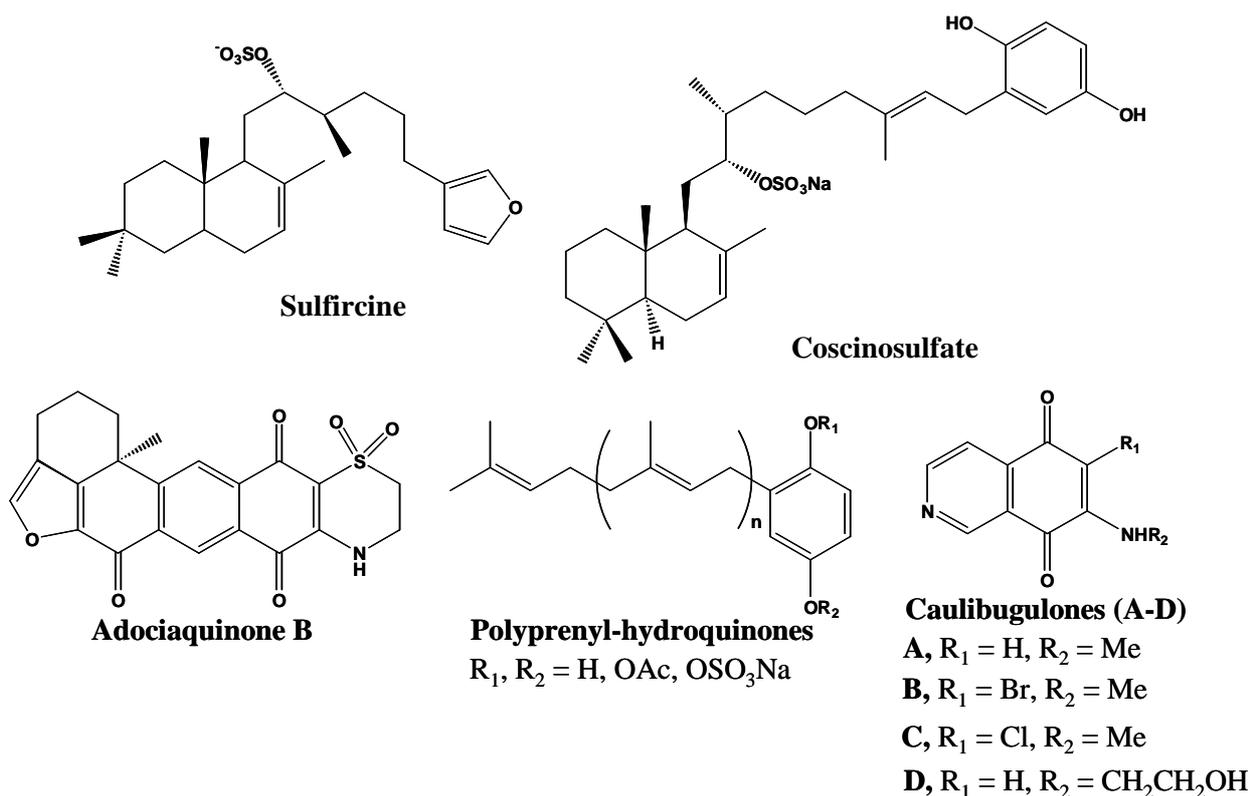


Figure 22 : Inhibiteurs de CDC25 isolés d'organismes marins

5.2 Les composés de synthèse

5.2.1 Les quinones

Parmi les plus puissants inhibiteurs des phosphatases CDC25 identifiés à ce jour, beaucoup d'entre eux appartiennent à la famille des quinones. Ces composés, très réactifs du fait de la présence de la fonction quinone, qui possède des propriétés électrophile et redox, exerceraient leur action en oxydant de manière irréversible de la cystéine catalytique des CDC25. Cependant, tous les composés quinoniques ne sont pas de puissants inhibiteurs de CDC25 car la fraction non quinonique de la molécule joue également un rôle primordial dans l'activité de ces composés. En effet, cette dernière permet la création de diverses interactions de type polaire, électrostatique, hydrophobe avec l'enzyme et favorise le positionnement de la portion active de la molécule au voisinage de la cystéine catalytique.

L'utilisation des composés quinoniques dans le cadre d'une thérapie ciblée reste tout de même controversée du fait d'un manque de sélectivité d'action. En effet, les quinones sont connues pour leur capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui pourraient induire une cytotoxicité au niveau de cellules saines.

5.2.1.1 Les para-quinones

Le point de départ de la synthèse de nombreux inhibiteurs quinoniques de CDC25 a été la découverte, en 1993, d'un inhibiteur naturel de tyrosine phosphatases, la **ménadione (vitamine K3)** (Juan et Wu 1993) (**figure 23**). En 1997, Ham *et al.* ont montré que la **ménadione** se liait directement au domaine catalytique de CDC25A, provoquant un arrêt de la prolifération puis l'apoptose des cellules SiHa (carcinome cervical humain) (Wu et Sun 1999). Par la suite, des dérivés de ménadione ont donc été synthétisés dans le but d'améliorer leurs activités inhibitrices vis-à-vis des CDC25. Par exemple, un inhibiteur compétitif et sélectif des CDC25 été synthétisé, le **composé 5** (dérivé thioalkylé de **ménadione**) (**figure 23**). Celui-ci est capable d'inhiber la prolifération de cellules d'hépatome de rat (JM-1) *in vitro* et *in vivo* (Kar *et al.* 2003). De manière surprenante, un inhibiteur présentant une structure très proche du **composé 5** a été identifié par l'équipe de Lazo suite au screening de 10 070 composés provenant de la chimiothèque du NCI (National Cancer Institute). Le composé **NSC95397** (**figure 23**) est un puissant inhibiteur sélectif et irréversible des phosphatases CDC25 *in vitro* ($CI_{50} = 22 \pm 6$ nM, 125 ± 36 nM et 57 ± 18 nM vis-à-vis des isoformes A, B et C, respectivement). Son activité antiproliférative a notamment été montrée sur la lignée d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 ($CI_{50} = 7$ μ M) et a pu être associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. La présence des deux groupements thio-éthanol au sein de la molécule semble jouer un rôle primordial car leurs modifications contribuent à réduire significativement l'activité inhibitrice du composé (Lazo *et al.* 2002).

L'intérêt pour le **composé 5** et **NSC95397** a été confirmé par la suite car différents analogues ont été synthétisés dans l'objectif de réduire la toxicité due à la production d'ERO. Ainsi, l'incorporation d'atomes de fluor, très électro-négatifs, dans le composé **NSC95397** (nommé **F-NSC95397** en **figure 23**) a permis de conserver les propriétés inhibitrices de cette molécule tout en réduisant sa capacité à produire des ERO (Park *et al.* 2007). De même, pour le **composé 5**, Kar *et al.* ont montré que le dérivé fluoré de ce dernier (**F-composé 5** présenté en **figure 23**) inhibe l'activité des phosphatases CDC25 ($CI_{50} = 0,8$ μ M et 1 μ M pour CDC25A et B *in vitro*, respectivement). L'inhibition de ces phosphatases a également été reportée dans la lignée d'hépatomes Hep3B et a été associée à une diminution de la prolifération cellulaire en présence de **F-composé 5**. De plus, le **F-composé 5** inhibe sélectivement la prolifération des cellules cancéreuses (Hep3B) par rapport aux hépatocytes sains, contrairement à ce qui est observé pour le **composé 5** non fluoré. L'étude du niveau de stress oxydant dans les cellules Hep3B a montré que le **composé 5** conduit à la génération d'environ trois fois plus d'ERO que le

F-composé 5 (Kar *et al.* 2006 [c]). Enfin, l'intérêt pour de tels composés reste toujours d'actualité car récemment l'activité antiproliférative de nouveaux dérivés N-substitués du **F-composé 5** a été étudiée (Zakharova *et al.* 2010). Comme le **F-composé 5**, ces derniers affectent sélectivement la croissance des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines (par exemple pour le composé 2 de la publication d'origine, $CI_{50} = 2,2 \mu\text{M}$ et 1,3 pour les cellules cancéreuses RPMI 8226 (myélome) et MCF-7 (cancer du sein) vs $20 \mu\text{M}$ pour la lignée de fibroblaste murin LMTK).

L'équipe de Lazo a également mis en évidence une série de quinolinediones comme inhibiteurs de CDC25 *in vitro*. Le composé le plus intéressant de cette série, **NSC663284** (**figure 23**), s'est avéré être un inhibiteur irréversible qui exerce son activité en fonction du temps ($CI_{50} = 210 \pm 80 \text{ nM}$ pour CDC25B2) (Lazo *et al.* 2001). Plus récemment, un nouvel inhibiteur apparenté, exerçant une activité similaire au composé **NSC663284**, a été mis en évidence : **JUN-1111** (**figure 23**). L'action de ces deux composés s'exercerait par un mécanisme redox d'inactivation de l'enzyme. Tout d'abord, le potentiel inhibiteur de ces deux composés apparaît diminué en présence d'agent réducteur tel que le glutathion (GSH). De plus, des analyses, réalisées en spectrométrie de masse, ont permis d'identifier la présence de résidu cystéine oxydé, en acide sulfonique Cys-SO_3^- , au niveau du site catalytique de l'enzyme. Enfin, des traitements de cellules en culture par **NSC663284** et **JUN-1111** ont conduit à la production d'ERO dans les cellules. Toutes ces données suggèrent que les composés **NSC663284** et **JUN-1111** inhibent les phosphatases CDC25 *via* une oxydation irréversible de leur cystéine catalytique (Brisson *et al.* 2005). Des analyses complémentaires, réalisées sur le composé **NSC663284**, ont montré que ce dernier était capable d'inhiber la prolifération des cellules MCF-7 *in vitro* (Lazo *et al.* 2001). Le traitement de cellules synchronisées conduit à un arrêt du cycle cellulaire en G1 et G2/M, qui est associé à une inhibition de la phosphorylation des Cdk dans les cellules (Pu *et al.* 2002). En 2007, des études, visant à évaluer la toxicité, l'efficacité antitumorale et la pharmacocinétique du composé **NSC663284** *in vivo*, ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent qu'une administration *i.v.* (5 mg/Kg) de **NSC663284** induit une faible inhibition de la croissance de cellules humaines de cancer du colon (HT-29) greffées chez des souris SCID. Il apparaît que ce composé est rapidement métabolisé et éliminé de l'organisme, par conjugaison au glutathion (Guo *et al.* 2007).

La collaboration entre les équipes de Ducommun (Université Paul Sabatier, Toulouse, France) et Prévost (IPSEN, Les Ulis, France) a également largement participé à la mise en évidence de nouveaux inhibiteurs de CDC25.

Tout d'abord, le composé **BN82685** (**figure 23**) a été identifié comme un inhibiteur sélectif et irréversible des phosphatases CDC25 *in vitro* ($CI_{50} = 250, 250$ et 170 nM vis-à-vis de CDC25A, B et C respectivement). Des études de prolifération cellulaire ont montré que ce composé possédait, non seulement, une activité antiproliférative sur de nombreuses lignées de cellules cancéreuses en culture (DU-145, MIA PaCa-2, A2058...) mais aussi *in vivo* sur des tumeurs humaines xéno greffées (Brezak *et al.* 2005). Ces études, réalisées *in vivo*, ont montré que le **BN82685** était capable d'inhiber la croissance de tumeur MIA PaCa-2 chez des souris nude xéno greffées après administration orale du composé. Plus récemment, des études d'association avec le paclitaxel ont confirmé l'efficacité du composé à faible dose sur des cellules de cancer du colon en culture (Cazales *et al.* 2007). Ces résultats renforcent l'intérêt d'associer les inhibiteurs de CDC25 à des agents cytotoxiques utilisés de manière conventionnelle en chimiothérapie.

D'autre part, Brun *et al.* ont reporté en 2005 le potentiel inhibiteur de dérivés naphtoquinones inédits contenant un groupement carboxylate capable de réagir avec deux résidus arginine de CDC25B (R482 et R544) qui interviennent dans la reconnaissance du substrat ($CI_{50} = 1,8-10,5$ μ M pour la plupart des composés testés). L'étude des effets cellulaires de l'un de ces composés (**composé 1** dans la publication d'origine, présenté en **figure 23**) a suggéré que l'altération de la croissance des cellules HeLa ainsi que l'induction de l'apoptose étaient associées à l'inhibition de l'activité CDC25B dans les cellules (Brun *et al.* 2005). Sur la base de ces résultats, la synthèse d'une nouvelle série de dérivés naphtoquinone et quinolinedione, contenant un groupement carboxylate ou malonate à l'extrémité d'une chaîne aliphatique, a été envisagée de manière à favoriser les interactions enzyme-inhibiteur. Cependant, les modifications chimiques apportées n'ont pas permis d'augmenter significativement le pouvoir inhibiteur de ces composés (Braud *et al.* 2008).

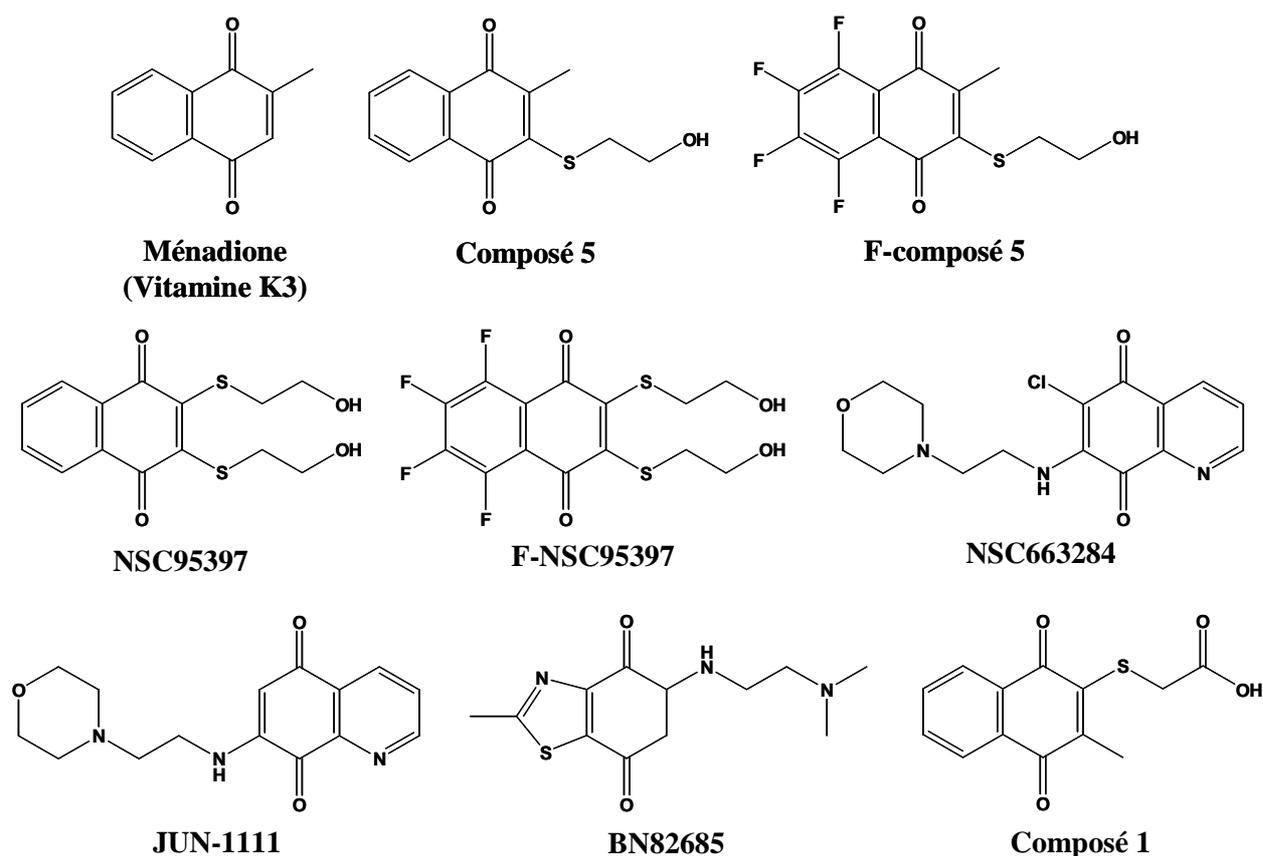


Figure 23 : Inhibiteurs des phosphatases CDC25 de structure para-quinoniques

5.2.1.2 Les ortho-quinones

En plus des nombreuses para-quinones identifiées, des composés présentant une structure ortho-quinoniques ont également été reportés comme inhibiteur des phosphatases CDC25.

Certains composés ont été identifiés suite à des criblages effectués dans des chimiothèques. Tout d'abord, un criblage *in silico* est effectué qui va permettre de sélectionner des molécules susceptibles de réagir avec la protéine cible. Ensuite, l'activité des composés, potentiellement inhibiteurs, est évaluée *in vitro* en présence de l'enzyme purifiée. Une série de naphtofuranediones a pu être isolée à partir des 10 000 molécules provenant de la chimiothèque PRIME de Chembridge (San Diego, CA). Parmi cette nouvelle classe d'inhibiteurs compétitifs et réversibles, le composé **5159131** (**figure 24**) a été choisi pour des investigations plus poussées suite aux résultats obtenus *in vitro* ($CI_{50} = 5, 10$ et $9 \mu\text{M}$ vis-à-vis de CDC25A, B et C, respectivement) (Brisson *et al.* 2004). Il est apparu être un des rares inhibiteurs compétitifs de CDC25 présentant une activité antiproliférative sur des lignées de

cellules cancéreuses ($CI_{50} = 6,5$ et $1,2 \mu\text{M}$ vis-à-vis des lignées PC-3 et MDA-MB-435, respectivement).

Une autre série de composés, possédant également une structure naphtofuranedione, a été étudiée par un groupe de chercheurs chinois. Il s'agit d'analogues de cryptotanshinone, un composé naturellement présent dans le rhizome d'une plante utilisée en médecine chinoise traditionnelle, *Salvia miltiorrhiza*. Les composés **18** et **26** (**figure 24**) ont été identifiés comme des inhibiteurs de CDC25B *in vitro* ($CI_{50} = 5$ et $3 \mu\text{M}$, respectivement) et ont montré une activité cytotoxique sur des cellules A-549 de cancer du poumon ($CI_{50} = 4$ et $2 \mu\text{M}$, respectivement) (Huang *et al.* 2005). Récemment, deux autres composés, possédant des substitutions sur le cycle furane, ont montré une puissante activité inhibitrice de CDC25A et B *in vitro* (CI_{50} de $0,48$ à $1,1 \mu\text{M}$ pour les composés **4** et **8** (**figure 24**), respectivement) (Huang *et al.* 2009). Enfin, en 2009, ce même groupe s'est intéressé de plus près au mécanisme d'action cellulaire d'un nouvel inhibiteur ortho-quinonique de CDC25, le composé **LGH00031** (**figure 24**). Cet inhibiteur de CDC25A et B est capable d'altérer la prolifération de différentes lignées cellulaires cancéreuses en induisant un arrêt du cycle en phase G2/M. Cette activité antiproliférative a été clairement associée à une inhibition des CDC25 cellulaires par un mécanisme ERO-dépendant (Zhou *et al.* 2009).

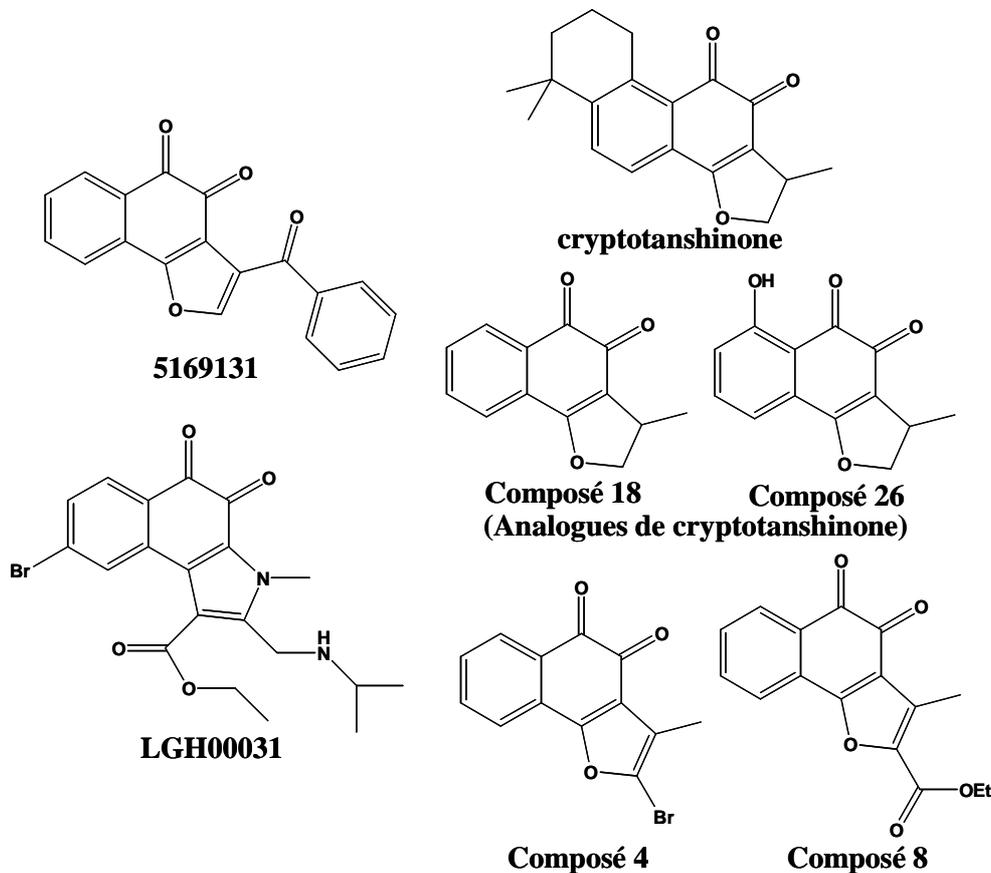


Figure 24 : Inhibiteurs des phosphatases CDC25 de structure ortho-quinoniques

5.2.1.3 Composé bis-quinonique

Récemment, les équipes de Ducommun et Prévost ont identifié un nouvel et puissant inhibiteur de CDC25 : **IRC-083864** (**figure 25**), un composé bis-quinonique (Brezak *et al.* 2009). Ce dernier inhibe de manière sélective les trois isoformes de CDC25 *in vitro* ($CI_{50} = 23, 26$ et 23 nM vis-à-vis de CDC25A, B2 et C, respectivement). De plus, ce composé est capable d'inhiber la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses, parmi lesquelles MIA PaCa-2 (pancréas), LNCaP (prostate), MCF-7 (sein) et A2058 (peau) sont les plus sensibles (CI_{50} de 7 à 25 nM respectivement). De manière intéressante, cette activité antiproliférative a également été reportée sur différentes lignées de cellules cancéreuses résistantes à des agents cytotoxiques utilisés en chimiothérapie conventionnelle comme la daunorubicine, la doxorubicine et le cisplatine. Enfin, l'activité du composé **IRC-083864** s'exerce également *in vivo*. En effet, une administration orale ou intraveineuse de ce composé permet de réduire significativement la croissance de tumeurs humaines de pancréas et de prostate établies chez la souris « nude ». Ces résultats laissent envisager un avenir prometteur pour le développement de cet inhibiteur de CDC25 en essais cliniques.

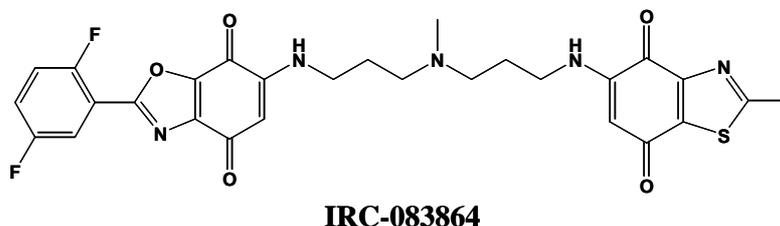


Figure 25 : Structure du composé **IRC-083864**, un inhibiteur bis-quinonique de CDC25

5.2.2 Les composés non-quinoniques

L'utilisation de dérivés non quinoniques, en tant qu'inhibiteur potentiel des CDC25, a également été envisagée. En effet, bien qu'étant des puissants inhibiteurs de CDC25, les quinones possèdent des propriétés redox qui favorisent la génération de stress oxydant susceptible d'induire une toxicité cellulaire généralisée. Afin d'augmenter la sélectivité d'action, des inhibiteurs potentiels de CDC25 non-quinoniques ont été synthétisés. Pour cela, deux stratégies majeures ont été envisagées :

- mimer le groupement phosphate, présent sur le substrat naturel des CDC25, en incorporant dans les composés des fonctions réactives de type acide carboxylique, γ -hydroxybutenolides ou acide oxoacétique
- inactiver la cystéine catalytique des CDC25 par réaction avec des composés électrophiles

5.2.2.1 Les composés mimant le groupement phosphate

Le premier inhibiteur de CDC25 identifié comme mimant le groupement phosphate a été la **dysidiolide**. Comme nous l'avons décrit précédemment, ce composé possède une partie hydrophile, qui mimerait le phosphate, et une partie hydrophobe qui permettrait l'ancrage du composé dans une région hydrophobe de l'enzyme. Sur la base de ce modèle structurel, des composés, à la fois hydrophile et hydrophobe, ont été synthétisés.

Une série de composés dérivés de stéroïde a été évaluée par Baürle *et al.* en 2004. Le composé **13 (figure 26)**, qui est la molécule la plus active de cette série ($CI_{50} = 3,4 \mu M$ vis-à-vis de CDC25B), serait capable d'entrer en compétition avec le substrat et se lierait à l'enzyme au niveau du site de liaison du groupement phosphate.

Le composé **KR61170 (figure 26)** a également été reporté comme un inhibiteur de CDC25 dont le groupe fonctionnel oxoacétate serait capable de mimer le groupement phosphate. **KR61170** inhibe les isoformes A et B de CDC25 ($CI_{50} = 1,5$ et $0,17 \mu M$, respectivement) mais est peu sélectif du fait de son activité inhibitrice vis-à-vis d'autres phosphatases comme PTP-1B, CD45 (Cheon *et al.* 2004).

Sur la base d'analogie structurale avec la **dysidiolide**, une série de dérivés d'anhydride maléique a été synthétisée au sein de notre laboratoire et le potentiel inhibiteur de ces composés a été évalué *in vitro* en présence d'enzymes purifiées. Parmi ceux-ci, les composés possédant la chaîne hydrophobe la plus longue (composés **1i** et **1j** présentés en **figure 26**) ont été identifiés comme les inhibiteurs les plus puissants (Brault *et al.* 2007). Dès 24 h de traitement, ces composés induisent un blocage en G0/G1 des cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7, qui est suivi par une entrée des cellules en apoptose après 48 h de traitement (Brault et Bagrel 2007).

De même, en 2009, une équipe japonaise a synthétisé de nouvelles molécules amphiphiles dérivées N-alkylés d'acide acétique oxindolylidene (**figure 26**) qui présentent des analogies structurales avec la **dysidiolide** (Shimazawa *et al.* 2008). Tout comme ce qui a été décrit par

notre équipe, le potentiel inhibiteur de ces composés augmente avec la longueur de la chaîne carbonée (CI_{50}^{CDC25A} de 2-100 μM pour une chaîne carbonée $C_{16}-C_6$).

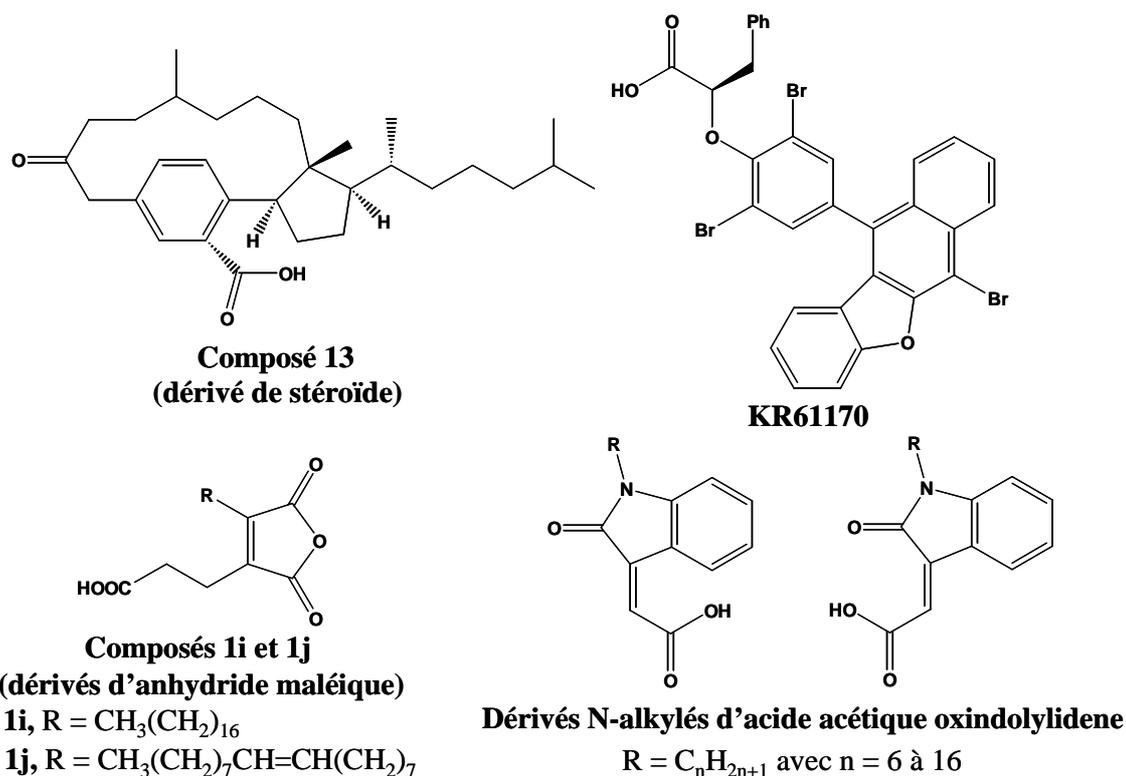


Figure 26 : Inhibiteurs des phosphatases CDC25 mimant le groupement phosphate

5.2.2.2 Les inhibiteurs électrophiles

Les composés électrophiles sont des molécules très réactives qui ont pour caractéristique d'être déficients en électron et qui sont donc susceptibles de réagir avec la cystéine catalytique des phosphatases CDC25.

En 2006, Kar *et al.* ont synthétisé un dérivé sulfone de la vitamine K3, le composé **H32** (Kar *et al.* 2006a). Ce composé **H32** (figure 27), en se liant probablement à la cystéine catalytique des CDC25, induit l'apoptose des cellules Hep3B et PLC/PRF5 (lignées cellulaires d'hépatome humain) par un mécanisme indépendant de la génération de ERO (CI_{50} = 2 et 2,5 μM , respectivement). De façon intéressante, ce composé agit sélectivement sur les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines.

Le composé **BN82002** (figure 27), une amine tertiaire, est un inhibiteur sélectif et irréversible des phosphatases CDC25 (CI_{50} = 2,4 μM , 3,9 μM et 5,4 μM vis-à-vis de CDC25A, B2 et C, respectivement) (Brezak *et al.* 2004). Celui-ci n'est pas un composé électrophile à proprement parler mais la richesse en électrons du noyau phénol fait que

l'amine benzylique peut être éliminée par protonation et conduit à la formation d'un composé électrophile de type accepteur de Michael. En plus de son activité inhibitrice *in vitro* (CI_{50} de l'ordre du μM), le composé **BN82002** affecte la prolifération de divers lignées de cellules cancéreuses et réduit la croissance de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris « nude » (xénogreffes de cellules MIA PaCa-2 par exemple). Ce composé, qui a été mis en évidence par l'équipe du professeur Ducommun, est actuellement commercialisé par Sigma-Aldrich à des fins de recherche uniquement.

Enfin, le potentiel inhibiteur d'une série de dérivés maléimides a été évalué car ce sont d'excellents candidats pour effectuer des réactions de thiolation. Parmi les inhibiteurs potentiels testés, le composé **PM-20** (figure 27) a été identifié comme un inhibiteur compétitif de CDC25A préférentiellement ($CI_{50} = 1, 10$ et $40 \mu\text{M}$ vis-à-vis des isoformes A, B et C, respectivement). Ce composé inhibe sélectivement la croissance des cellules tumorales Hep3B ($CI_{50} = 700 \text{ nM}$) par rapport à celle d'hépatocytes sains pour lesquels la CI_{50} est dix fois plus élevée. Les auteurs ont également confirmé cette activité antiproliférative *in vivo* (Kar *et al.* 2006b).

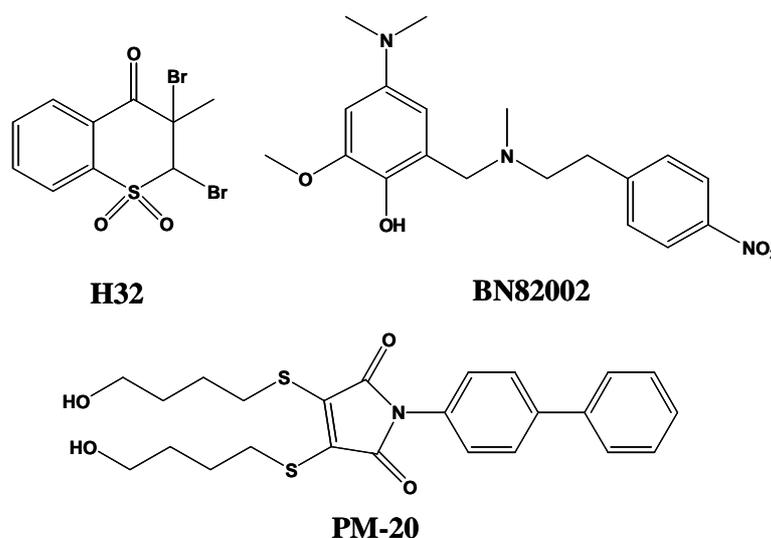


Figure 27 : Inhibiteurs électrophiles des phosphatases CDC25

5.2.2.3 Les autres composés

Depuis quelques années, le développement de différentes techniques de criblage d'inhibiteurs a permis l'identification de nouvelles classes de ligand de CDC25 jamais encore reportées à ce jour. Notamment, l'utilisation de technique de criblage *in silico* permet d'évaluer virtuellement la capacité d'un composé à inhiber une enzyme. Ainsi, il est possible

de sélectionner, dans des banques contenant des milliers d'inhibiteurs potentiels, les composés présentant le plus grand intérêt. Ensuite, l'activité inhibitrice des composés sélectionnés pourra être évaluée *in vitro* sur l'enzyme purifiée par des techniques de criblage haut débit (HTS).

Ainsi, l'activité inhibitrice de CDC25B d'un dérivé thiazolopyrimidine (**composé 1** dans la publication d'origine, présenté en **figure 28**) a été mise en évidence par Montes *et al.* ($CI_{50} = 13 \pm 0,5 \mu\text{M}$ pour CDC25B). L'activité antiproliférative de ce composé a été confirmée sur les cellules HeLa avec une $CI_{50} = 15,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$ (Montes *et al.* 2008). Suite à l'identification de cette structure inhibitrice inédite, 45 nouvelles thiazolopyrimidines ont été synthétisées et testées pour leur capacité à inhiber CDC25B *in vitro* (Kolb *et al.* 2009). Le composé le plus efficace de cette série (**composé 44** dans la publication d'origine, présenté en **figure 28**) est un inhibiteur mixte de CDC25B ($CI_{50} = 4,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Il exerce une activité antiproliférative sur la lignée cellulaire de cancer de la prostate LNCaP ($CI_{50} = 3,4 \pm 1,8 \mu\text{M}$) alors que la lignée MiaPaCa-2 est moins sensible ($CI_{50} > 80 \mu\text{M}$ pour ces cellules de cancer du pancréas).

En 2008, Feng *et al.* ont mis en évidence un nouvel inhibiteur de CDC25 (**LGH00045** présenté en **figure 28**) contenant un motif thiadiazole suite à l'évaluation du potentiel de 48000 composés par HTS (Feng *et al.* 2008). Ce composé inhibe sélectivement les phosphatases CDC25A et B *in vitro* selon un mécanisme d'inhibition mixte et réversible ($CI_{50} = 0,53 \pm 0,02 \mu\text{M}$ et $0,82 \pm 0,08 \mu\text{M}$ pour CDC25A et B, respectivement). L'activité antiproliférative du composé **LGH00045** vis-à-vis des cellules HeLa ($CI_{50} = 27 \pm 1 \mu\text{M}$) a été associée à l'inhibition de l'activité CDC25 dans ces cellules et à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. **LGH00045** exerce également une activité cytotoxique sur les lignées cancéreuses MDA-MB-435 ($CI_{50} = 29 \pm 1 \mu\text{M}$) et HCT-116 ($CI_{50} = 39 \pm 2 \mu\text{M}$) après 72 h de traitement.

A travers deux études récentes, Park *et al.* ont mis en évidence de nouveaux motifs d'intérêt pour le développement d'inhibiteurs de CDC25 : 5-méthylène-2-phénylamino-thiazol-4-one et 1-phényl-2-(4H-[1,2,4]thiazole-3-ylsulfanyl)-éthanone (**figure 28**). Les cinq plus puissants inhibiteurs isolés exercent leur activité vis-à-vis de CDC25A avec une $CI_{50} < 100 \mu\text{M}$ (Park *et al.* 2008). Sur la base des résultats de cette première étude, le design de nouveaux dérivés a été effectué par l'utilisation de techniques de modélisation moléculaire. A partir des 10 000 dérivés générés, une centaine d'analogues de chaque motif d'intérêt a été testé *in vitro* en présence des sites catalytiques de CDC25A et B. L'étude des interactions enzyme-inhibiteur a permis de mettre en évidence que l'activité inhibitrice des composés était

clairement liée à la formation de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes avec des résidus du site actif de l'enzyme (Park *et al.* 2009 [a]).

En 2009, ce même groupe a identifié deux puissants inhibiteurs non quinoniques de CDC25 qui contiennent le motif 1-benzyl-1H-pyrrolo[2,3-b]quinoxalin-2-ylamine (**composé 1 et 2 en figure 28**). Ces composés sont apparus 10 fois plus puissants vis-à-vis de l'isoforme B par rapport à A (CI_{50} de l'ordre de 0,2 μ M pour CDC25B) et inactifs vis-à-vis d'autres phosphatases comme PTP1B, YPTP1, YOP ($CI_{50} > 100 \mu$ M). L'étude des interactions enzyme-inhibiteur *in silico* a montré que la formation de liaisons hydrogènes, entre les deux atomes d'oxygène du groupement sulfonamide et des résidus du site catalytique de l'enzyme, intervenait dans le positionnement de l'inhibiteur au niveau du site actif. D'autres liaisons hydrogènes sont également formées *via* le noyau pyrazine avec des résidus arginine positionnés à l'entrée du site actif (Arg436 pour CDC25A et Arg479 pour CDC25B). Enfin, des interactions hydrophobes, entre les noyaux aromatiques phényle ou benzyle et des résidus tyrosine et méthionine de l'enzyme, permettent de stabiliser le complexe enzyme-inhibiteur (Park *et al.* 2009 [b]).

Enfin, en 2009, un screening de 69 239 composés a permis d'isoler un nouvel inhibiteur de CDC25B qui n'agit pas par oxydation de l'enzyme ($CI_{50} = 14 \pm 1 \mu$ M). Le composé **26683752** présente une structure originale du fait de la présence de motifs triazine et furane (Johnston *et al.* 2009). Ce dernier inhibe la croissance des cellules cancéreuses MBA-MD-435 ($CI_{50} = 20 \pm 2 \mu$ M) et PC-3 ($CI_{50} = 25 \pm 2 \mu$ M).

Malgré l'activité encore modeste de certains composés isolés, les résultats de ces études ont permis l'identification de nouveaux motifs prometteurs qui pourront servir de point de départ pour la synthèse de nouveaux inhibiteurs de CDC25.

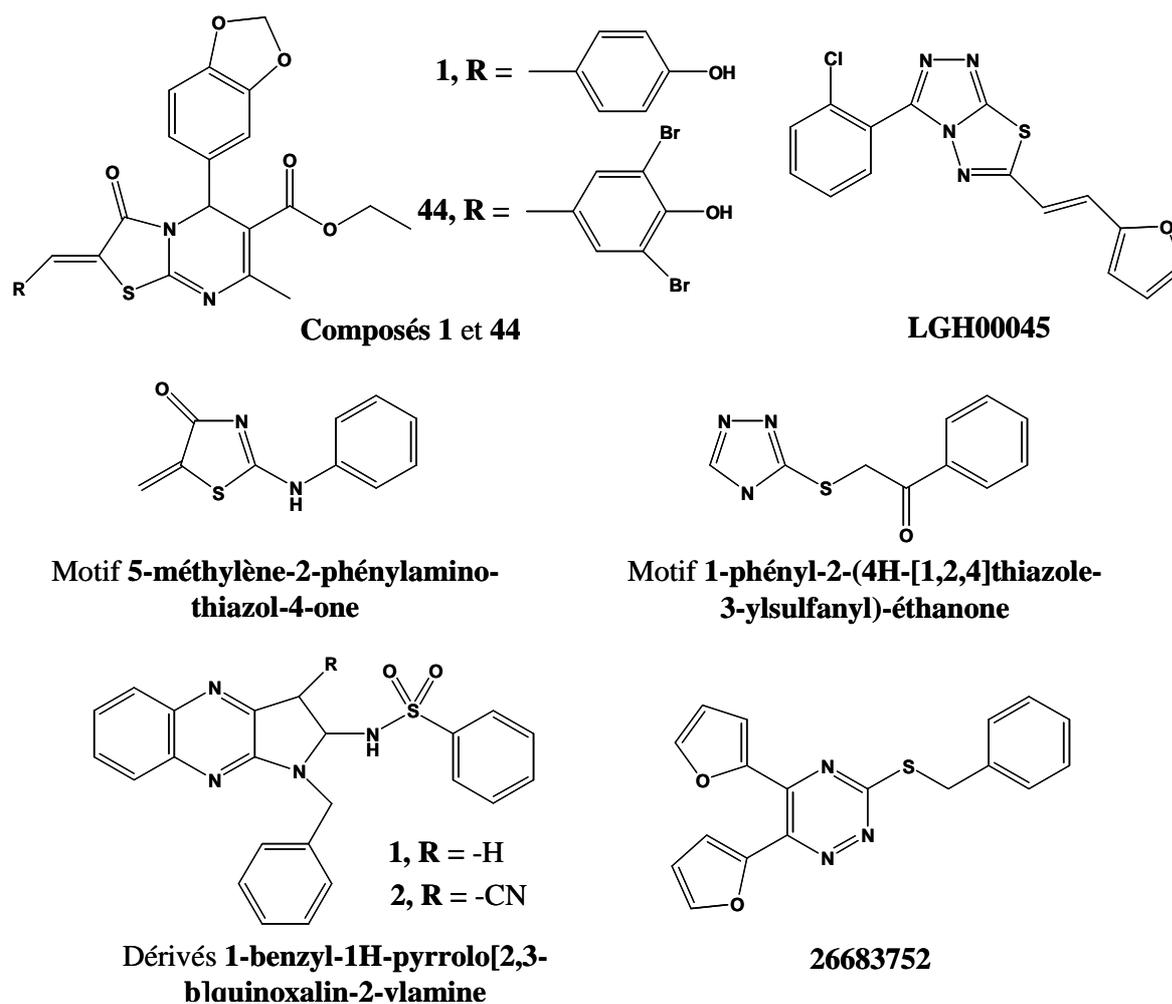


Figure 28 : Inhibiteurs non quinoniques inédits issus d'études *in silico* et de criblage haut débit.

Comme nous venons de le décrire, l'identification de nouveaux et puissants inhibiteurs des phosphatases CDC25 s'est clairement accélérée ces dix dernières années (le **Tableau 1** présente les inhibiteurs de CDC25 les plus puissants identifiés à ce jour). Les résultats prometteurs obtenus *in vivo*, pour certains d'entre eux, n'ont fait que confirmer l'intérêt de cibler ces enzymes dans le cadre du développement de nouvelles stratégies anticancéreuses.

Tableau 1 : Récapitulatif des inhibiteurs des phosphatases CDC25 les plus puissants identifiés.

Inhibiteur	CI ₅₀ (µM)			Inhibition de la prolifération cellulaire <i>in vitro</i> (type cellulaire)	Inhibition de la croissance tumorale chez la souris (type cellulaire)	Références
	CDC25A	CDC25B	CDC25C			
NSC95397	0,022	0,125	0,057	10,3 (MCF-7) ; 6 et 7 (Hep3B et HepG2) ; 6 (PLC/PRL/5)	ND	Lazo <i>et al.</i> 2002 Peyregne <i>et al.</i> 2005
IRC-083864	0,023	0,026	0,023	0,007 (MiaPaCa-2) ; 0,014 (DU-145) ; 0,023 (LNCaP) ; 0,011 (A2058) ; 0,025 (MCF-7) ; 0,065 (HCT-116) ; 0,075 (U2OS)	MiaPaCa-2 LNCaP	Brezak <i>et al.</i> 2009
Adociaquinone B	ND	0,07	ND	ND	ND	Cao <i>et al.</i> 2005
BN82685	0,25	0,16-0,25	0,17	0,350 (HeLa) ; 0,118 (MiaPaCa-2) ; 0,09 (DU-145) ; 0,245 (MCF-7) ; 0,380 (MDA-MB-231) ; 0,265 (BT20) ; 0,565 (T47D) ; 0,250 (U2OS)	MiaPaCa-2	Brezak <i>et al.</i> 2005
KR61170	1,5	0,17	ND	ND	ND	Cheon <i>et al.</i> 2004
NSC663284	ND ^a 0,5 ^b	0,21 ^a 0,91 ^b	ND ^a 0,47 ^b	0,2 (MDA-MB-435) ^a ; 2,3 (HCT-116) ^c ; 2,7 (HT-29) ^c	HT-29 ^d	^a Lazo <i>et al.</i> 2001 ^b Brisson <i>et al.</i> 2005 ^c Han <i>et al.</i> 2004 ^d Guo <i>et al.</i> 2007
JUN-1111	0,38	1,8	0,66	0,1 (MDA-MB-435) ; 0,3 (PC-3)	ND	Brisson <i>et al.</i> 2005
Composé 5b (dérivé de Dysidiolide)	0,44	1,9	ND	ND	ND	Shimazawa <i>et al.</i> 2004
Composé 4	0,73	0,48	ND	3,14 (A549)		
Composé 8 (dérivés de cryptotanshinone)	1,1	0,89	ND	2,8 (A549)	ND	Huang <i>et al.</i> 2009
LGH00045	0,53	0,82	ND	29,24 (MDA-MB-435) ; 26,61 (HeLa) ; 39,81 (HCT-116) ; 78,34 (NIH3T3)	ND	Feng <i>et al.</i> 2008
LGH00031	1,25	0,97	ND	0,328 (A549) ; 0,290 (HeLa) ; 0,143 (HCT-116)	ND	Zhou <i>et al.</i> 2009
BN82002	2,4	3,9-6,3	5,4	7,2 (MiaPaCa-2) ; 13,5 (DU-145) ; 22,4 (LNCaP) ; 32,6 (HT-29) ; 11,2 (U2OS) ; 23 (HeLa)	MiaPaCa-2	Brezak <i>et al.</i> 2004

ND : Non déterminé

OBJECTIFS ET STRATÉGIES

1 Objectifs

Dans le cadre de la recherche de nouvelles cibles en thérapeutique anticancéreuse, les phosphatases CDC25, de par leurs fonctions, sont apparues comme des candidates intéressantes. En effet, ces protéines sont des enzymes clés qui interviennent dans la progression du cycle cellulaire en régulant l'activité des kinases dépendantes des cyclines (Cdk) par déphosphorylation. De plus, une surexpression de ces phosphatases, notamment dans le cancer du sein, a pu être corrélée au développement de résistance à certains agents anticancéreux ainsi qu'à un mauvais pronostic. Ainsi, leur inhibition pourrait permettre de freiner la croissance tumorale et éventuellement de contrecarrer la résistance aux traitements.

Les principaux objectifs de ce travail sont les suivants :

- Valider le système des phosphatases CDC25 en tant que cible intéressante dans le traitement du cancer du sein
- Mettre en évidence une structure inhibitrice inédite des phosphatases CDC25, en collaboration avec différentes équipes de chimistes, puis en étudier le mécanisme d'action dans la cellule

2 Stratégies

Cette étude sera réalisée sur des lignées d'adénocarcinomes mammaires humains sensibles (MCF-7, MDA-MB-231) et sur des dérivés de MCF-7 présentant une résistance multiple à la doxorubicine, à la vincristine et à l'étoposide (Vcr-R).

2.1 Recherche d'inhibiteurs chimiques de CDC25

Nous avons développé au laboratoire les techniques permettant d'exprimer et de purifier les 3 isoformes de CDC25 humaines, qui nous serviront d'outils pour tester différents inhibiteurs potentiels. Ces composés inédits seront développés par l'unité de Chimie du laboratoire ou fournis par d'autres équipes travaillant en collaboration avec notre laboratoire. Leur activité (efficacité et spécificité) sera tout d'abord évaluée *in vitro* sur les 3 isoformes de CDC25 purifiées.

2.2 Effets cellulaires d'inhibiteurs chimiques de CDC25

L'efficacité des molécules présentant le meilleur potentiel inhibiteur *in vitro* sera alors évaluée sur différents modèles de cellules en culture dérivées d'adénocarcinome mammaire humain (cellules sensibles et cellules rendues résistantes à différentes drogues anticancéreuses). Les mécanismes d'action cellulaire mis en jeu seront étudiés le plus précisément possible : activité sur la prolifération cellulaire, blocage du cycle cellulaire, induction de l'apoptose et expression des acteurs de l'apoptose, stress oxydant...

2.3 Validation de la cible pharmacologique

La validation de la cible pharmacologique se fera par comparaison avec une approche post-transcriptionnelle d'inactivation de l'activité des phosphatases CDC25 grâce l'utilisation de petits oligonucléotides interférents (siRNA) spécifiques des isoformes ciblées par les inhibiteurs chimiques. L'impact de cette inhibition spécifique sur les cellules MFC-7 sera évalué sur la base des mêmes tests cellulaires que pour l'inhibition chimique. L'inhibition de l'activité CDC25 par siRNA permettra notamment de mieux définir la ou les cibles intracellulaires des inhibiteurs chimiques testées et d'évaluer leur efficacité relative par comparaison.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce projet de thèse vise à évaluer le système des phosphatases CDC25 en tant que cible d'intérêt dans le traitement du cancer du sein. Ces protéines, jouant un rôle clé dans la prolifération cellulaire, sont apparues comme des cibles de choix dans le cadre du développement de nouvelles molécules utilisables en chimiothérapie. Nous avons donc entrepris d'identifier de nouveaux inhibiteurs chimiques des phosphatases CDC25. Nous avons également étudié l'impact cellulaire de l'inhibition de ces phosphatases dans différentes lignées d'adénocarcinome mammaire humain.

1 Criblage *in vitro* d'inhibiteurs des phosphatases CDC25

1.1 Production des enzymes purifiées

Un prérequis indispensable à la recherche de nouveaux inhibiteurs des phosphatases CDC25 est la production d'enzymes purifiées. Les techniques adaptées permettant de disposer de ces outils indispensables à nos études *in vitro* ont été développées au laboratoire (Brault et Bagrel 2008). Les protéines CDC25 utilisées pour la recherche d'inhibiteur sont des protéines recombinantes dans lesquelles l'activité CDC25 est couplée à une partie de la glutathion *S*-transférase (GST). Les isoformes A et C sont produites sous leur forme complète alors que nous ne disposons que du site catalytique de CDC25B. Leurs productions s'effectuent en différentes étapes :

- Transformation de *Escherichia coli* par un vecteur plasmidique pGEX contenant les ADN GST et CDC25A, B ou C selon l'isoforme désirée
- Sélection des bactéries contenant le plasmide d'intérêt grâce à la présence d'un gène de résistance à l'ampicilline
- Induction de l'expression des protéines recombinantes par un système IPTG
- Extraction puis purification par chromatographie d'affinité des protéines de fusion GST-CDC25 via une interaction GSH-GST

La qualité de la purification peut être vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie (**figure 29**). Les fractions présentant une bande de forte intensité à la taille attendue (exemple : environ 90 KDa pour GST-CDC25A) seront sélectionnées en vue d'évaluer leur activité phosphatase.

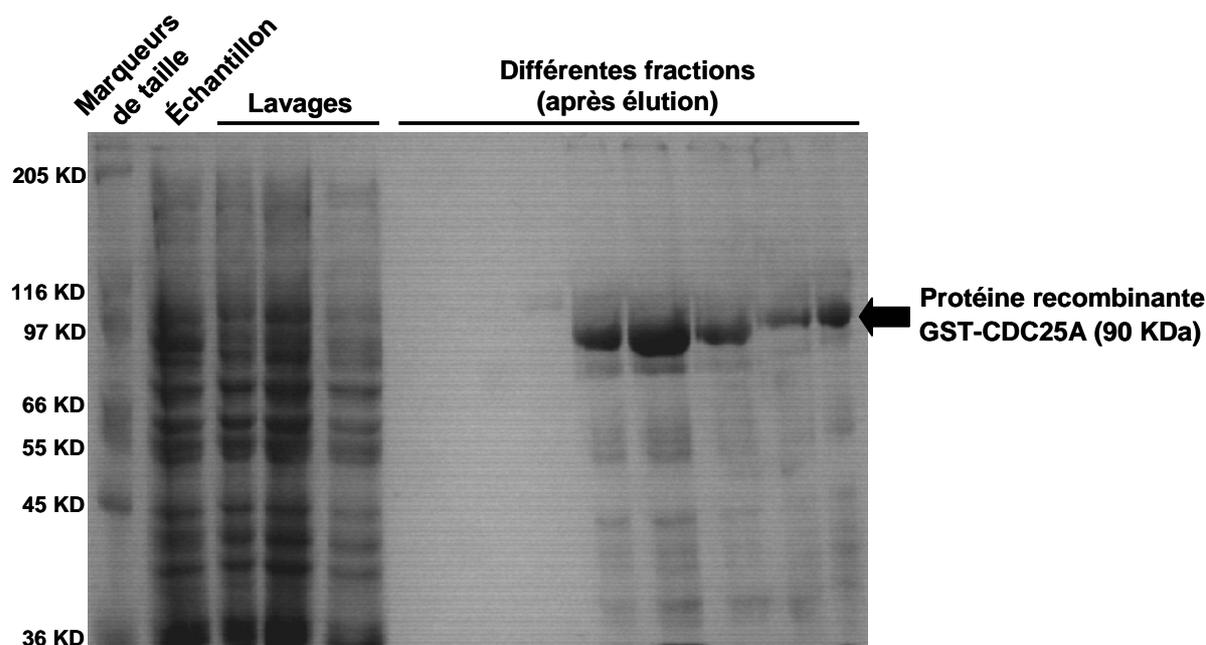


Figure 29 : Purification de la protéine recombinante GST-CDC25A. Observation en gel de polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie des protéines purifiées dans quelques fractions après purification et élution.

1.2 Optimisation de la mesure d'activité phosphatase en fluorimétrie

L'activité phosphatase des protéines de fusion purifiées est évaluée grâce à une technique fluorimétrique basée sur la déphosphorylation d'un substrat synthétique, le 3-OMF-P (3-O-méthylfluorescéine phosphate). L'utilisation de cette nouvelle technique, qui remplace la mesure d'activité phosphatase en colorimétrie, a nécessité la réalisation d'optimisations préalables. Dans un premier temps deux tampons de réaction ont été testés :

- Tampon 1 (d'après Turowski *et al.* 2003) : Tris-HCl (pH 8,2) 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, SAB 0,1 % (m/v)

- Tampon 2 (d'après Brezak *et al.* 2004) : Tris-HCl (pH 8,2) 50 mM, NaCl 50 mM, glycérol 20 %

Cependant, contrairement à ce qui a été décrit dans les publications d'origine, nous n'avons pas ajouté d'agent réducteur (DTT 1 mM) aux tampons de réaction testés. Comme la fluorimétrie est une technique nettement plus sensible que la colorimétrie, la mesure d'activité phosphatase pourra être réalisée en absence d'agent réducteur. En effet, l'ajout d'agent réducteur pourrait interférer lors de nos essais d'inhibition en réactivant l'enzyme ou même en interagissant directement avec les composés testés.

Différentes concentrations de la protéine recombinante CDC25A ont été utilisées lors de ces essais. La mesure est déclenchée par ajout de 500 μM de substrat ($=10\times K_M$) et est réalisée en cinétique sur 4 h à 30°C (**figure 30**).

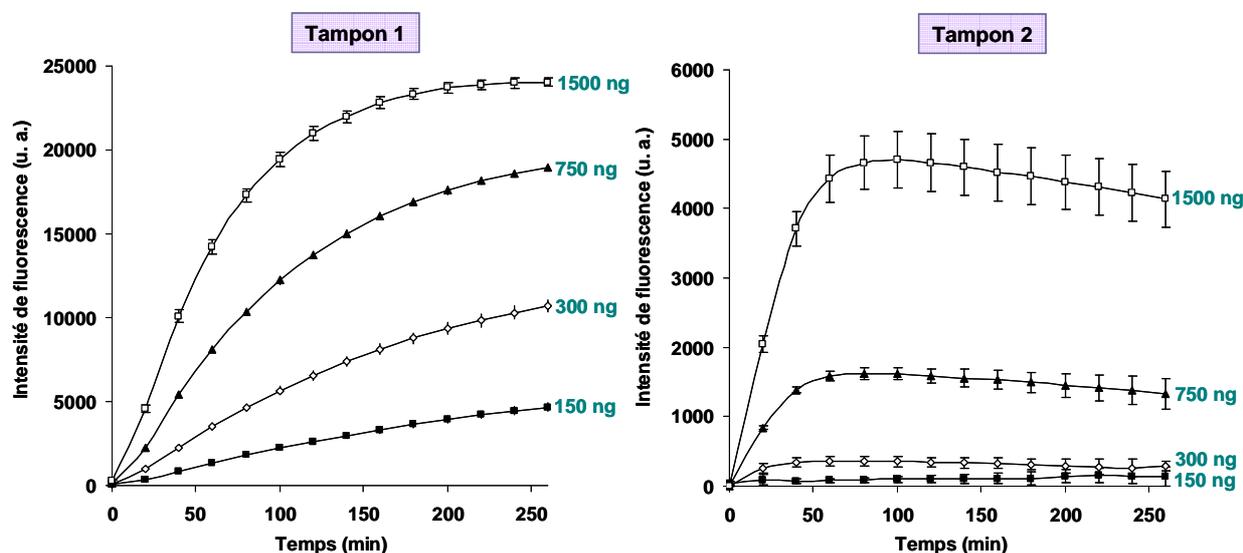


Figure 30 : Optimisation de la mesure de l'activité phosphatase *in vitro* : choix du tampon de réaction. L'activité phosphatase de CDC25A est suivie pendant 260 min en présence des deux tampons de réaction testés.

u.a. : unité arbitraire de fluorescence

La **figure 30** indique que l'utilisation du tampon de réaction 1 permet d'obtenir une efficacité catalytique nettement supérieure à celle obtenue en présence du tampon 2. Ainsi, dans le cadre de la recherche de nouveaux inhibiteurs de CDC25, notre choix se portera sur le tampon de réaction 1 [Tris-HCl (pH 8,2) 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, SAB 0,1 % (m/v)] et nous réduirons la durée de la cinétique enzymatique à 2 h de manière à rester en condition de vitesse initiale (uniquement si $\text{CDC25A} \leq 300 \text{ ng}$).

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé les quantités d'enzyme à utiliser pour obtenir une efficacité catalytique maximale. Pour cela, nous cherchons à être en condition de vitesse initiale lors de nos essais car la vitesse de réaction est alors maximale et constante au cours du temps. Afin de déterminer nos conditions opératoires, l'activité phosphatase a été suivie sur 120 minutes en présence de différentes concentrations de CDC25A, B et C (**figure 31**).

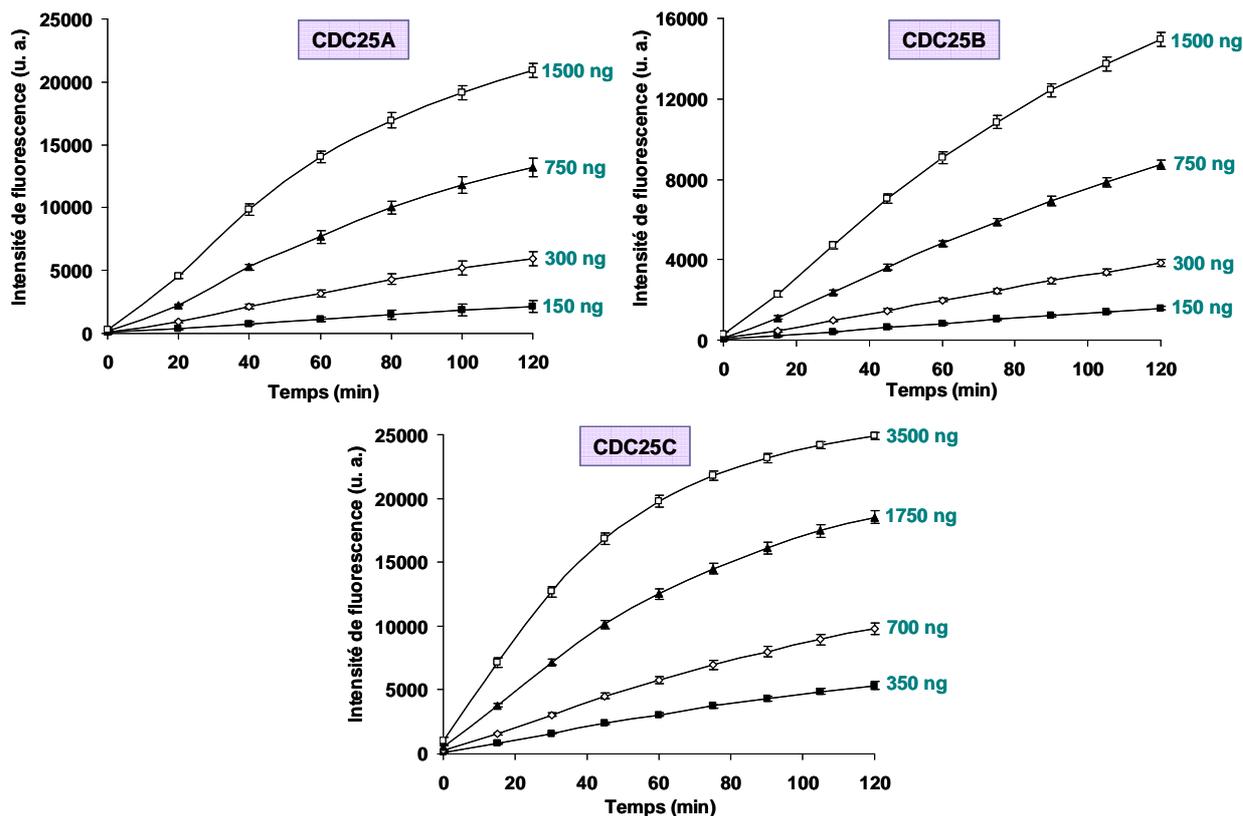


Figure 31 : Evolution de l’activité phosphatase en fonction de la quantité d’enzyme.
u.a. : unité arbitraire de fluorescence

Les vitesses de réaction ont été calculées uniquement lorsque les activités enzymatiques sont constantes sur 120 min :

Vitesse de réaction (u.a. / min)		
CDC25A	150 ng	18 ± 0,2
	300 ng	49 ± 6
CDC25B	150 ng	12 ± 0,6
	300 ng	31 ± 1
	750 ng	73 ± 1
CDC25C	350 ng	44 ± 3
	700 ng	81 ± 4

Le choix arbitraire d’une vitesse de réaction de 50 u.a./min a été effectué pour les trois isoformes de CDC25. Ces conditions nous permettent d’être en condition de vitesse initiale sur 120 min et d’obtenir une activité enzymatique suffisante pour tester des inhibiteurs potentiels. Ainsi, les quantités de phosphatases CDC25 à utiliser lors de nos essais d’inhibition ont été déterminées et sont de l’ordre de 315 ng de CDC25A, 500 ng de CDC25B et 414 ng de CDC25C.

Une fois les conditions opératoires déterminées, nous avons validé le protocole de mesure de l'activité phosphatase *in vitro* en utilisant un inhibiteur connu des CDC25 qui a été identifié et caractérisé par l'équipe de Ducommun, le composé **BN82002** (Brezak *et al.* 2004). Dans ce travail, la forme commerciale a été utilisée (Sigma-Aldrich). Les valeurs de CI_{50} obtenues pour ce composé vis-à-vis des trois isoformes de CDC25 sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	CI_{50} (μM)
CDC25A	$2,8 \pm 0,1$
CDC25B	$1,8 \pm 0,2$
CDC25C	$1,9 \pm 0,1$

Il est à noter que les valeurs de CI_{50} obtenues lors de nos essais diffèrent sensiblement de celles présentées dans la publication d'origine (Brezak *et al.* 2004). Ceci peut notamment s'expliquer par l'utilisation de protéines de fusion différentes (GST-CDC25 vs MBP-CDC25) et de conditions opératoires différentes. Cet inhibiteur spécifique des phosphatases CDC25A été utilisé comme substance de référence lors de nos essais d'inhibition.

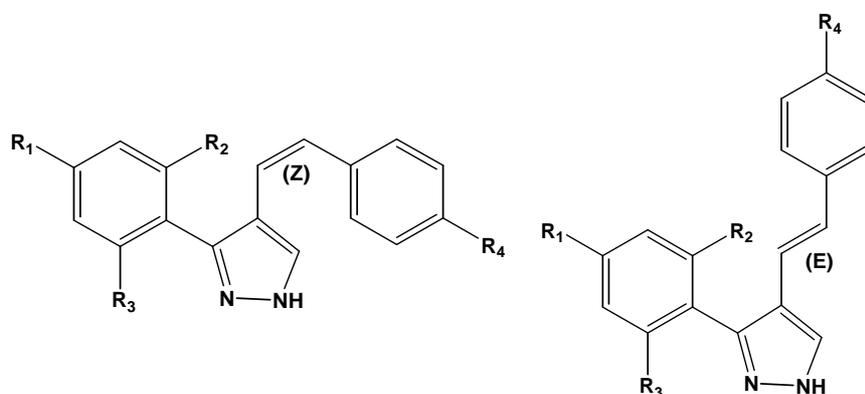
1.3 Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25

L'un des objectifs du travail est d'évaluer le potentiel inhibiteur de composés nouveaux vis-à-vis des phosphatases CDC25. Malgré de nombreuses études, il n'a pas pu être identifié de structure chimique particulière capable d'inhiber l'activité des phosphatases CDC25. En effet, des composés de structure très diverses ont été rapportés comme inhibiteurs de CDC25 (cf. **Introduction** section « **5. Les inhibiteurs des phosphatases CDC25** »). Le seul élément qui semble être un aspect commun à ces molécules est leur petite taille.

Nous avons entamé un criblage sur diverses molécules qui ont été mises à notre disposition, soit par l'équipe de chimie de notre laboratoire, soit dans le cadre de collaboration avec d'autres laboratoires. Dans le but d'identifier de nouvelles molécules d'intérêt, les études d'inhibition ont été effectuées, dans un premier temps, sur l'isoforme A des CDC25 et en présence d'une seule dose de composé à tester. Dans un second temps, pour les composés présentant une activité inhibitrice intéressante, un test d'inhibition plus précis a été effectué en réalisant des études dose-réponse afin de déterminer la concentration inhibitrice 50 % (CI_{50}). Ces essais ont été également élargis aux isoformes B et C de la protéine.

1.3.1 Dérivés de pyrazole

Nous nous sommes intéressés au potentiel inhibiteur de dérivés de pyrazole, synthétisés à partir de coumarines, qui nous ont été fournis par l'équipe de chimie organique de J. A. S. Cavaleiro (Université d'Aveiro, Portugal) (Silva *et al.* 2007 et 2009). Ces composés, qui appartiennent à la famille des alcaloïdes, sont potentiellement intéressants car certains dérivés de pyrazole ont déjà montré une activité antitumorale *in vitro* sur des lignées cellulaires de cancer du colon (HT-29, HCT-15, SW-620), du poumon (HOP-62), du foie (Hep-2), de la prostate (PC-3, DU-145), de l'ovaire (OVCAR-5)...(Bhat *et al.* 2005). Les composés testés présentent tous une structure commune qui peut être de configuration cis (Z) ou trans (E).



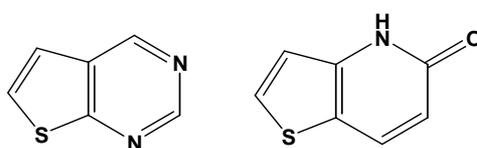
Structure générale des dérivés de pyrazole testés de configuration cis (Z) et trans (E)

Comme l'indique l'**annexe 1**, la plupart des composés de cette série exercent une inhibition d'environ 50 % de l'activité CDC25A à une dose de 100 μ M. De plus, il semble que le choix de la configuration (Z ou E) n'influence pas le potentiel inhibiteur des composés. Par exemple, les composés **S15** et **S16**, qui diffèrent uniquement par leur configuration, exercent une activité inhibitrice de CDC25A comparables (activité CDC25A résiduelle de 44 ± 21 % et 46 ± 14 % par rapport au contrôle, respectivement). Toutefois, nous pouvons noter que la présence d'un halogène (chlore ou fluor), au niveau du substituant $-R_4$, permet d'augmenter considérablement l'activité inhibitrice des composés. En effet, les atomes de chlore ou de fluor, présents dans les composés **S5**, **S6**, **S7** et **S17**, sont connus pour être extrêmement réactifs. Ainsi, en présence de 100 μ M de ces composés, l'activité résiduelle de CDC25A est quasi nulle (activité CDC25A résiduelle de 0 %, 19 ± 9 %, 0 % et 14 ± 4 % par rapport au contrôle pour **S5**, **S6**, **S7** et **S17**, respectivement). Cependant, un essai d'inhibition en présence des trois composés chlorés (**S5**, **S6** et **S7**) a montré que leur potentiel inhibiteur de CDC25A est fortement réduit à une dose de 10 μ M (activité CDC25A résiduelle = 88 %, 76

% et 83 % de l'activité du contrôle, respectivement). L'étude de ces composés n'a pas été poursuivie mais ces résultats confirment l'intérêt d'incorporer des éléments réactifs (comme Cl, F...) au sein de molécules potentiellement inhibitrices.

1.3.2 Dérivés de thiénoypyrimidine et de thiénoypyridine

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel inhibiteur de dérivés de thiénoypyrimidine et de thiénoypyridine. Ces composés inédits ont été synthétisés au laboratoire par deux chimistes organiciens, D. Thomae et A. Begouin, respectivement (Thomae *et al.* 2007, Begouin *et al.* 2005, 2006 et 2007).



Structures générales des dérivés de thiénoypyrimidine et de thiénoypyridine testés

Malgré les différentes substitutions réalisées, aucun des dérivés de thiénoypyridine testés n'a présenté d'effet inhibiteur vis-à-vis de CDC25A à 100 μ M (**annexe 2**). Ces résultats suggèrent que le motif thiénoypyridinone ne présente que peu d'intérêt pour l'inhibition des phosphatases CDC25. Leur étude n'a donc pas été poursuivie.

Concernant les dérivés thiénoypyrimidiniques, les résultats du criblage préliminaire (**annexe 2**), réalisé en présence de 100 μ M de chaque composé, indiquent que les composés **7**, **8** et **11** inhibent l'activité CDC25A à cette dose (activité CDC25A résiduelle de 13 ± 3 , 2 ± 3 et 0 %, respectivement). Aussi, un second criblage a-t-il été réalisé en présence de 50 μ M des dérivés les plus intéressants. Les résultats obtenus révèlent l'intérêt du composé **8** qui réduit l'activité enzymatique de CDC25A de 83 % dans ces conditions (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par les composés **7**, **8** et **11** (50 μ M)

	Composé		
	7	8	11
Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)	64 ± 6	17 ± 12	39 ± 10

Afin de caractériser plus précisément le pouvoir inhibiteur du composé **8** vis-à-vis de l'activité CDC25A, une courbe effet-dose a été réalisée (**figure 32**).

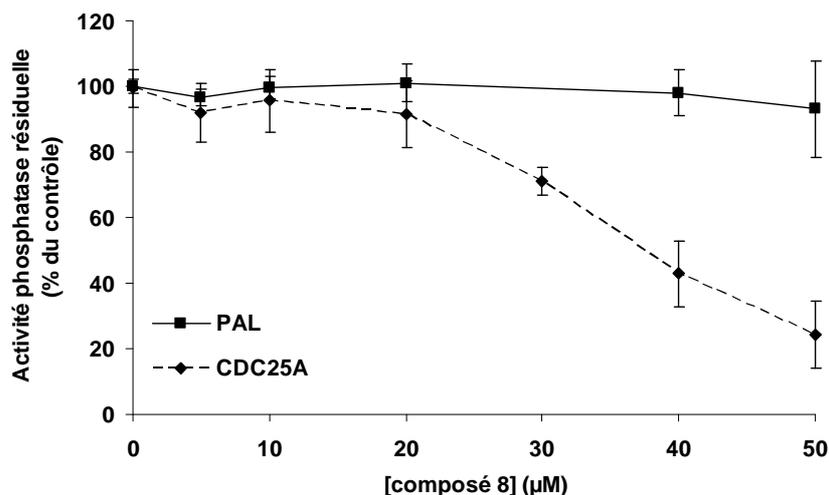
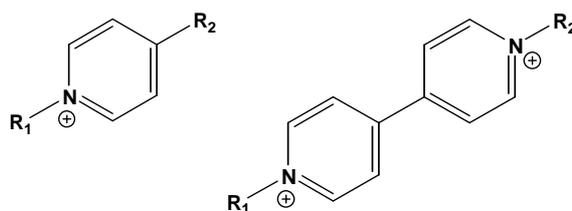


Figure 32 : Evaluation *in vitro* de l'inhibition de la phosphatase alcaline (PAL) et de CDC25A par le composé **8**.

Cette courbe effet-dose laisse apparaître que l'effet inhibiteur du composé **8** diminue rapidement pour des doses inférieures à 50µM (CI₅₀ de l'ordre de 40 µM). A ces concentrations, l'activité de la phosphatase alcaline n'est pas altérée. Cependant, l'efficacité du composé **8** reste relativement faible par rapport à celle de certains inhibiteurs synthétiques de CDC25 reportés dans la littérature (cf. **Introduction** section « **5. Inhibiteurs des phosphatases CDC25** »). De ce fait, les investigations relatives au composé **8** n'ont pas été poursuivies.

1.3.3 Sels de pyridinium

Des sels de pyridinium ont ensuite été testés comme inhibiteurs potentiels des phosphatases CDC25 *in vitro*. La présence du noyau pyridine contenant un atome d'azote chargé positivement confère à ces composés une importante réactivité (possibilité de substitution nucléophile).



Structures générales des sels de pyridinium testés

Comme l'indique le tableau en **annexe 3**, le criblage initial, réalisé en présence de 50 μM de chaque composé, a permis d'identifier des molécules potentiellement intéressantes (composés **1**, **2**, **3** et **13**). Afin de caractériser plus précisément le pouvoir inhibiteur des composés **1**, **2**, **3** et **13** vis-à-vis de l'activité CDC25A, des courbes effet-dose ont été réalisées (**figure 33**).

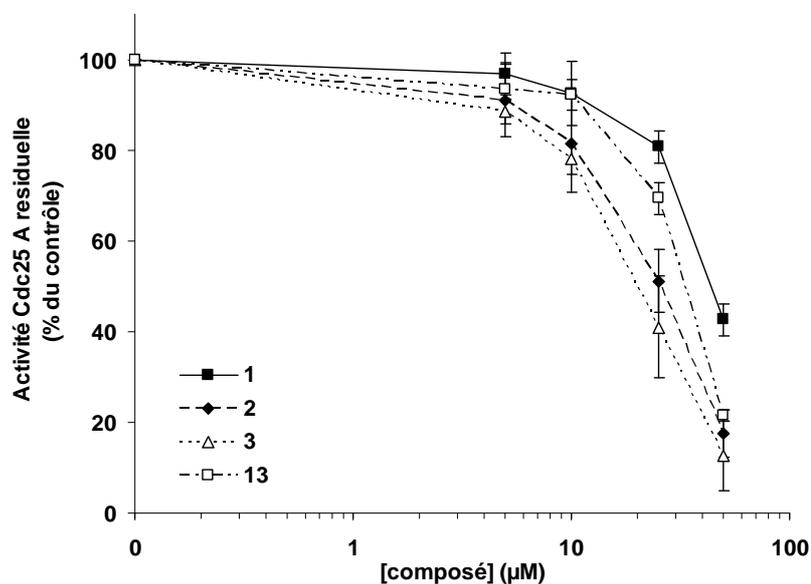
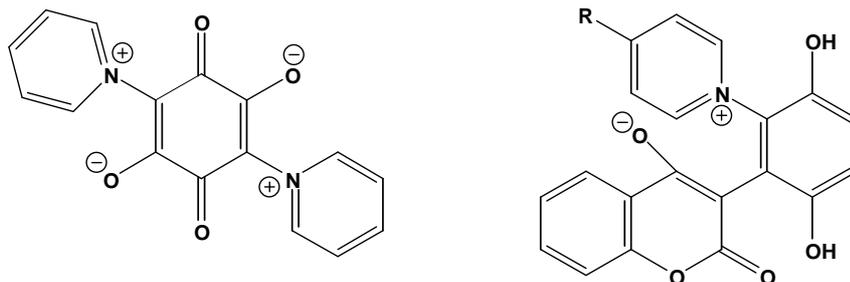


Figure 33 : Evaluation *in vitro* de l'inhibition de la phosphatase CDC25A par les composés **1**, **2**, **3** et **13**.

Ces courbes laissent apparaître que l'effet inhibiteur de ces molécules diminue rapidement pour des doses inférieures à 100 μM ($\text{CI}_{50} \geq 25 \mu\text{M}$). Ces composés sont donc peu intéressants compte tenu des valeurs de CI_{50} obtenues pour des inhibiteurs déjà connus. Leur analyse n'a donc pas été poursuivie.

1.3.4 Composés mésoioniques dérivés de pyridine

Une autre série de composés dérivés de la pyridine a été testée. La particularité de ces derniers est d'être des composés mésoioniques c'est-à-dire qu'ils présentent des charges positives et négatives intramoléculaires délocalisées.



Structures générales des composés mésoioniques dérivés de pyridine testés

Cependant, les produits testés ici n'ont présenté aucun effet inhibiteur vis-à-vis des phosphatases CDC25 (**annexe 4**).

1.3.5 Dérivé de thienopyrrolizinone

Un dérivé de thienopyrrolizinone nous a été fourni par S. Rault (Université de Caen, France). Ce composé, nommé **1o** dans la publication d'origine (Lisowski *et al.* 2004), a déjà montré une activité anticancéreuse sur différentes lignées de cellules à des doses de l'ordre du nanomolaire. Cette activité a été associée à un blocage du cycle cellulaire en G2/M, qui pourrait donc impliquer une inhibition des phosphatases CDC25. Par conséquent, nous avons évalué l'activité inhibitrice de cette molécule vis-a-vis de CDC25A *in vitro*.

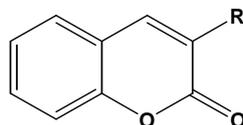
Tableau 3 : Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par le composé **1o** (100 μ M).

Composé	Structure	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
1o		103 \pm 8

Comme l'indique le **tableau 3** ci-dessus, le composé **1o** n'exerce aucune activité inhibitrice sur CDC25A et son étude n'a donc pas été poursuivie.

1.3.6 Dérivés de benzopyrone

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel inhibiteur de dérivés de benzopyrone. Ces composés possèdent une structure assez proche de celle des quinones, qui se sont révélées être de puissants inhibiteurs des phosphatases CDC25. Les dérivés appartenant à cette série possèdent une structure de type coumarine substituée en position 3.



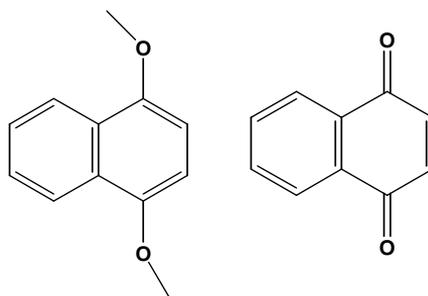
Structure générale des dérivés de benzopyrone testés

Dans cette série, aucun des composés testés n'a révélé d'intérêt puisqu'ils sont apparus très peu actifs vis-à-vis de CDC25A. En effet, les activités inhibitrices obtenues sont de l'ordre de 10 % à une dose de 50 μ M (**annexe 5**).

Cependant, l'intérêt pour ces composés a été confirmé récemment suite à la mise en évidence du potentiel inhibiteur de dérivés présentant une structure voisine des coumarines, les flavones, vis-à-vis de Cdc-25.1 chez *Caenorhabditis elegans* (Kim *et al.* 2009). Ainsi, une seconde série de dérivés coumariniques a été synthétisée par l'équipe de chimie organique du laboratoire. Les essais d'inhibition des phosphatases CDC25 *in vitro* ont montré que les coumarines substituées en position 4, de type chalcone-coumarine, présentaient le potentiel inhibiteur le plus prometteur ($CI_{50} = 27 \mu$ M et 28μ M vis-à-vis de CDC25A pour les deux inhibiteurs les plus puissants identifiés, **6a** et **6d** dans la publication d'origine) (Valente *et al.* 2010). Cette étude a donc permis de mettre en évidence un nouveau motif d'intérêt dans le cadre de la recherche de structures inhibitrices inédites des phosphatases CDC25.

1.3.7 Dérivés de quinone

Nous nous sommes ensuite intéressés au potentiel inhibiteur de dérivés quinoniques. Des précurseurs de quinone et des quinones nous ont été fournis par E. Davioud-Charvet (Université de Heidelberg, Allemagne). Comme décrit dans la littérature, de nombreux inhibiteurs des phosphatases CDC25 identifiés à ce jour appartiennent à la famille des quinones.



Structures générales des dérivés de quinone testés

Ces molécules ont été testées pour leur potentiel inhibiteur de CDC25A *in vitro* (**annexe 6**). Aucun des précurseurs de quinone n'a montré d'activité inhibitrice. Cependant, nous avons pu isoler, parmi les quinones testées, deux inhibiteurs intéressants (nommés **HB26** et **JD159**) capables de réduire l'activité enzymatique de CDC25A de 88 et 83 %, respectivement (**annexe 6**). Ainsi, dans la mesure où ces deux composés ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis de CDC25A, leur potentiel a été évalué sur les deux autres isoformes de CDC25 purifiées et des courbes effet-dose ont été réalisées (**figure 34**)

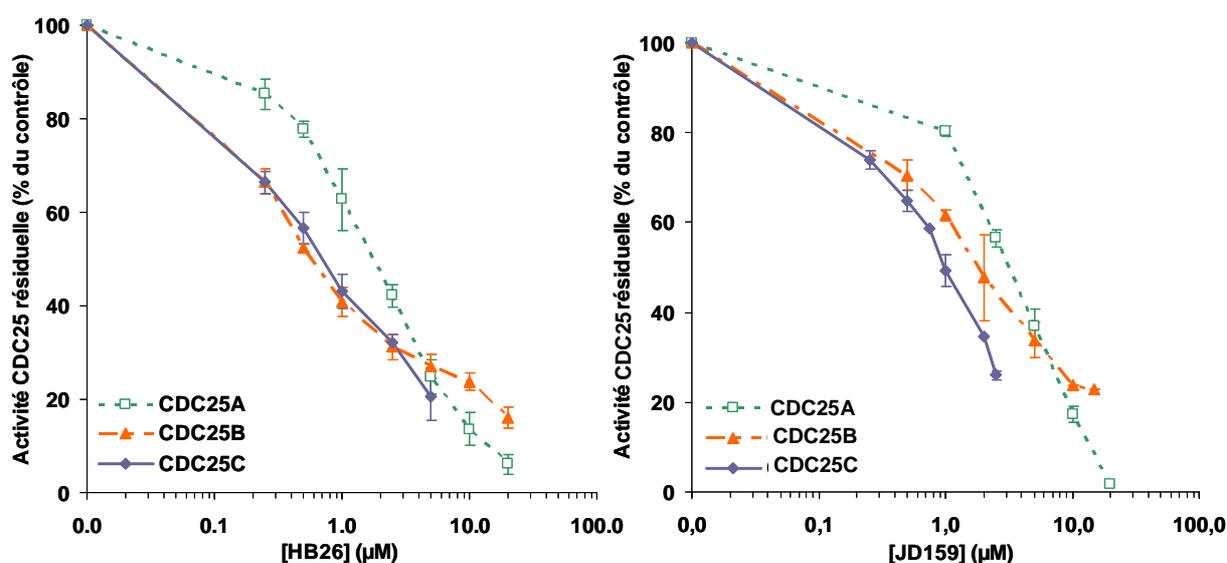


Figure 34 : Courbes effet-dose de l'inhibition des phosphatases CDC25A, B et C par les composés **HB26** et **JD159**.

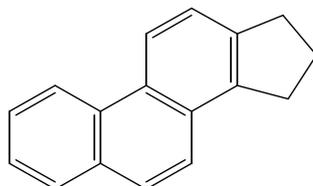
Les courbes d'inhibition, obtenues en **figure 34**, vont nous permettre de calculer les concentrations correspondant aux CI_{50} pour ces deux composés. Les valeurs de CI_{50} , vis-à-vis des trois isoformes de CDC25, sont présentées dans le tableau ci-dessous.

CI ₅₀ (μM) ± SD	HB26	JD159
CDC25A	2,3 ± 0,01	2,6 ± 0,03
CDC25B	0,7 ± 0,01	1,5 ± 0,3
CDC25C	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Au vu de ces résultats, ces deux composés quinoniques apparaissent comme de puissants inhibiteurs des phosphatases CDC25 en agissant à des doses de l'ordre du micromolaire. Il est important de noter que les valeurs de CI₅₀ obtenues sont comparables à celles observées en présence du composé **BN82002** qui est un inhibiteur spécifique des CDC25 commercialisé par Sigma-Aldrich (CI₅₀ = 2,8, 1,8 et 1,9 vis-à-vis de CDC25A, B et C, respectivement). Malgré l'intérêt évident de ces deux inhibiteurs, nous n'avons pu poursuivre leur étude. En effet, de par leurs propriétés, les quinones sont connues pour être des composés très instables. Comme nous ne disposons que d'une quantité limitée de chaque composé et que leur stabilité en solution ne dépassait pas 24 h, ces essais ont dû être interrompus.

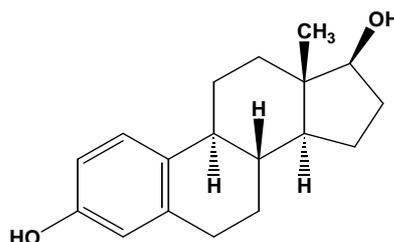
1.3.8 Dérivés stéroïdiens

Une série de dérivés stéroïdiens nous a été fournie par le Professeur D. Poirier du Centre de recherche CHUL, Université de Laval, Canada. De tels composés sont caractérisés par la présence d'un noyau cyclopentanophénantrène hydrophobe.



Structure du noyau cyclopentanophénantrène caractéristique des dérivés stéroïdiens

Cependant, les structures chimiques détaillées ne nous ont pas été fournies car ces composés sont des molécules inédites qui restent encore en cours d'investigation. De plus, une série de dérivés de l'estradiol a également été testée.



Structure du 17β-estradiol

L'intérêt vis-à-vis des dérivés stéroïdiens est apparu suite à la publication de Kar *et al.* en 2007. Cette équipe a mis en évidence un nouvel inhibiteur des phosphatases CDC25A et B, le 2-méthoxy estradiol. Celui-ci induit un arrêt en phase G2/M et l'apoptose de cellules d'hépatome sans affecter la survie des hépatocytes sains aux doses testées.

Comme l'indiquent les tableaux en **annexe 7**, aucune molécule, parmi les dérivés stéroïdiens inédits et les dérivés d'estradiol testés, n'a montré d'activité inhibitrice de CDC25A *in vitro*. Leur étude n'a donc pas été poursuivie.

1.3.9 Composés naturels organosoufrés

Comme nous l'avons décrit dans notre introduction (section « **5. Inhibiteurs des phosphatases CDC25** »), certains composés naturels ont été identifiés comme des inhibiteurs de phosphatases CDC25. Ces substances naturelles ont été isolées, pour la plupart, d'organismes animaux marins mais plus récemment, l'intérêt s'est porté vers l'identification de molécules actives issues du règne végétal. Ainsi, des extraits, issus de plantes utilisées en médecine traditionnelle chinoise (*Agrimona pilosa*, *Galla Chinesis*, *Herba solani lyrati*), ont été rapportés comme possédant une activité inhibitrice des phosphatases CDC25. Ces extraits, dont les molécules actives n'ont pas encore été identifiées et isolées, sont capables d'inhiber la prolifération des cellules tumorales K562 (lymphoblastes humains issus de leucémie myéloïde chronique) en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Yang *et al.* 2005).

De la même façon, nous nous sommes intéressés à deux types de plantes herbacées, largement utilisées depuis plusieurs centaines d'années comme remède naturel à de nombreuses pathologies : l'ail (*Allium sativum*) et l'oignon (*Allium cepa*). Comme nous l'avons cité précédemment, le potentiel chimio-préventif et thérapeutique de certaines espèces d'*Allium* a été confirmé par de nombreuses études épidémiologiques et précliniques utilisant des modèles cellulaires et animaux de cancer (cf. **Introduction** section « **1.2. Cancer et substances naturelles** »).

Ces effets bénéfiques de l'ail ont pu être attribués à la présence de composés organosoufrés. Parmi ceux-ci, l'allicine, qui est formée suite à l'action enzymatique de l'alliinase sur l'alliine (réaction **a** en **figure 35**), joue un rôle primordial. L'allicine est une molécule très instable dont la dégradation chimique rapide va conduire à la formation de différents produits

organosoufrés de « seconde génération » qui possèdent une activité biologique. Parmi ceux-ci, les plus abondamment retrouvés sont les diallyl mono-, di-, tri- et tétrasulfures (composés **DAS**, **DAS₂**, **DAS₃** et **DAS₄** produits suite à la réaction **b**) alors que les diallyl penta-, hexa- et heptasulfures sont présents en quantité plus restreinte (composés **DAS₅**, **DAS₆** et **DAS₇**). Ces composés organosoufrés peuvent également réagir avec différents thiols intracellulaires comme le GSH et conduire à la formation de nouvelles espèces soufrées (réaction **c** en **figure 35**). D'autres réactions de dégradation de l'allicine existent et mènent à la formation de composés soufrés plus complexes (réactions **d** et **e** en **figure 35**).

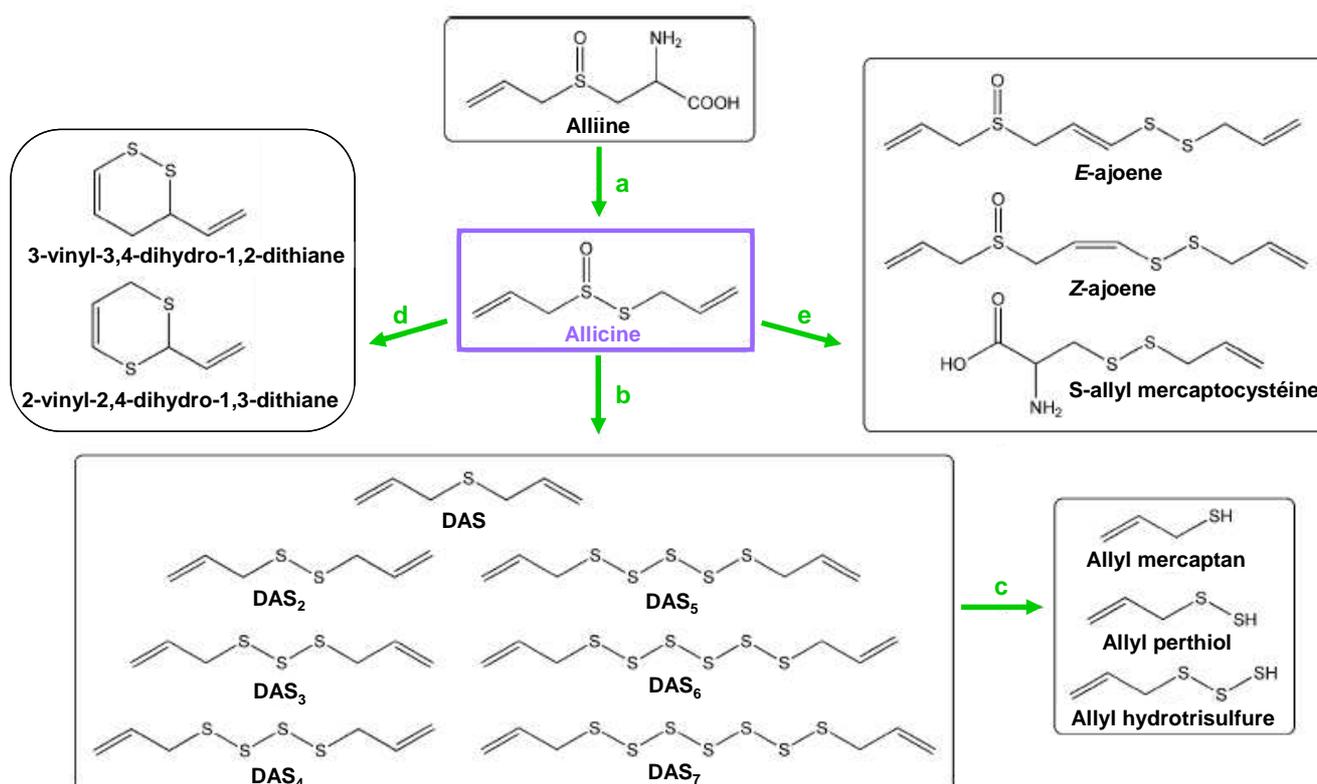


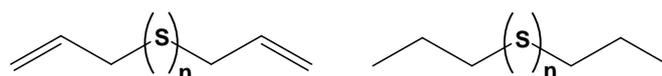
Figure 35 : Schéma récapitulatif des différents composés organosoufrés biologiquement actifs retrouvés dans l'ail (d'après Münchberg *et al.* 2007).

De manière comparable, des molécules polysoufrées présentant une activité biologique sont également retrouvées dans l'oignon. A la différence des allyl sulfures de l'ail, ceux-ci ne contiennent pas d'insaturation : ce sont de propyl sulfures.

De nombreuses études menées ces dernières années ont mis en évidence la diversité d'action cellulaire des composés organosoufrés présents dans l'ail et l'oignon (interaction avec diverses protéines cellulaires, avec l'ADN, génération de stress oxydant..., pour une revue récente voir Scherer *et al.* 2009). Cette diversité d'action peut être expliquée en grande partie par la réactivité chimique complexe de ces composés, et plus particulièrement des

polysulfures (Münchberg *et al.* 2007). L'un des mécanismes d'action les mieux connus est la capacité qu'ont les polysulfures à réagir avec les thiols *via* des réactions de thiolation. Ces réactions peuvent notamment s'effectuer avec des protéines, au niveau de résidus cystéines, et conduire à la formation de disulfure mixte dont l'activité sera inhibée. Cette réaction de thiolation conduit également à la formation de perthiol qui, en réagissant avec des oxydants (dioxygène par exemple), est responsable de la génération de ERO dans les cellules. L'interaction des polysulfures avec des protéines cellulaires peut s'effectuer également par la création d'interactions hydrophobes *via* la présence d'une longue chaîne polysoufrée (≥ 3 atomes de soufre). Enfin, la réactivité cellulaire des polysulfures conduit à la formation de diverses espèces soufrées (radicaux RS_x^\bullet , anions sulfides comme S_x^- et HS^- , sulfure d'hydrogène $H_2S...$) qui sont très réactives et peuvent agir sur différents processus biochimiques. Par exemple, les anions HS^- et S_2^- sont d'excellents ligands pour les ions métalliques et sont capables d'inhiber l'activité de nombreuses métalloprotéines (Jacob *et al.* 2008).

Sachant que les phosphatases CDC25 possèdent un résidu cystéine très réactif au niveau de leur site catalytique, nous avons donc postulé que de tels composés pouvaient être des inhibiteurs potentiels de ces enzymes. Différents composés, naturellement présents dans l'ail et l'oignon, nous ont été fournis par l'équipe du professeur C. Jacob après synthèse, conformément aux méthodes décrites par Milligan *et al.* (1961) et Derbesy et Harpp (1994).



Structures générales des allyl- (ail) et propyl- (oignon) sulfures testés

Les capacités inhibitrices de ces molécules ont été testées en réalisant un criblage préliminaire *in vitro* en présence de 100 μ M de chaque composé. Les résultats obtenus sur les trois isoformes de CDC25 sont présentés en **annexe 8**. Tout d'abord, ces résultats indiquent que les plus fortes activités inhibitrices sont obtenues pour les deux tétrasulfures : **diallyl- (DAS₄)** et **dipropyl tétrasulfures (DPS₄)**. De plus, d'après les résultats de ce même tableau, nous pouvons constater que l'activité inhibitrice des composés organosoufrés testés augmente avec le nombre d'atome de soufre présent dans la molécule (pouvoir inhibiteur de $S_4 > S_3 > S_2 > S_1$). Nos observations sont en accord avec celles reportées par de nombreuses équipes qui suggèrent que l'activité biologique des composés organosoufrés est liée à la longueur de la

chaîne soufrée. Notamment, Wu *et al.* ont montré que l'activité antiproliférative des allyl sulfures, vis-à-vis des cellules d'hépatome humain J5, augmentait avec le nombre d'atomes de soufre (Wu *et al.* 2004). Une explication possible à cette observation pourrait être la réactivité complexe des polysulfures vis-à-vis des protéines. En effet, les molécules comportant plusieurs atomes de soufre sont capables de réagir de différentes manières avec celles-ci (réaction de thiolation, interactions hydrophobes, génération de ERO...) et conduire à une modification de leur activité (Münchberg *et al.* 2007).

Les deux composés les plus actifs, **DAS₄** et **DPS₄**, ont été choisis pour une évaluation plus complète de leur potentiel. Des courbes effet-dose, présentées en **figure 36**, ont été réalisées pour chaque composé en présence des trois isoformes de CDC25 et de la phosphatase alcaline (PAL isolée d'intestin de veau, Sigma-Aldrich).

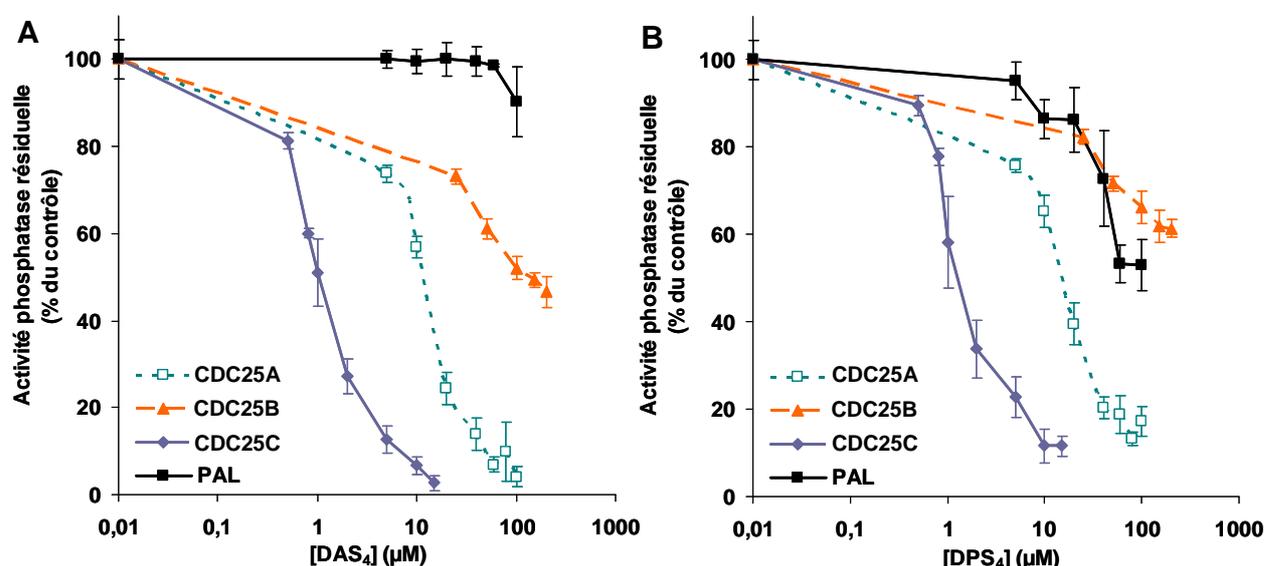


Figure 36 : Inhibition de l'activité des phosphatases CDC25A, B et C et de la phosphatase alcaline (PAL) par les composés **DAS₄** (A) et **DPS₄** (B).

Ces courbes d'inhibition vont nous permettre de calculer les concentrations correspondant aux CI₅₀ pour ces deux composés. Les valeurs de CI₅₀, vis-à-vis des différentes phosphatases sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	DAS ₄		DPS ₄	
	CI ₅₀ (μM)	SD	CI ₅₀ (μM)	SD
CDC25A	16,4	5,5	16,6	5,5
CDC25B	> 100	-	> 100	-
CDC25C	1,1	0,1	1,4	0,2
PAL	> 100	-	> 100	-

Comme l'indiquent la **figure 36** et le tableau ci-dessus, les deux tétrasulfures agissent préférentiellement sur les phosphatases CDC25A et C alors que l'isoforme B et la phosphatase alcaline sont moins sensibles à leur action. En effet, **DAS₄** et **DPS₄** inhibent fortement CDC25C (CI_{50} de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et $1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$, respectivement) et exercent une activité comparable sur CDC25A pour des doses environ 10 fois plus élevées (CI_{50} de l'ordre de $16 \mu\text{M}$). A l'inverse, ils sont très peu efficaces sur les phosphatases CDC25B et la phosphatase alcaline ($CI_{50} > 100 \mu\text{M}$). Il est important de noter que pour de nos essais *in vitro* nous disposons uniquement du domaine catalytique de CDC25B alors que les isoformes A et C sont complètes. Or, le domaine catalytique des phosphatases CDC25 étant une région hautement conservée au sein de laquelle est localisée la cystéine catalytique, il paraît assez surprenant que l'activité de CDC25B ne soit pas altérée. Ces résultats suggèrent donc que **DAS₄** et **DPS₄** n'inhibent pas les enzymes par thiolation de la cystéine catalytique mais pourraient se fixer sur un site autre que le site actif.

De plus, nous avons constaté les activités inhibitrices de l'allyl et du propyl sulfure sont comparables, ce qui suggère que la présence de doubles liaisons, retrouvées dans la structure allyl-, n'est pas essentielle à l'activité des composés. Cette observation est également confirmée par les résultats obtenus lors du criblage préliminaire dans lequel les différents allyl- et propyl sulfures testés présentent une activité inhibitrice du même ordre de grandeur (**annexe 8**).

Nous avons ensuite cherché à caractériser plus précisément le type d'inhibition mis en œuvre en évaluant la réversibilité du phénomène. Cet essai a été réalisé en présence de CDC25C qui est l'isoforme sur laquelle les deux tétrasulfures exercent une inhibition maximale. Pour cela, la phosphatase CDC25C est incubée, pendant différents temps (0-90 min), en présence de concentrations actives de **DAS₄** et **DPS₄** ($10 \mu\text{M}$) ou de solvant seul (contrôle). Ensuite, ce mélange enzyme-inhibiteur va être dilué de manière à obtenir une concentration finale en inhibiteur qui n'est plus active ($0,1 \mu\text{M}$). Si l'effet inhibiteur persiste après cette dilution, le mécanisme d'action peut être considéré comme irréversible.

Comme l'indique la **figure 37**, l'activité inhibitrice de **DAS₄** et **DPS₄** vis-à-vis de CDC25C persiste après dilution. Cette inhibition s'établit progressivement au cours du temps pour atteindre un maximum après 90 min d'incubation (activité CDC25C résiduelle = 25 % et 42 % du contrôle en présence de **DAS₄** et **DPS₄**, respectivement). Ces résultats suggèrent donc que les composés **DAS₄** et **DPS₄** agissent comme des inhibiteurs irréversibles des phosphatases CDC25C et A *in vitro*.

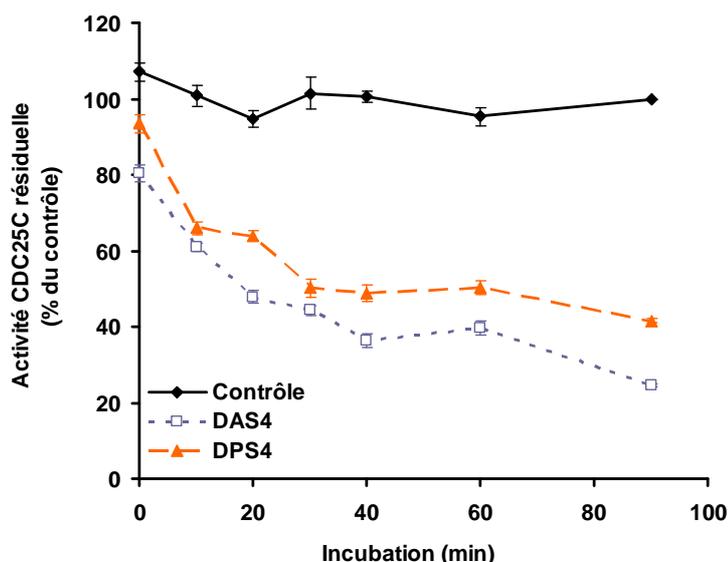


Figure 37 : Essai de réversibilité de l'inhibition de CDC25C par les composés **DAS₄** et **DPS₄**. Les essais ont été réalisés sur 4 expériences indépendantes.

Cependant, il est important de noter que ces essais de réversibilité ont été effectués en absence complète d'agent réducteur. Or, la formation de pont disulfure au sein d'une protéine, suite à la réaction d'un thiol protéique avec un polysulfure par exemple, est connue pour être une réaction chimiquement réversible (Münchberg *et al.* 2007). Ainsi, nous pouvons penser que l'inhibition de CDC25C par les composés **DAS₄** et **DPS₄** pourrait être annulée en présence d'agent réducteur comme le glutathion (GSH) ou le dithiothréitol (DTT). Ces derniers pourraient agir en réactivant l'enzyme par réduction des ponts disulfure formés ou même en réagissant directement avec les polysulfures testés. Cette hypothèse a été confirmée par des résultats obtenus lors d'expériences réalisées en présence d'agents réducteurs. En effet, des essais d'inhibition de CDC25A et C *in vitro* en présence de 140 μM de GSH et 7 μM de DTT montrent que l'activité des composés organosoufrés testés décroît dans ces conditions. La **figure 38** présente l'exemple des inhibiteurs de CDC25A et C les plus actifs (**allicine**, **DAS₄**, **propyl allicine** et **DPS₄** à 100 μM). L'activité inhibitrice de ces composés apparaît diminuée en présence d'agents réducteurs.

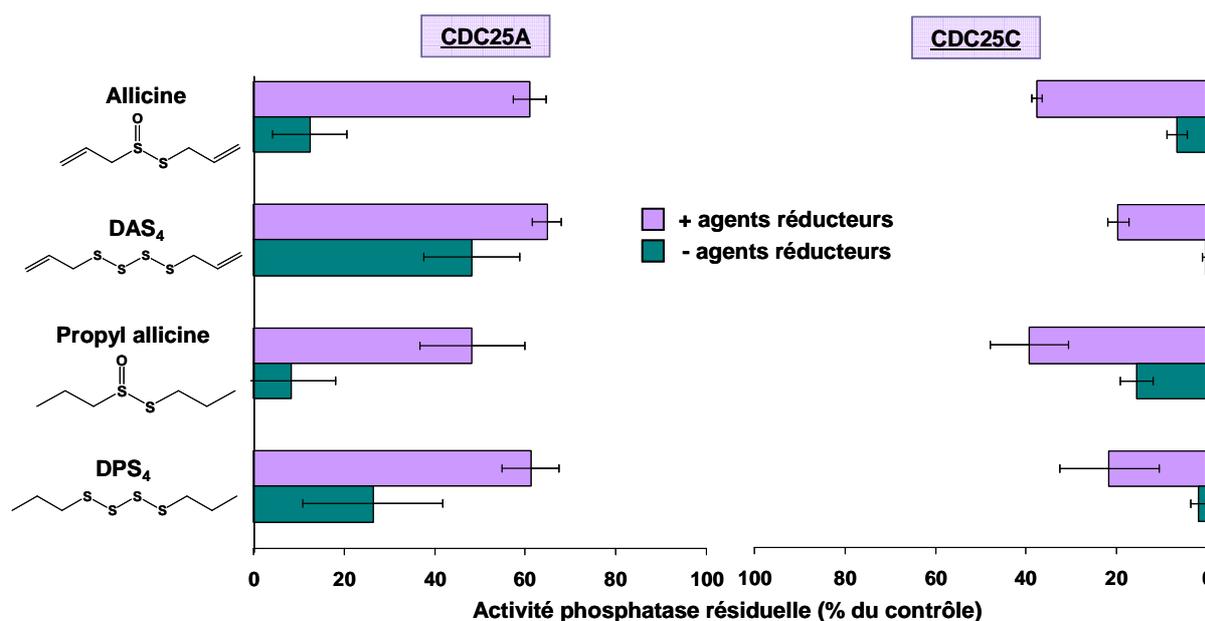


Figure 38 : Evaluation *in vitro* de l'inhibition des phosphatases CDC25A et C par les composés **allicine**, **DAS₄**, **propyl allicine** et **DPS₄** (100 µM) en présence (+) et en absence (-) d'agents réducteurs dans le milieu réactionnel.

Le criblage d'inhibiteurs potentiels des phosphatases CDC25A permis de mettre en évidence deux composés organosoufrés retrouvés naturellement dans l'ail et l'oignon, les diallyl- et dipropyl tétrasulfures (**DAS₄** et **DPS₄**, respectivement). Ceux-ci sont capables d'inhiber, de manière irréversible, les phosphatases CDC25A et C *in vitro* (CI₅₀ de l'ordre de 1 µM et 16 µM vis-à-vis de CDC25C et A, respectivement). Ainsi, ces deux inhibiteurs chimiques ont été choisis pour étudier les effets cellulaires de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans le traitement du cancer du sein.

2 Effets cellulaires des polysulfures DAS₄ et DPS₄, inhibiteurs de CDC25

Compte tenu de leur activité inhibitrice *in vitro*, il a donc été envisagé d'évaluer les effets cellulaires de ces deux tétrasulfures, naturellement présents dans l'ail et l'oignon. Cette étude a été réalisée sur différents modèles cellulaires d'adénocarcinomes mammaires humains : sensibles et résistant.

2.1 Caractérisation des modèles cellulaires

Tout d'abord, nous avons voulu examiner les niveaux de transcrits et de protéines des différentes isoformes de CDC25 dans les lignées cellulaires utilisées pour notre étude. Ce travail a été réalisé par H. Albert au LIMBP.

Deux modèles cellulaires d'adénocarcinomes mammaires humains sensibles ont été utilisés : MCF-7 et MDA-MB-231. Ces derniers sont des modèles de référence reconnus très largement utilisés lors d'étude sur le cancer du sein. Nous avons également étudié les effets de nos inhibiteurs sur une lignée de cellules MCF-7 rendues résistantes (Vcr-R). Ces cellules (initialement nommées Vcrems dans la publication d'origine de Whelan *et al.* 1992) présentent une résistance multiple à la vincristine, l'adriamycine et l'étoposide qui est associée à une surexpression de la glycoprotéine P et de la GST-pi. Enfin, la lignée épithéliale mammaire non cancéreuse immortalisée par la télomérase, hTERT-HME1, a été utilisée comme modèle de référence.

L'estimation des niveaux de transcrits de CDC25A, B et C (RT-PCR) et des protéines associées (western-blot) dans chaque lignée cancéreuse a été effectuée par comparaison avec ceux observés dans le modèle de cellules non cancéreuses, hTERT-HME1. Les résultats obtenus en RT-PCR (**figure 39 A**) présentent les niveaux globaux des transcrits de CDC25A, B et C car les amorces utilisées permettent l'amplification de l'ensemble des variants de chaque isoforme. L'analyse par western-blot (**figure 39 B**) permet d'identifier une bande unique pour CDC25A qui correspond aux variants A1 et A2 qui ont un poids moléculaire très proche (~ 67 KDa). Pour CDC25B et C, nous ne pouvons identifier que les variants les plus abondants : CDC25B3, CDC25C1 et C5. Etant donné que les comparaisons sont effectuées sur des lignées cellulaires différentes, une coloration des membranes de nitrocellulose au rouge Ponceau a été réalisée pour vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques.

Les résultats présentés en **figure 39** indiquent que les niveaux transcriptionnels et protéiques de CDC25A et B sont comparables dans la lignée cellulaire cancéreuse sensible MCF-7 et la lignée non cancéreuse hTERT-HME1. Or, il est important de noter que la lignée cellulaire non cancéreuse hTERT-HME1 a été transformée et possède une activité proliférative intense qui s'apparente à celle observée pour la lignée cancéreuse MCF-7 (temps de doublement de 24-25 h pour hTERT-HME1 vs 29 h pour MCF-7). Il ne serait donc pas surprenant que des régulateurs clés du cycle cellulaire comme les CDC25 soient surexprimés dans ces cellules immortalisées. De plus, un niveau important de protéines CDC25C1 et C5 a

été reporté dans cette lignée mais n'a pas pu être associé à une augmentation du niveau d'expression globale de l'isoforme C. Ces résultats suggèrent donc que la lignée hTERT-HME1 n'est probablement pas un bon contrôle dans le cadre d'une étude sur la régulation du cycle cellulaire de cellules non cancéreuses.

Comme l'indique la **figure 39 A**, une légère surexpression de CDC25A a été reportée dans la seconde lignée sensible MDA-MB-231 (x 1,3 par rapport au niveau de transcrits dans les cellules hTERT-HME1). Ceci a été associé à une augmentation du niveau protéique de CDC25A par rapport à celui reporté dans les cellules hTERT-HME1 (**figure 39 B**).

Enfin, une surexpression de CDC25A et B a été reportée dans la lignée résistante Vcr-R (x 1,2 et 1,6 par rapport au niveau de transcrits du contrôle, respectivement) (**figure 39 A**). Les résultats obtenus en western-blot sont en accord avec ceux observés pour les transcrits et indiquent une légère augmentation du niveau protéique de CDC25A ainsi qu'une nette induction de CDC25B3 (**figure 39 B**). L'induction de CDC25A et B observée dans la lignée résistante Vcr-R est conforme à ce que nous attendions. En effet, il est maintenant clairement établi qu'une surexpression des phosphatases CDC25 peut être corrélée au développement de résistance à certains agents anticancéreux ainsi qu'à un mauvais pronostic (Kristjansdottir et Rudolph 2004).

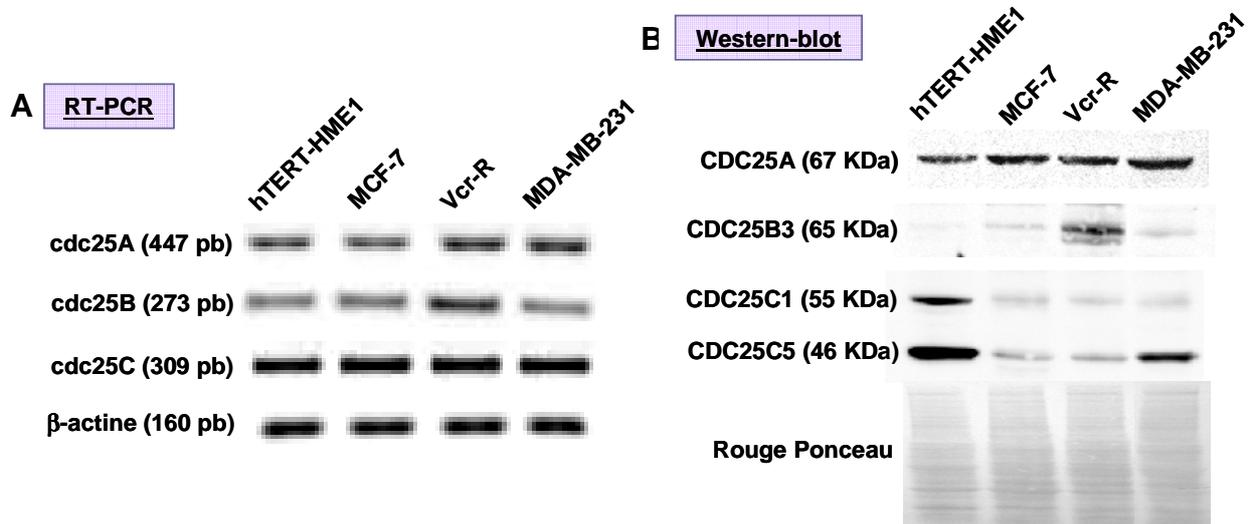


Figure 39 : Evaluation du niveau des transcrits (A) et des protéines (B) des phosphatases CDC25A, B et C dans les différentes lignées cellulaires étudiées.

Ainsi, le choix des lignées cellulaires MCF-7, MDA-MB-231 et Vcr-R semble approprié dans le cadre de notre étude qui vise à évaluer l'intérêt de l'inhibition des phosphatases CDC25 dans le traitement du cancer du sein. En effet, les lignées d'adénocarcinomes mammaires humains sensibles (MCF-7 et MDA-MB-231) présentent un profil d'expression

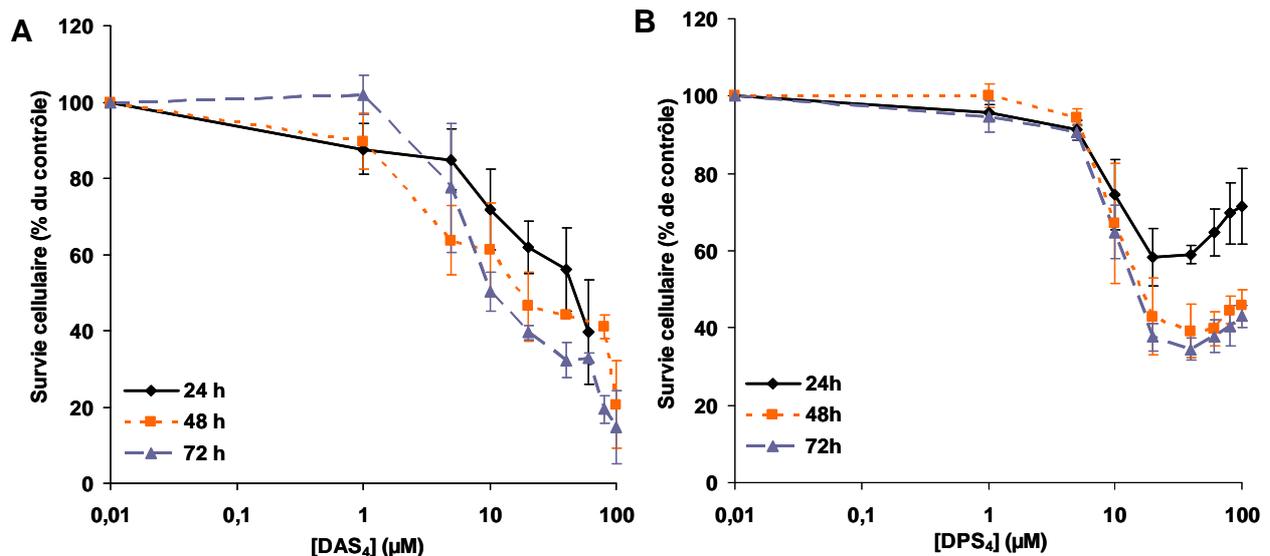
des CDC25 comparable à celui observé dans les cellules immortalisées à prolifération rapide (hTERT-HME1). De plus, la lignée Vcr-R apparaît comme un modèle de choix car son phénotype résistant a pu être associé à un niveau élevé de CDC25A et B.

2.2 Activité antiproliférative des inhibiteurs de CDC25

2.2.1 Effets sur les lignées cellulaires sensibles

Dans un premier temps, la cytotoxicité des composés **DAS₄** et **DPS₄** a été évaluée sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome mammaire sensible, MCF-7. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques d'estimation de la viabilité cellulaire : le test de cytotoxicité au MTT (Mosmann 1983) et le suivi de la croissance cellulaire par numération au bleu Trypan.

Les résultats des tests MTT présentés en **figure 40** indiquent que les composés **DAS₄** (A) et **DPS₄** (B) induisent une nette diminution de la viabilité des cellules MCF-7. Ces courbes nous ont permis de calculer les concentrations correspondant aux CI₅₀ pour ces deux composés. Comme indiqué dans le tableau en **figure 40 C**, le composé **DAS₄** exerce une activité cytotoxique qui est dose- et temps-dépendante (CI₅₀ de 92 ± 14 μM, 43 ± 12 μM et 25 ± 7 μM après 24, 48 et 72 h de traitement, respectivement). Les valeurs de CI₅₀ obtenues pour **DPS₄** sont du même ordre de grandeur que celles observées pour **DAS₄** (CI₅₀ > 100 μM après 24 h et CI₅₀ = 25 ± 4 μM et 23 ± 3 μM après 48 et 72 h de traitement, respectivement).



C

	DAS ₄		DPS ₄	
	CI ₅₀ (μM)	SD	CI ₅₀ (μM)	SD
	24 h	92	14	> 100
MCF-7	48 h	43	12	25
	72 h	25	7	23

Figure 40 : Activité cytotoxique des composés **DAS₄** et **DPS₄** sur la lignée d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7. Les cellules sont traitées pendant différents temps (24, 48 et 72 h) en présence de concentrations croissantes en inhibiteur puis la viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT (A et B). La détermination des CI₅₀ (C) a été réalisée en utilisant le logiciel GlmTox (Maul 1992).

Dans un deuxième temps, la croissance des cellules MCF-7, en présence **DAS₄** et **DPS₄**, a été suivie grâce à la réalisation de comptages au bleu Trypan en cellule de Malassez. Lors de ces expériences, nous avons également évalué les effets cellulaires d'un composé inactif vis-à-vis des phosphatases CDC25 *in vitro*, le diallyl sulfure (**DAS**). Les courbes de croissance obtenues sont présentées en **figure 41** En présence de solvant seul (contrôle) et de **DAS** (50 μM), la croissance des cellules MCF-7 est exponentielle pendant les 96 h de l'expérience. Le traitement des cellules par **DAS₄** et **DPS₄** (50 μM) provoque une réduction significative de leur croissance qui peut être due à un arrêt du cycle et/ou l'induction de la mort cellulaire.

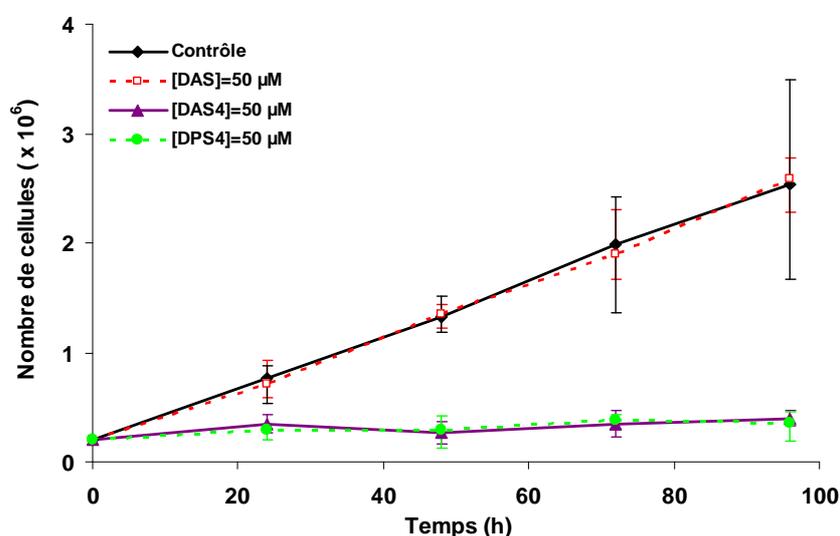


Figure 41 : Suivi de la croissance des cellules MCF-7 par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. Les cellules sont cultivées pendant différents temps (0-96 h) en présence de solvant seul (contrôle), de deux inhibiteurs de CDC25 *in vitro* (**DAS₄** et **DPS₄** à 50 μM) et d'un composé non actif (**DAS** à 50 μM).

Ces résultats ont été confirmés par la réalisation d'observations microscopiques des cellules MCF-7 traitées pendant différents temps par les composés **DAS₄** et **DPS₄** (**figure 42**).

Dans les boîtes contrôles (MCF-7 traitées par le solvant seul), nous pouvons observer un agencement typique des cellules MCF-7 qui adhèrent au support par des prolongements cellulaires et se regroupent sous forme de « colonie ». Par contre, lorsque celles-ci sont traitées par **DAS₄** et **DPS₄**, les cellules reprennent une forme ovoïde régulière et se détachent du support. Ce phénomène, qui suggère l'induction d'une mort cellulaire, s'accroît avec la durée du traitement.

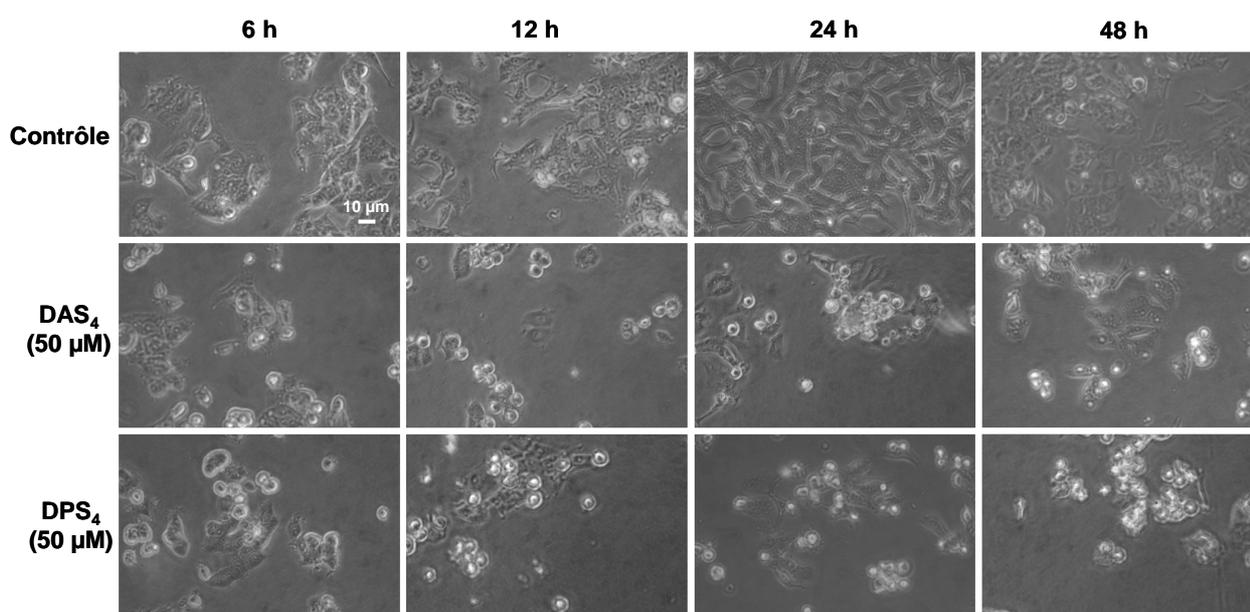


Figure 42 : Observation microscopique des cellules MCF-7 après différents temps d'incubation en présence de solvant seul (contrôle avec 0,5 % de DMSO) et des composés **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM).

Pour confirmer l'activité antiproliférative des composés **DAS₄** et **DPS₄** vis-à-vis de cellules de cancer du sein sensibles, une seconde lignée a été utilisée : la lignée MDA-MB-231. De la même manière que pour les cellules MCF-7, nous avons réalisé le test de cytotoxicité au MTT (**figure 43 A, B et C**) et le suivi de la croissance cellulaire par numération au bleu Trypan (**figure 43 D**). Les résultats obtenus sur la lignée cellulaire MDA-MB-231 sont tout à fait comparables à ceux obtenus sur la lignée MCF-7. Les composés **DAS₄** et **DPS₄** exercent une activité cytotoxique qui est dose- et temps-dépendante (CI_{50} du même ordre de grandeur que celles observées sur MCF-7, comme indiqué dans le tableau C en **figure 43**). Le suivi de la croissance des cellules MDA-MB-231 indique que, tout comme pour MCF-7, les inhibiteurs de CDC25 testés (**DAS₄** et **DPS₄**) exercent une activité antiproliférative alors que ni la présence du composé inactif (**DAS**) ni du solvant seul n'ont d'effets délétères (**figure 43 D**).

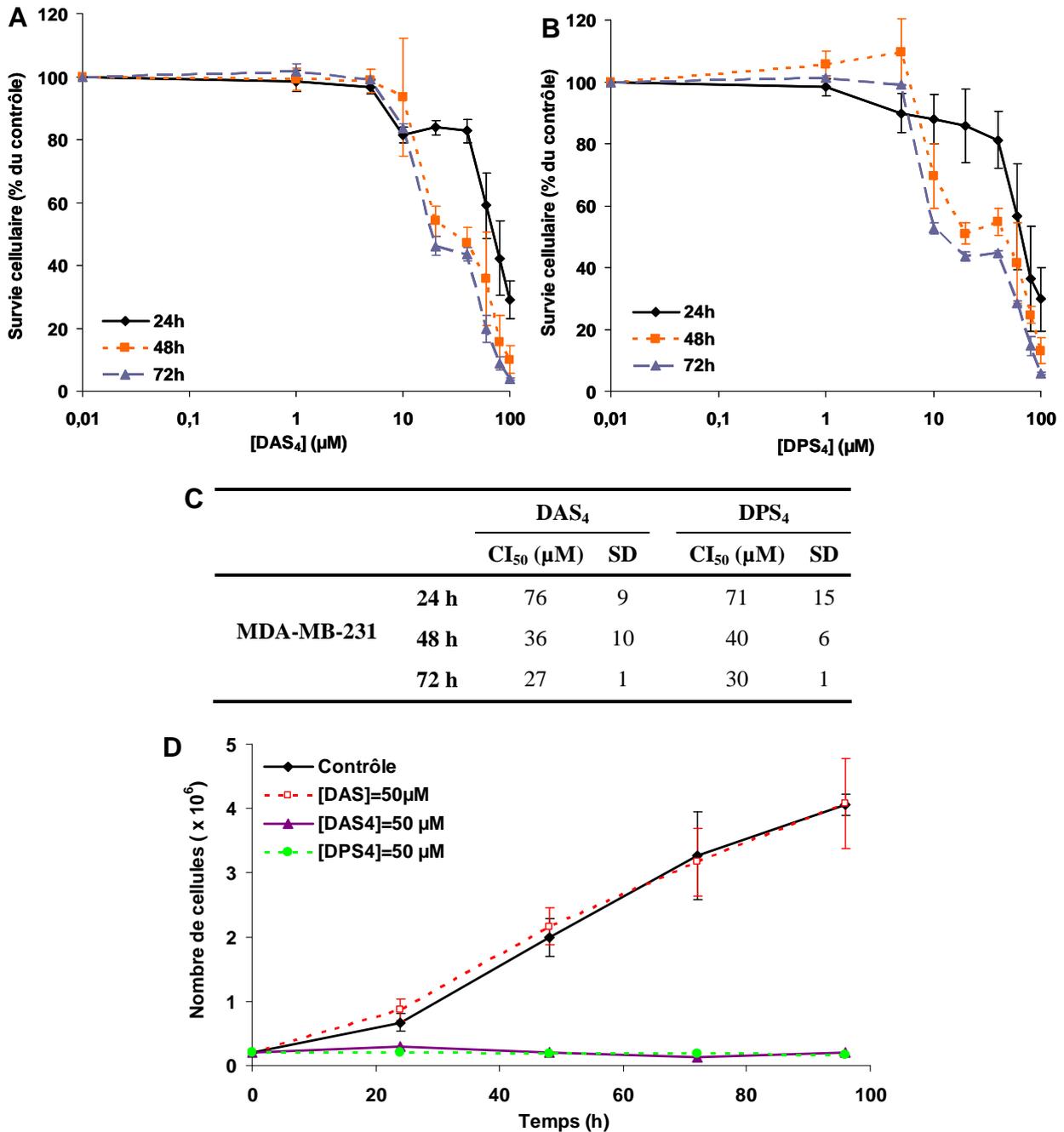


Figure 43 : Evaluation de l'activité cytotoxique des composés **DAS₄** et **DPS₄** sur la lignée d'adénocarcinome mammaire humaine MDA-MB-231 par réalisation de tests MTT (**A**, **B** et **C**) et d'un suivi de la croissance cellulaire par numération au bleu Trypan (**D**).

2.2.2 Effets sur la lignée cellulaire résistante (Vcr-R)

Sur la base des résultats obtenus pour les lignées sensibles MCF-7 et MDA-MB-231, il nous est apparu intéressant d'évaluer l'activité antiproliférative des composés **DAS₄** et **DPS₄** sur la lignée de cellules résistantes qui dérive de MCF-7, Vcr-R. Les courbes de croissance

obtenues sont présentées en **figure 44** En présence de solvant seul (contrôle) et de **DAS** (50 μM), la croissance des cellules Vcr-R est exponentielle jusqu'à 72 h environ. Par la suite, la population cellulaire entre dans une phase de déclin qui est certainement due au phénomène d'inhibition de contact. Dès les premières heures de traitement des cellules par **DAS₄** et **DPS₄** (50 μM), une réduction significative de la prolifération cellulaire est observée. Cependant, pour des temps plus longs (> 48 h), les cellules Vcr-R semblent moins sensibles à l'action du composé **DAS₄** par rapport aux lignées sensibles testées car un redémarrage de la croissance cellulaire est observé.

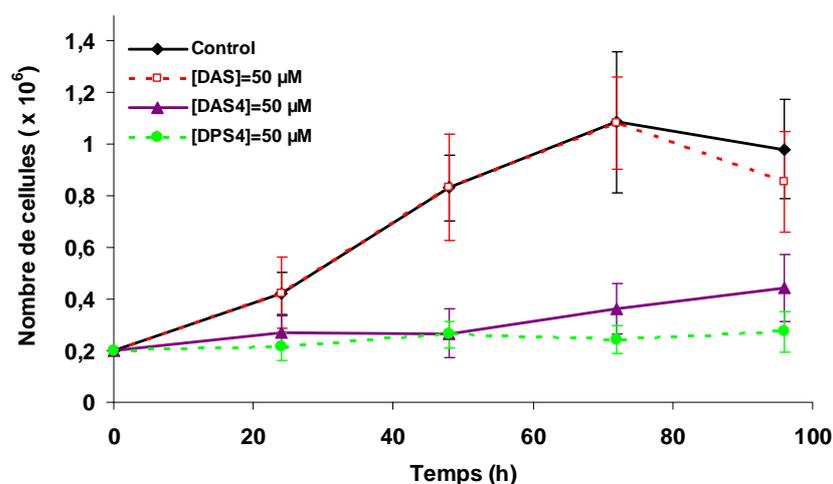


Figure 44 : Suivi de la croissance des cellules Vcr-R par la méthode d'exclusion au bleu Trypan. Les cellules sont cultivées pendant différents temps (0-96 h) en présence de solvant seul (contrôle), de deux inhibiteurs de CDC25 *in vitro* (**DAS₄** et **DPS₄** à 50 μM) et d'un composé non actif (**DAS** à 50 μM).

Nous avons montré que les deux inhibiteurs de CDC25 testés, **DAS₄** et **DPS₄**, exercent une activité antiproliférative sur les lignées sensibles d'adénocarcinomes mammaires humains MCF-7 et MDA-MB-231. De manière intéressante, cet effet est également observé pour la lignée résistante Vcr-R. Ainsi, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués, notamment au niveau de la régulation du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose.

2.3 Analyse du cycle cellulaire

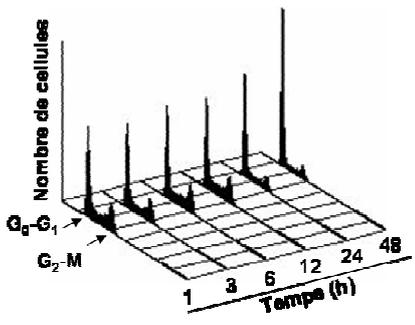
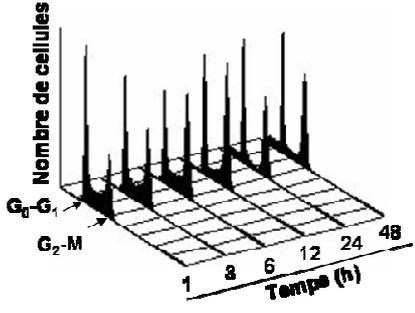
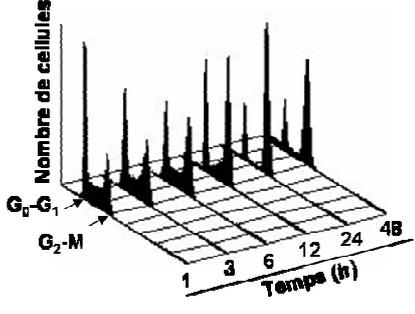
Suite aux résultats d'inhibition des phosphatases CDC25A et C obtenus *in vitro* et aux activités antiprolifératives observées sur les différentes lignées cellulaires de cancer du sein, nous avons procédé à l'étude du cycle cellulaire. En effet, ces résultats laissent penser que

l'activité cellulaire des composés **DAS₄** et **DPS₄** pourrait induire un arrêt du cycle. Ainsi, les cellules ont été traitées pendant différents temps (1 - 48 h) par les composés **DAS₄** et **DPS₄** puis l'analyse de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle a été réalisée par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium (IP).

Comme l'indique le **tableau 4**, dès 3 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄**, la répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle cellulaire est affectée. Une diminution significative du nombre de cellules en phase G₀/G₁ a été reportée. A partir de 6 h, nous observons très clairement un blocage du cycle cellulaire en phase G₂/M qui est maintenu pour des temps de traitement plus longs (par exemple à 48 h, 16 ± 14 % de cellules MCF-7 en phase G₂/M pour le contrôle vs 55 ± 5 et 81 ± 1 % après traitement par **DAS₄** et **DPS₄**, respectivement).

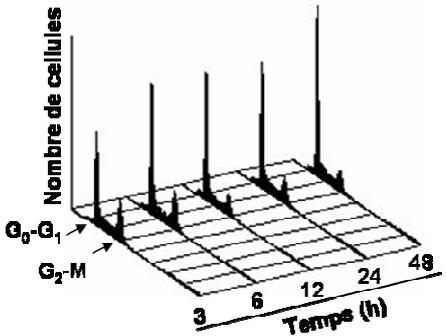
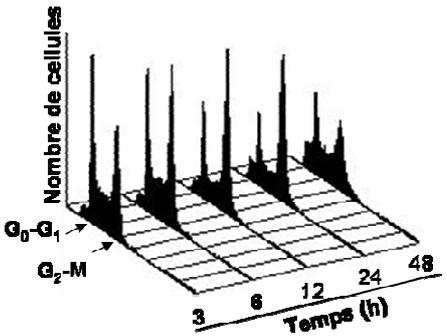
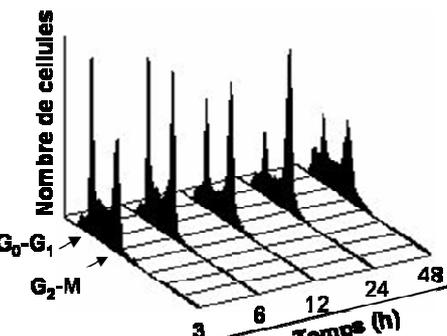
La réalisation d'une expérience similaire sur la seconde lignée sensible de cancer du sein, MDA-MB-231, a permis d'obtenir des résultats comparables à ceux obtenus sur les cellules MCF-7 (**tableau 5**). Cependant, le blocage en G₂/M, associé à une diminution de la proportion des cellules en phase G₀/G₁, paraît un peu plus tardif que pour les cellules MCF-7 (14 % de cellules MDA-MB-231 en phase G₂/M pour le contrôle vs 53 ± 5 % et 58 ± 1 % après 12 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄**, respectivement). De plus, pour des traitements courts (3 h et 6 h), la proportion de cellules en phase S augmente considérablement par rapport au contrôle. Enfin, il est important de noter que dans le cas des cellules MDA-MB-231, une levée du blocage en phase G₂/M semble s'effectuer après 48 h de traitement par les tétrasulfures. Celle-ci est caractérisée par une diminution du nombre de cellules en phase G₂/M et une augmentation de la proportion de cellules en phase S.

Tableau 4 : Analyse de la progression du cycle cellulaire de la lignée sensible MCF-7 en présence de solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant différents temps (1 – 48 h).

Traitement	Répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle			
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
Contrôle 	1 h	41	27	32
	3 h	44 ± 3	31 ± 7	25 ± 4
	6 h	46 ± 4	32 ± 1	23 ± 4
	12 h	53 ± 13	29 ± 3	18 ± 10
	24 h	61 ± 6	21 ± 6	18 ± 11
	48 h	67 ± 14	17 ± 0	16 ± 14
DAS₄ (50 µM) 	1 h	39	29	32
	3 h	32 ± 2*	31 ± 1	38 ± 8
	6 h	26 ± 0*	27 ± 10	47 ± 10*
	12 h	27 ± 8	17 ± 3*	57 ± 5*
	24 h	38 ± 1*	6 ± 6*	56 ± 7*
	48 h	37 ± 4*	9 ± 1*	55 ± 5*
DPS₄ (50 µM) 	1 h	41	28	31
	3 h	32 ± 4*	29 ± 13	39 ± 8
	6 h	26 ± 2*	27 ± 10	48 ± 8*
	12 h	22 ± 10	18 ± 2*	61 ± 12*
	24 h	18 ± 4*	2 ± 1*	80 ± 3*
	48 h	15 ± 0*	4 ± 1*	81 ± 1*

* significativement différent du contrôle (p < 0,05)

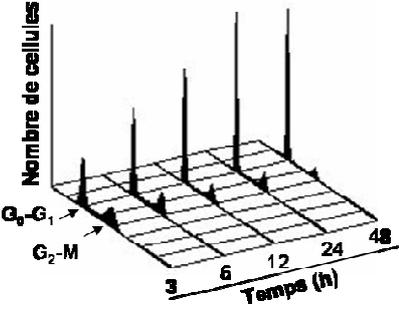
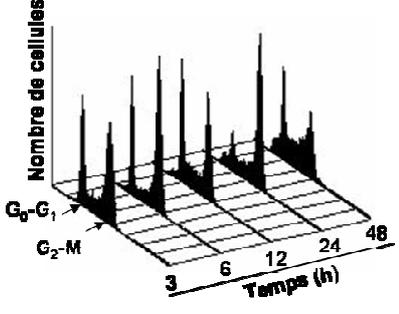
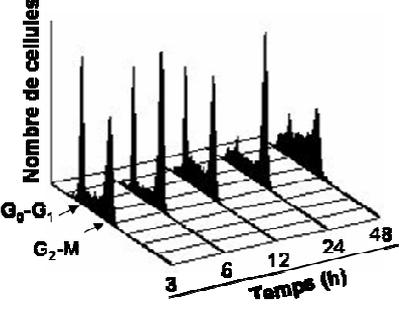
Tableau 5 : Analyse de la progression du cycle cellulaire de la lignée sensible MDA-MB-231 en présence de solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant différents temps (3 – 48 h).

Traitement		Répartition des cellules MDA-MB-231 dans les différentes phases du cycle		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
	3 h	39	33	28
	6 h	48	28	24
	12 h	54	32	14
	24 h	58	31	11
	48 h	69	25	6
		3 h	21	57
6 h		13	50	37
12 h		21	26	53
24 h		22	16	62
48 h		36	36	27
		3 h	28	40
	6 h	19	37	45
	12 h	23	19	58
	24 h	13	23	64
	48 h	17	47	36

De manière intéressante, une accumulation significative en phase G₂/M des cellules de la lignée résistante Vcr-R a également été reportée dès 6 h et 12 h de traitement par **DPS₄** et **DAS₄**, respectivement (56 ± 4 % et 60 ± 16 % de cellules Vcr-R en phase G₂/M comme indiqué dans le **tableau 6**). Ceci est associé à une nette diminution de la proportion de cellules en phase G₀/G₁. De même que pour les cellules MDA-MB-231, il semble que la levée

d'inhibition soit déjà amorcée après 48 h de traitement car nous pouvons observer une diminution du nombre de cellules en G₂/M par rapport au temps 24 h, associée à une augmentation significative de la proportion de cellules en phase S (15 ± 4 % de cellules Vcr-R en phase S pour le contrôle vs 33 ± 6 % 48 ± 5 % après 48 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄**, respectivement).

Tableau 6 : Analyse de la progression du cycle cellulaire de la lignée résistante Vcr-R en présence de solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant différents temps (3 – 48 h).

Traitement		Répartition des cellules Vcr-R dans les différentes phases du cycle		
		G0/G1	S	G2/M
 <p>Contrôle</p>	3 h	27 ± 16	34 ± 6	38 ± 10
	6 h	43 ± 13	17 ± 2	40 ± 15
	12 h	64 ± 12	25 ± 16	11 ± 5
	24 h	65 ± 18	25 ± 16	10 ± 2
	48 h	70 ± 14	15 ± 4	8 ± 5
	 <p>DAS₄ (50 µM)</p>	3 h	22 ± 12	36 ± 9
6 h		16 ± 8*	26 ± 7*	58 ± 2
12 h		22 ± 6*	18 ± 14	60 ± 16*
24 h		11 ± 6*	17 ± 15	72 ± 10*
48 h		35 ± 10*	33 ± 6*	32 ± 12*
 <p>DPS₄ (50 µM)</p>		3 h	24 ± 12	32 ± 10
	6 h	20 ± 4*	24 ± 3*	56 ± 4*
	12 h	16 ± 7*	50 ± 13	34 ± 9*
	24 h	12 ± 7*	24 ± 9	64 ± 4*
	48 h	22 ± 8*	48 ± 5*	29 ± 5*

* significativement différent du contrôle (p < 0,05)

Nous avons montré que les composés **DAS₄** et **DPS₄** exercent leur activité antiproliférative sur les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et Vcr-R en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M. Ce blocage des cellules en phase G₂/M est cohérent avec les résultats d'inhibition de CDC25A et C reportés *in vitro*. En effet, nous avons montré précédemment que ces deux tétrasulfures agissaient comme des inhibiteurs irréversibles de CDC25C et A *in vitro*. Or, au niveau cellulaire, CDC25C est principalement impliqué au moment de la transition G₂/M en permettant d'achever l'activation des complexes Cdk1/cycline B à l'entrée en mitose. Il a également été montré que l'isoforme A aurait un rôle à jouer lors de cette activation (Boutros *et al.* 2006). Ainsi, la capacité des composés **DAS₄** et **DPS₄** à inhiber ces deux phosphatases dans les différentes lignées de cancer du sein pourrait être un des mécanismes conduisant à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₂/M.

2.4 Induction de l'apoptose

Dans la mesure où l'apoptose peut être induite par des perturbations du cycle cellulaire, nous avons recherché si les composés **DAS₄** et **DPS₄** étaient capables d'induire la mort cellulaire programmée des cellules MCF-7. L'évaluation de l'apoptose a été réalisée par différentes techniques. L'une d'entre elles consiste à mettre en évidence un évènement précoce de l'apoptose, la dépolarisation de la mitochondrie. Deux autres techniques font état d'évènements plus tardifs qui sont l'activation de protéases spécifiques de l'apoptose (les caspases) et la fragmentation de l'ADN.

2.4.1 Mise en évidence de l'apoptose

Tout d'abord, nous avons suivi l'évolution du potentiel membranaire mitochondrial car la chute de celui-ci est une des manifestations précoces de l'apoptose, qui s'accompagne de la libération de différents facteurs apoptogéniques (cytochrome *c*, AIF pour *Apoptosis Inducing Factor*...). Les cellules MCF-7 ont été exposées à **DAS₄** et **DPS₄** pendant des temps courts (15 min à 4 h) et l'analyse a été réalisée à l'aide d'une sonde fluorescente (JC-1) dont l'émission dépend du potentiel mitochondrial. Des dimères de la sonde s'accumulent dans la mitochondrie lorsque cette dernière est polarisée et émettent une fluorescence rouge ($\lambda_{\text{émission}} = 590 \text{ nm}$). Par contre, lorsque la mitochondrie est dépolarisée la sonde est libre dans le cytoplasme et émet une fluorescence verte ($\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$). La **figure 45** présente les

images obtenues en microscopie à fluorescence lorsque les cellules MCF-7 sont traitées par le solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 μ M). Un contrôle positif a été réalisé en présence d'une molécule connue pour induire une rapide chute du potentiel mitochondrial (**CCCP** 20 μ M). A partir de 3 h de traitement, les deux tétrasulfures induisent une dépolarisation membranaire. En effet, nous observons une disparition progressive de la fluorescence rouge au niveau des mitochondries et la présence de la sonde dans le cytoplasme caractérisée par la fluorescence verte.

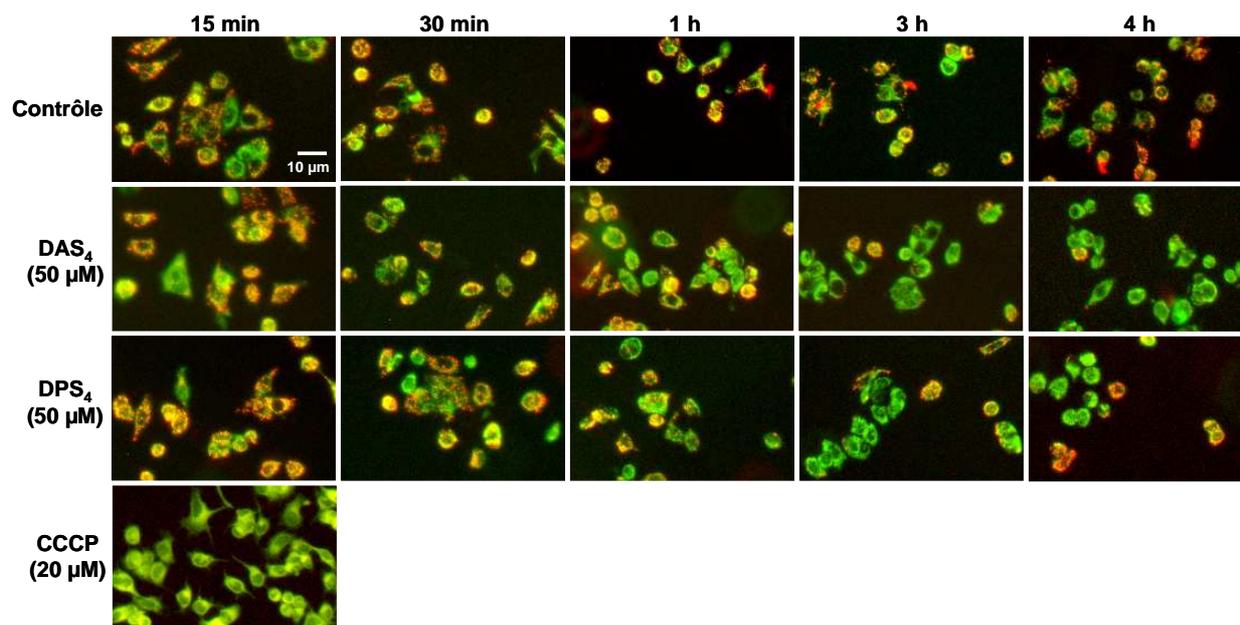


Figure 45 : Mise en évidence de la dépolarisation de la membrane mitochondriale des cellules MCF-7 par une technique de microscopie à fluorescence (marquage JC-1). Les cellules sont traitées pendant différents temps (15 min à 4 h) par le solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 μ M) et **CCCP** à 20 μ M (contrôle positif).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à deux évènements plus tardifs de l'apoptose : le clivage de la PARP (Poly-(ADP-ribose) polymérase) et la fragmentation de l'ADN. En effet, la libération de facteurs apoptogéniques de la mitochondrie conduit à l'activation d'une famille de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel lors du processus apoptotique, les caspases. Or, la PARP est une enzyme de réparation de l'ADN qui est l'un des premiers substrats clivés et inactivés par les caspases durant l'apoptose. Ainsi, nous avons étudié le clivage de la PARP (112 KDa) dans les cellules MCF-7 après traitement par **DAS₄** et **DPS₄** (50 μ M). Celui-ci génère deux fragments dont un, de 85 KDa, est observable en western-blot. Le western blot présenté en **figure 46** révèle l'apparition du fragment clivé de 85 KDa après 12 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄** (50 μ M).

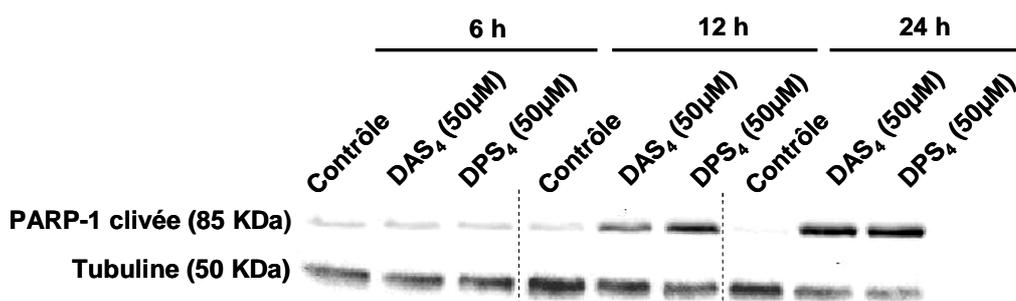


Figure 46 : Etude du clivage de la PARP en western-blot après traitement des cellules MCF-7 par le solvant seul (contrôle), **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM).

L'induction de l'apoptose des cellules MCF-7 a été confirmée par une technique de microscopie à fluorescence qui met en évidence l'une des caractéristiques morphologiques les plus typiques intervenant lors du processus de mort cellulaire programmée : la fragmentation de l'ADN. Les cellules MCF-7 ont été traitées pendant 24 h par les composés **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) puis ont été marquées au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui est un fluorochrome spécifique de l'ADN. Les images obtenues en microscopie à fluorescence démontrent clairement la présence de noyaux cellulaires fragmentés après traitement en présence des deux tétrasulfures par rapport au contrôle (**figure 47**).

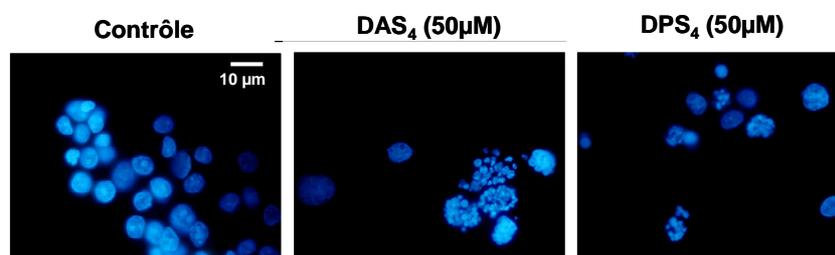


Figure 47 : Images en microscopie à fluorescence (marquage au DAPI) de cellules MCF-7 en apoptose après traitement par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM pendant 24 h).

Ces résultats confirment la capacité des composés **DAS₄** et **DPS₄** à induire l'apoptose des cellules MCF-7. Ainsi, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le déclenchement de l'apoptose.

2.4.2 Caractérisation du mécanisme apoptotique

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à deux protéines appartenant à la super famille Bcl-2 (Bax et Bcl-2) qui jouent un rôle primordial dans la voie dite intrinsèque de

l'apoptose. La protéine anti-apoptotique Bcl-2 est capable d'inhiber la protéine pro-apoptotique Bax en formant des hétérodimères inactifs avec cette dernière. Ainsi, une augmentation de Bax/Bcl-2 ne permet plus à la protéine Bcl-2 de neutraliser Bax. Les homodimères Bax vont alors se fixer à la membrane externe de la mitochondrie et permettre le relargage cytosolique du cytochrome *c*. Comme l'indique la **figure 48**, le traitement des cellules MCF-7 par les deux tétrasulfures (**DAS₄** et **DPS₄** à 50 µM) induit une augmentation du niveau de transcrits bax/bcl-2. Une induction du niveau d'expression de bax est associée à un faible niveau d'expression de bcl-2 (**figure 48 A**). De plus, la **figure 48 B** montre une nette diminution du niveau protéique de Bcl-2 dès 6 h et 12 h de traitement par **DPS₄** et **DAS₄**, respectivement. Ces résultats révèlent donc l'implication des protéines de la famille Bcl-2, et par conséquent de la mitochondrie dans le processus apoptotique mis en jeu.

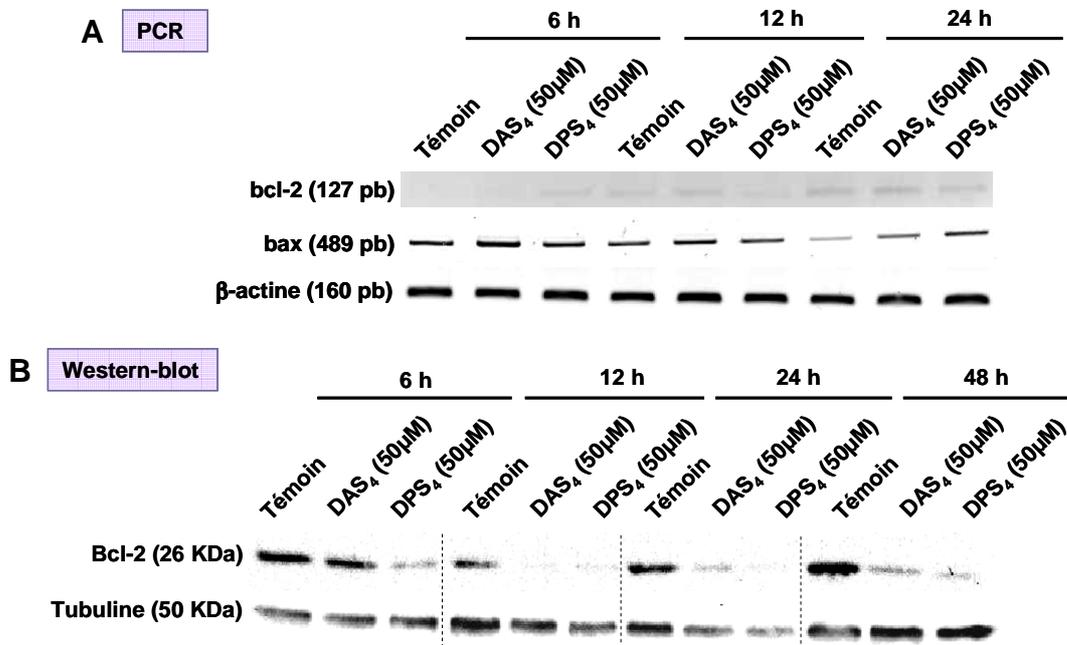


Figure 48 : Analyse RT-PCR du niveau de transcrits de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose (bax et bcl-2) chez des cellules MCF-7 traitées par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant 6 - 24 h (A). Analyse du niveau protéique de Bcl-2 par western-blot dans les cellules MCF-7 traitées par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant 6-48 h (B).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'expression de deux gènes connus pour leur rôle clé dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, p53 et p21. La protéine p53 est un facteur de transcription très peu actif en condition normale. Cependant, la présence de dommages à l'ADN permet d'activer p53 qui va alors induire la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose. L'une des cibles de p53 est le gène codant pour l'inhibiteur de Cdk, p21. Comme le montre la **figure 49**, le niveau d'expression de *p53* reste constant au cours du temps après traitement des cellules

MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM). De même, après 48 h de traitement, une très faible induction de *p21* (x 1,3 en comparaison du contrôle) laisse supposer que le mécanisme d'induction de l'apoptose est *p53*-indépendant dans ce cas.

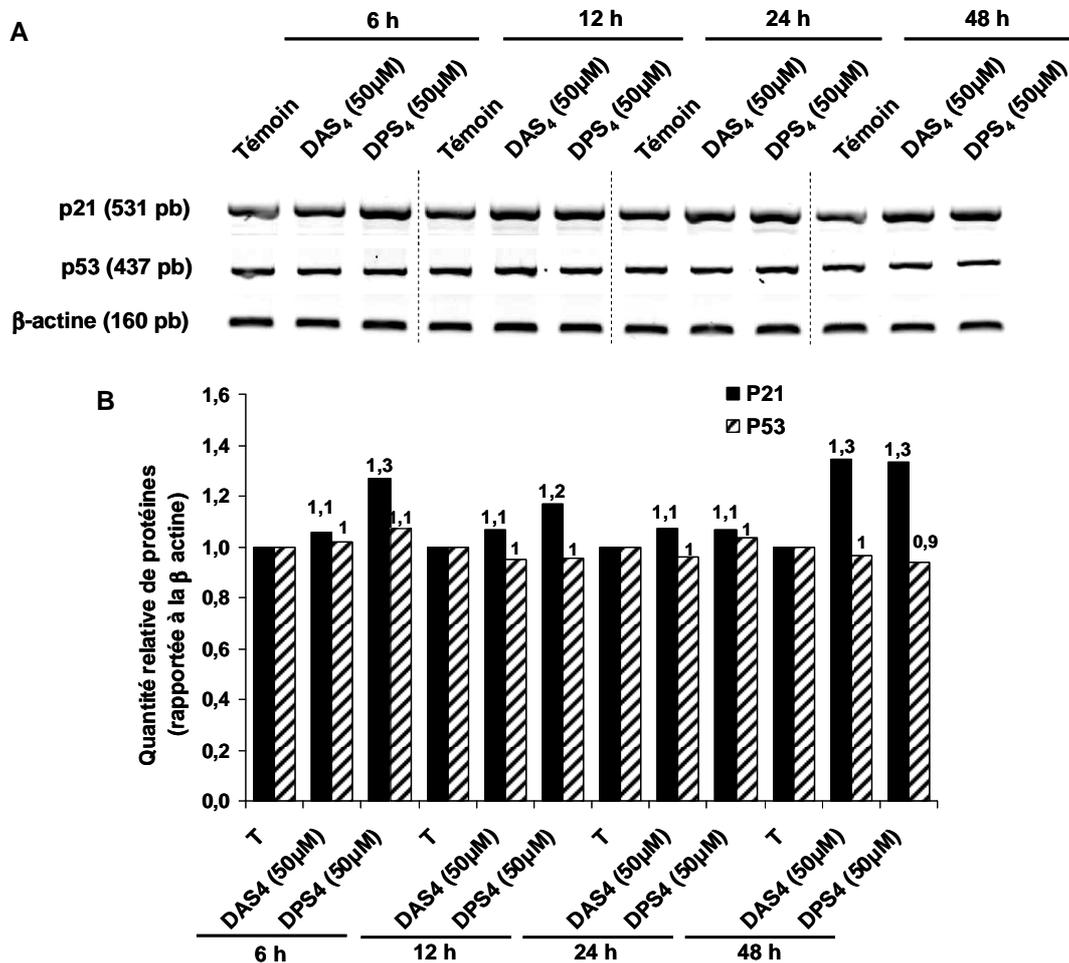


Figure 49 : Analyse RT-PCR du niveau de transcrits des gènes *p53* et *p21* des cellules MCF-7 traitées par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) pendant 6-48 h (A). La quantification des niveaux de transcrits est réalisée à l'aide du bioanalyseur ChemiDoc XRS, Bio-Rad (B).

Ces résultats indiquent que la mise en place du processus apoptotique dans les cellules MCF-7 implique la voie intrinsèque mitochondriale. Les composés **DAS₄** et **DPS₄** modulent l'activation de protéines de la famille Bcl-2 (Bax et Bcl-2) mais semblent agir selon un mécanisme qui est indépendant de l'expression de *p53*.

2.4.3 Implication du stress oxydant

Nous avons vu précédemment que la réactivité chimique des polysulfures dans les cellules pouvait conduire à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (cf. paragraphe **1.3.9. Composés naturels organosoufrés**). Ces espèces réactives vont pouvoir réagir avec différents constituants cellulaires (acides nucléiques, protéines, lipides, sucres...) et provoquer des dommages irréversibles qui vont conduire la cellule à entrer en apoptose. Ainsi, nous avons évalué si l'induction de l'apoptose des cellules MCF-7 était liée à la génération de ERO par les composés **DAS₄** et **DPS₄**. Le statut redox des cellules MCF-7 a été évalué par cytométrie en flux en utilisant le H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate) comme marqueur. Ces mesures ont permis de montrer qu'un traitement des cellules MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄** ne provoque pas d'augmentation significative de la production d'ERO (**figure 50**). Ces résultats suggèrent que l'action intracellulaire de ces composés est ERO-indépendante dans ce cas.

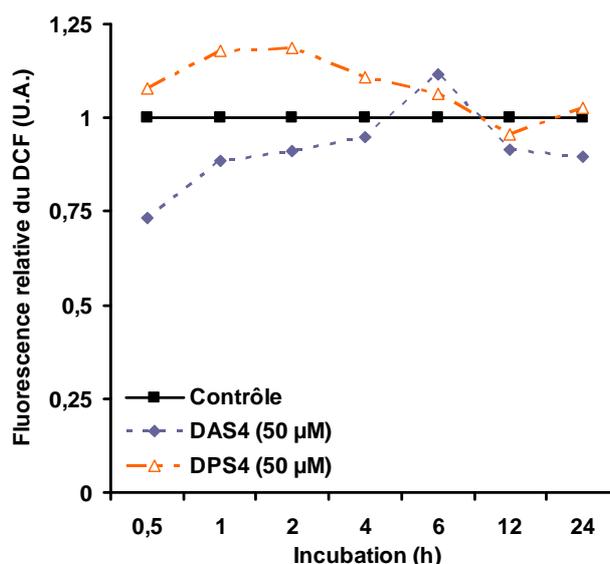


Figure 50 : Analyse par cytométrie en flux (marquage au H₂DCF-DA) du niveau intracellulaire en ERO après traitement des cellules MFC-7 pendant différents temps (30 min - 24 h) en présence de **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM).

2.5 Inhibition des phosphatases CDC25 dans les cellules MCF-7

Nous avons ensuite évalué si le blocage en G2/M, observé dans les cellules MCF-7 traitées par les composés **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM), était associé à une inhibition des phosphatases CDC25 dans les cellules. L'inhibition de ces enzymes peut être estimée

indirectement par western-blot car elle conduit à l'accumulation des formes phosphorylées inactives des Cdk. La **figure 51** indique que **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) conduisent à l'accumulation de pCdk1 (× 1,6 et 1,7 par rapport au contrôle, respectivement) et pCdk2 (× 2,1 et 2,5 par rapport au contrôle, respectivement) après un traitement court des cellules MCF-7 (6 h). Ces résultats sont en adéquation avec l'inhibition des phosphatases CDC25A et C observée sur les enzymes purifiées *in vitro* et concordent avec l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M reporté précédemment. Cependant, l'accumulation de pCdk1 et pCdk2 ne persiste pas pour des traitements de plus longues durées (> 12 h). Une diminution des pCdk1 et 2 est même observée à partir de 24 h de traitement ainsi qu'une altération du niveau protéique de Cdk1 après 48 h.

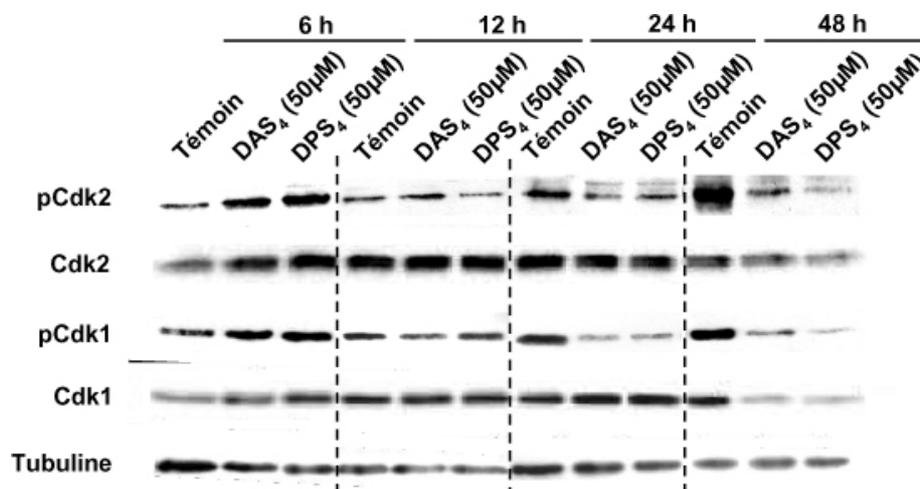


Figure 51 : Inhibition des phosphatases CDC25 dans les cellules MCF-7. Les cellules MCF-7 sont traitées pendant 6 – 48 h par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) puis les niveaux protéiques de Cdk1/2 et pCdk1/2 sont évalués par western-blot. La tubuline est utilisée comme contrôle. La quantification des niveaux protéiques est réalisée à l'aide du bioanalyseur ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

Ainsi, l'accumulation des formes phosphorylées inactives des Cdk semble corroborer l'hypothèse d'une inhibition directe de l'activité enzymatique des phosphatases CDC25A et C par les composés **DAS₄** et **DPS₄**. Cependant, cette inhibition de l'activité Cdk1 et 2 pourrait être également due à une diminution de l'abondance des CDC25 dans les cellules. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons évalué les niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) des trois isoformes de CDC25 dans les cellules MCF-7 après traitement par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM) (**figure 52**). Comme l'indique la **figure 52**, aucune modification significative des niveaux de transcrits et protéines n'est observé pour les isoformes A et B de CDC25. Concernant CDC25C, une diminution du niveau protéique apparaît à partir de 12 h et 24 h de traitement pour les variants C1 et C5, respectivement. Cette observation n'a pas pu

être associée à une réduction du niveau global de transcrite de CDC25C dans les cellules. Ainsi, ces résultats suggèrent l'implication de modifications post-traductionnelles qui pourraient expliquer la diminution protéique de CDC25C pour des traitements longs (> 12 h). C'est ce qu'ont montré Xiao *et al.* lors de l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans l'activité cytotoxique du composé **DAS₃** sur les lignées de cancer de la prostate PC-3 et DU145. Leurs résultats indiquent que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M observé est associé à une hyperphosphorylation de CDC25C sur la Ser216 et à une dégradation de la protéine (Xiao *et al.* 2005). Plus récemment, une étude de Busch *et al.* a également montré que l'activité antiproliférative des polysulfures **DAS₄** et **DPS₄** sur les cellules HCT116 (cancer du colon) était associée une diminution significative de la protéine CDC25C (Busch *et al.* 2010).

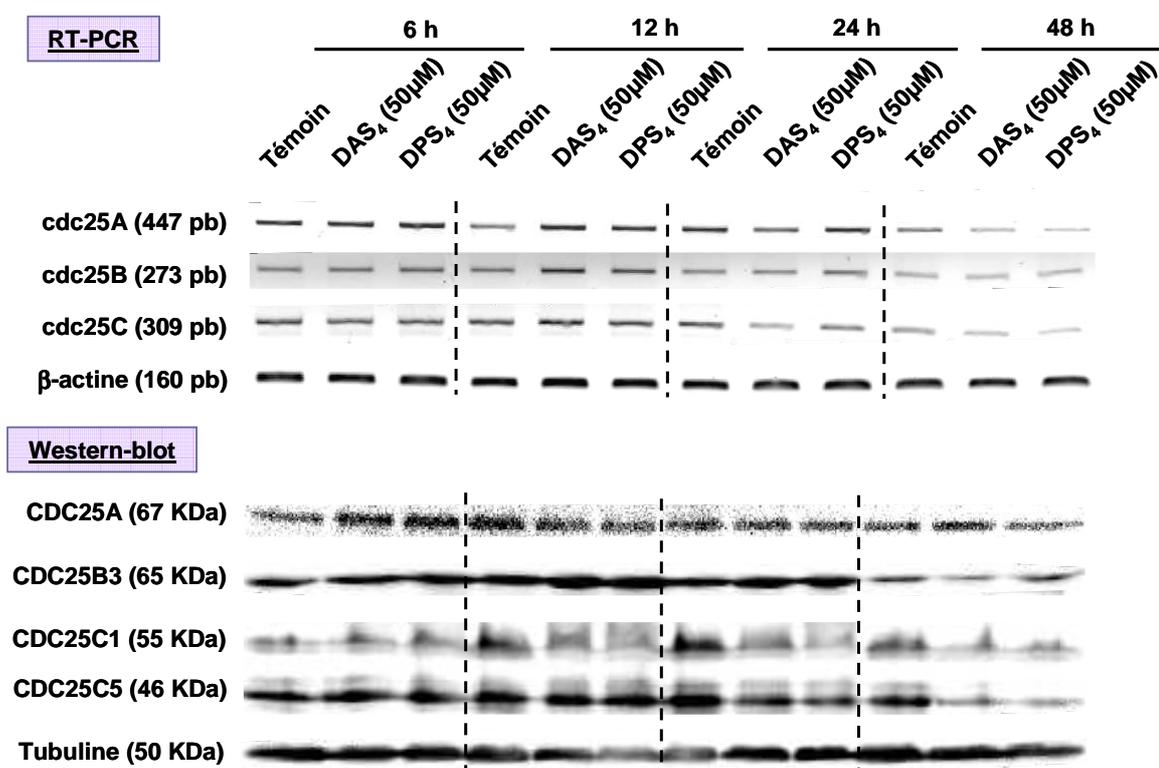


Figure 52 : Evaluation des niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) des phosphatases CDC25A, B et C dans les cellules MCF-7 traitées pendant 6 – 48 h par **DAS₄** et **DPS₄** (50 µM). La β -actine et la tubuline sont utilisées comme contrôles dans les expériences de RT-PCR et western-blot, respectivement.

Nous avons montré que les composés **DAS₄** et **DPS₄** induisent une rapide inactivation de Cdk1 et 2 qui sont présentes sous leur forme phosphorylée inactive dans les cellules MCF-7 après 6 h de traitement. De plus, aucune modification des niveaux protéiques de CDC25 n'est observée avant 12 h de traitement. Ces résultats confortent donc l'hypothèse d'une inhibition

directe de l'activité enzymatique des CDC25A et C dans les cellules MCF-7 pour des temps courts (< 12 h).

2.6 Conclusion

Ces résultats ont confirmé l'activité antiproliférative des deux tétrasulfures, qui ont été reportés comme inhibiteurs de CDC25A et C *in vitro*, sur des modèles cellulaires d'adénocarcinome mammaire humain sensibles (MCF-7 et MDA-MB-231) et résistant (Vcr-R). Les composés **DAS₄** et **DPS₄** sont capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M qui coïncide avec l'accumulation de pCdk1 et 2 après des traitements de courte durée (6 h). Des effets comparables ont déjà été reportés par Herman-Antosiewicz et Singh. après traitement de cellules de cancer humain de la prostate (PC-3) par un autre OSC, **DAS₃**. En effet, un traitement de courte durée (8 h) par 40 μ M de **DAS₃** induit une accumulation de pCdk1 dans ces cellules qui a pu être associée à l'activation de la kinase Chk1 et à un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Herman-Antosiewicz et Singh 2005). Comme nous l'avons observé, cette accumulation de Cdk1 sous sa forme inactive ne persiste pas avec le temps. Une explication à cette observation serait la possible réaction des OSC avec des thiols intracellulaires comme le GSH. En effet, nous avons vu précédemment que l'activité inhibitrice de ces composés vis-à-vis des phosphatases CDC25 pouvait être partiellement altérée *in vitro* en présence d'agents réducteurs comme le DTT ou le GSH. Cependant, les données actuelles de la littérature concernant la réactivité des polysulfures avec le GSH ne nous permettent pas de prédire à quelle vitesse ce phénomène peut intervenir dans les cellules.

De plus, nous avons constaté que l'inactivation de Cdk1 et 2 n'était pas associée à une diminution du niveau protéique des CDC25, et notamment de CDC25C, dans les cellules MCF-7 après 6 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄**. Contrairement à nos observations, plusieurs études ont reporté que l'arrêt du cycle cellulaire induit par les OSC était associé à l'inhibition de CDC25C par phosphorylation ainsi qu'à sa destruction ERO-dépendante. En effet, les OSCs agiraient en activant des voies de signalisation ATM/ATR, impliquant Chk1, et p38 MAPK qui contribuerait à la phosphorylation du résidu S216 de CDC25C créant ainsi un site de liaison à la protéine cytoplasmique 14-3-3 (Xiao *et al.* 2009, Yuan *et al.* 2003). Parallèlement à cela, Xiao *et al.* ont montré qu'un autre mécanisme d'inhibition de CDC25C, indépendant de sa phosphorylation, pouvait intervenir. En effet, leur étude de 2005 a révélé que la destruction protéique de CDC25C dans les cellules PC-3 et DU145 traitées par

DAS₃ était dépendante de la génération d'ERO comme O₂^{•-} et H₂O₂. Ceci a été confirmé par des expériences de préincubation en présence d'un antioxydant, la N-acétyl cystéine, qui ont permis de réduire significativement la dégradation de CDC25C dans les cellules traitées par **DAS₃**. Ces résultats suggèrent que les ERO peuvent exercer des modifications directes au niveau de la phosphatase CDC25C qui vont réduire sa stabilité (Xiao *et al.* 2009). Or, les travaux de Savitsky et Finkel ont conforté cette hypothèse. Ils ont montré que la dégradation de CDC25C induite par H₂O₂ dans les cellules HeLa était indépendante de la phosphorylation de CDC25C et de l'activation de Chk1. L'étude du mécanisme d'action, réalisé dans un système acellulaire, suggère que l'oxydation directe des Cys377 (cystéine catalytique) ou Cys330 de CDC25C par H₂O₂ contribuerait à l'instabilité de la protéine (Savitsky et Finkel 2002).

Ainsi, nous pouvons penser que l'absence de modification du niveau protéique de CDC25C dans les cellules MCF-7 peut s'expliquer par le fait que nous n'avons pas décelé de changement dans leur statut redox après 6 h de traitement par **DAS₄** et **DPS₄**. Ceci conforte donc l'hypothèse que l'inactivation de Cdk1 et 2, observée dans les cellules MCF-7 après 6h de traitement, serait due à l'inhibition directe de l'activité enzymatique des CDC25A et C par les composés **DAS₄** et **DPS₄**. Cependant, nous ne pouvons exclure l'implication des voies de signalisation ATM/ATR et p38 MAPK dans l'inhibition de l'activité de ces enzymes.

Néanmoins, d'autres mécanismes d'action, impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, ont été identifiés (pour des revues récentes voir Scherer *et al.* 2009 et Iciek *et al.* 2009). Notamment, Hosono *et al.* ont démontré, grâce à l'utilisation d'un modèle acellulaire *in vitro*, que le composé **DAS₃** inhibait la polymérisation de la tubuline. Une analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence que le **DAS₃** induit l'oxydation de deux résidus cystéine de la β-tubuline (Cys12 et 354) (Hosono *et al.* 2005). Enfin, il a également été montré que les OSCs pouvaient moduler la transcription de certain gène en augmentant l'acétylation des histones. Notamment, l'arrêt des cellules Caco-2 et HT-29 (cancers coliques) en phase G2/M après traitement par **DAS₂** a été associée à l'inhibition de l'activité histone déacétylase. Dans ce cas, l'hyperacétylation des histones induit l'expression de l'inhibiteur de Cdk, p21 (Druesne *et al.* 2004).

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que les composés **DAS₄** et **DPS₄** étaient capables d'induire l'apoptose des cellules MCF-7 sans perturber leur statut redox. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que la mitochondrie jouerait un rôle primordial dans le déclenchement du processus apoptotique. En effet, plusieurs études ont reporté que

l'induction de la voie de signalisation intrinsèque (mort cellulaire de type I), impliquant la mitochondrie, est le mode d'action privilégié des OSCs dans l'induction de l'apoptose. Ainsi, les marqueurs apoptotiques communément reportés sont la modulation des protéines de la famille Bcl-2 (Bax, Bak, Bid, Bcl-2, Bcl-xL...), la perméabilisation de la membrane mitochondriale avec relargage du cytochrome *c*, l'activation des caspases 3, 8 et 9... (pour des revues récentes voir Scherer *et al.* 2009 et Iciek *et al.* 2009). Pourtant, si le type de mort cellulaire est assez clairement établi, le rôle que jouent les ERO dans le déclenchement de l'apoptose reste encore contesté. De nombreuses études ont mis en évidence le lien existant entre l'induction du stress oxydant et l'apoptose des cellules traitées par les OSCs. Par exemple, une étude de Xiao *et al.* a montré que l'induction de l'apoptose de cellules de cancer de la prostate (PC-3 et DU145) traitées par le diallyl trisulfure (**DAS₃**) était étroitement liée à l'augmentation du niveau intracellulaire en ERO (Xiao *et al.* 2004). Néanmoins, l'induction du stress oxydant lors processus apoptotique n'est pas systématique. En effet, il semble que la génération de ERO soit étroitement associée au type cellulaire étudié. Ainsi, comme nous venons de le décrire dans le cas des cellules MCF-7, Cerella *et al.* ont montré que l'induction de l'apoptose des cellules U937 traitées par **DAS₄** est indépendante de la génération de ERO (Cerella *et al.* 2009).

3 Validation de la cible pharmacologique

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une approche inédite au laboratoire d'inhibition post-transcriptionnelle des phosphatases CDC25. Ces expériences d'inhibition viennent en complément des études réalisées à l'aide des deux inhibiteurs chimiques, **DAS₄** et **DPS₄**. En effet, après avoir identifié les deux isoformes de CDC25 affectées par ces composés (CDC25A et C) et étudié leurs effets cellulaires, nous avons voulu vérifier l'impact de l'inhibition spécifique de ces deux phosphatases dans les cellules MCF-7. Dans cet objectif, nous avons choisi d'inhiber l'activité des phosphatases CDC25A et/ou C à l'aide de petits ARN interférents spécifiques de chaque isoforme (siRNA). Nous avons étudié les impacts cellulaires de l'inhibition post-transcriptionnelle de CDC25A, C et A+C sur les cellules MCF-7 en réalisant les mêmes tests que pour l'inhibition chimique (prolifération cellulaire, analyse du cycle, induction de l'apoptose). La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour l'inhibition chimique devrait nous permettre de mieux définir la ou les cibles intracellulaires des inhibiteurs chimiques testés.

3.1 Validation de la transfection des cellules MCF-7 par les siRNA

Pour ces expériences d'inhibition post-transcriptionnelle, nous avons utilisé des mélanges commerciaux contenant 4 séquences d'ARN interférent spécifiques de CDC25A et C (SmartPool siRNA, Dharmacon). Parallèlement à cela, différents contrôles ont été effectués : un contrôle positif de transfection grâce à l'utilisation de 5 nM de siRNA MAPK1 (Qiagen) et des contrôles négatifs en présence d'agent de transfection seul (0,2 % v/v) et de 5 nM d'un siRNA ne possédant pas de cible cellulaire (« scramble siRNA », Qiagen).

Dans un premier temps, nous avons déterminé l'efficacité de transfection des cellules MCF-7 en suivant l'évolution des niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) après différents temps d'exposition en présence des siRNA CDC25A et C. Ces essais préliminaires vont nous permettre de déterminer la durée de transfection optimale pour avoir une extinction de CDC25A et C de manière à pouvoir réaliser des co-transfections avec ces deux siRNA. Les résultats présentés en **figure 53** indiquent que dès 24 h de transfection nous obtenons une diminution des transcrits de CDC25A et C. Pour CDC25C, cette diminution du niveau global de transcrits est associée à une réduction significative des niveaux des protéines C1 et C5. Cependant, aucune modification du niveau protéique de CDC25A n'a pu être reportée. Ceci paraît assez surprenant car l'extinction des transcrits de CDC25A est complète et effective dès 24 h de transfection. De plus, après 48 h de transfection, le pool protéique préexistant de CDC25A devrait être dégradé car cette protéine est connue pour être extrêmement labile. Ainsi, l'inhibition de la synthèse *de novo* de CDC25A devrait suffire à éteindre complètement cette protéine. Cependant, des études ont montré que la stabilité de CDC25A pouvait être augmentée dans certain type cellulaire, et notamment dans les cellules MCF-7. Cette augmentation de la demi-vie de CDC25A a été associée à des modifications post-traductionnelles qui réduiraient notamment la protéolyse ubiquitine-dépendante de CDC25A. Cependant, la demi-vie de CDC25A ne dépasserait pas 15-30 min dans les cellules MCF-7 en conditions normales (Löffler *et al.* 2003). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, il est difficile de savoir si nous avons réellement inhibé CDC25A ou si l'absence de variation pourrait être due à un manque de spécificité de l'anticorps anti-CDC25A utilisé. Malgré tout, pour la suite de nos expériences, nous avons choisi une durée de transfection de 48 h qui permet d'inhiber significativement CDC25C.

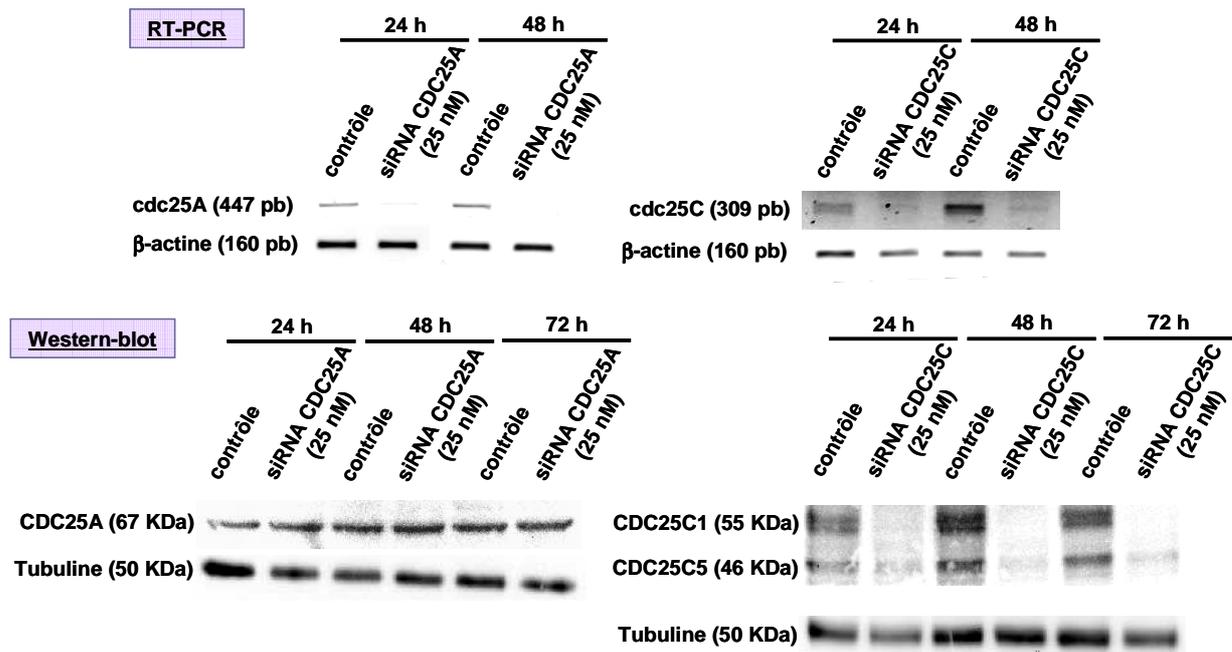


Figure 53 : Evaluation des niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) des phosphatases CDC25A et C après transfection des cellules MCF-7 avec des siRNA CDC25A et C (25 nM) pendant différents temps (24 - 72 h).

Dans un second temps, des essais complémentaires ont été réalisés en présence des différents contrôles et de l'association des siRNA CDC25A et C. Les cellules MCF-7 ont été transfectées pendant 48 h et les niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) des différentes cibles cellulaires ont été évalués (**figure 54**). Une coloration des membranes de nitrocellulose au rouge Ponceau a été réalisée pour vérifier l'homogénéité des dépôts protéiques car nous avons noté que le niveau protéique de la tubuline, qui est la protéine de référence couramment utilisée au laboratoire, pouvait être altéré dans des conditions fortement cytotoxiques.

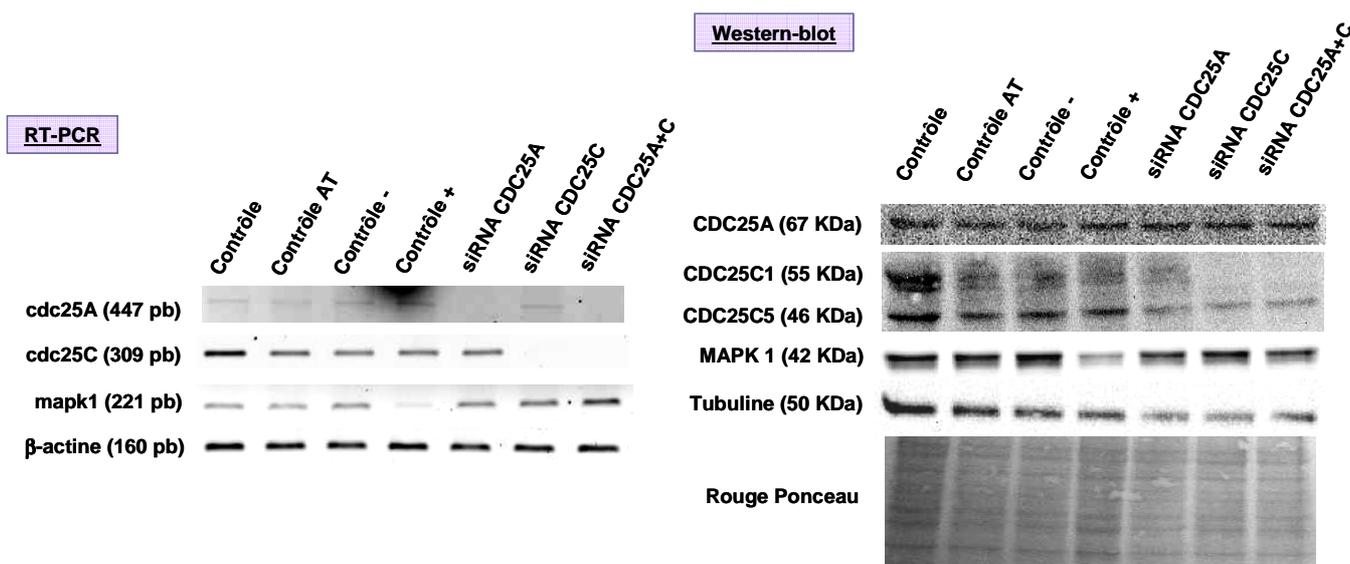


Figure 54 : Evaluation des niveaux de transcrits (RT-PCR) et de protéines (western-blot) des différentes cibles étudiées (MAPK 1, CDC25A et C) après transfection des cellules MCF-7 pendant 48 h.

Nous avons validé l'efficacité de la transfection des cellules MCF-7 grâce à l'utilisation du contrôle + (siRNA MAPK1) qui induit une diminution des niveaux de transcrit et de protéine correspondants. L'inhibition des CDC25A et/ou C a été validée au niveau transcriptionnel car l'utilisation des siRNA CDC25A et/ou C permet de réduire significativement les niveaux des transcrits correspondants. L'analyse des niveaux protéiques par western-blot permet de valider l'extinction de CDC25C dans le cas d'une transfection simple et d'une co-transfection avec le siRNA CDC25A. Cependant, nous avons également constaté une légère altération de CDC25C dans les autres conditions de transfection (contrôles AT, - et +, siRNA CDC25A) qui pourrait être consécutive à l'activité cytotoxique induite par l'agent de transfection. Par contre, comme décrit précédemment, aucune modification du niveau protéique de CDC25A n'a pu être reportée en western-blot.

3.2 Etude de la prolifération cellulaire

Nous avons étudié les effets de l'inhibition des phosphatases CDC25A, C et A+C sur la prolifération des cellules MCF-7. Les cellules sont transfectées pendant différents temps (24 – 96 h) et le suivi de la croissance est effectué grâce à l'utilisation du test MTT (Mosmann 1983).

Comme l'indique la **figure 55**, l'inhibition des phosphatases CDC25 induit une diminution de la croissance des cellules MCF-7 (survie cellulaire = 49 %, 47 % et 43 % du contrôle après 96 h de transfection avec les siRNA CDC25A, C et A+C, respectivement). Ces résultats semblent suggérer que l'inhibition de CDC25A est tout de même effective car les effets observés sur la croissance des cellules MCF-7 sont significativement différents que ceux obtenus pour les différents contrôles. Nous pouvons également noter que la présence d'agent de transfection seul (0,2 % v/v) induit une légère cytotoxicité (85 % de survie cellulaire par rapport au contrôle).

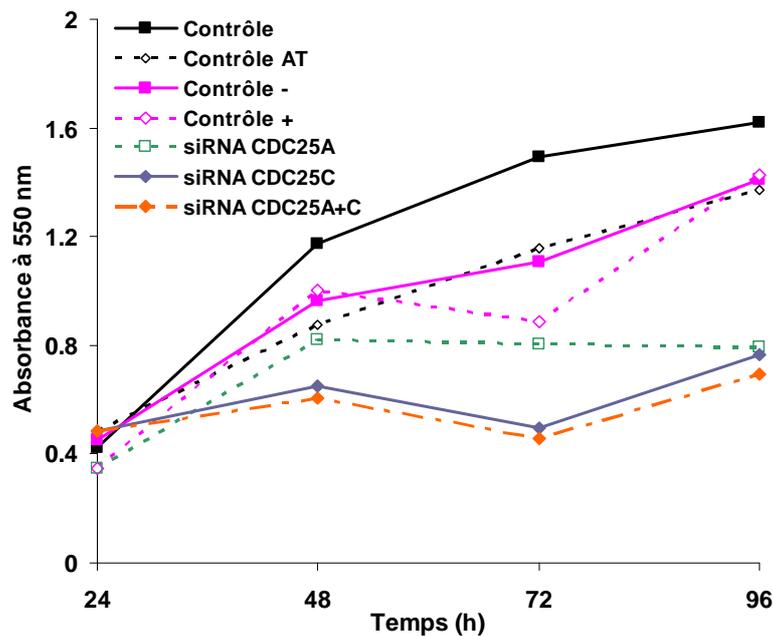


Figure 55 : Effets de l'inhibition post-transcriptionnelle des phosphatases CDC25A, C et A/C sur la croissance des cellules MCF-7. Les cellules sont transfectées avec 5 nM de « scramble siRNA » (contrôle -), 5 nM de siRNA MAPK1 (contrôle +), 25 nM de siRNA CDC25A, 25 nM de siRNA CDC25C et 25 nM de siRNA CDC25A + 25 nM de siRNA CDC25C pendant différents temps (24 - 96 h). En parallèle, deux contrôles négatifs sont réalisés : cellules MCF-7 non traitées (contrôle) et en présence d'agent de transfection seul (contrôle AT). La viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT.

Des observations microscopiques ont été réalisées après 48 h de transfection des cellules MCF-7 avec les différents siRNA testés (**figure 56**). Dans la boîte contrôle, les cellules MCF-7 adhèrent au support par des prolongements cellulaires et se regroupent sous forme de « colonie ». Dans les boîtes contrôle AT et contrôle -, nous pouvons déjà noter la présence de quelques cellules mortes en suspension. Enfin, l'observation des boîtes transfectées avec les siRNA MAPK1 (contrôle +), CDC25A, C et A+C, indique clairement une diminution de la proportion de cellules MCF-7 adhérentes au profit d'une augmentation importante du nombre de cellules en suspension.

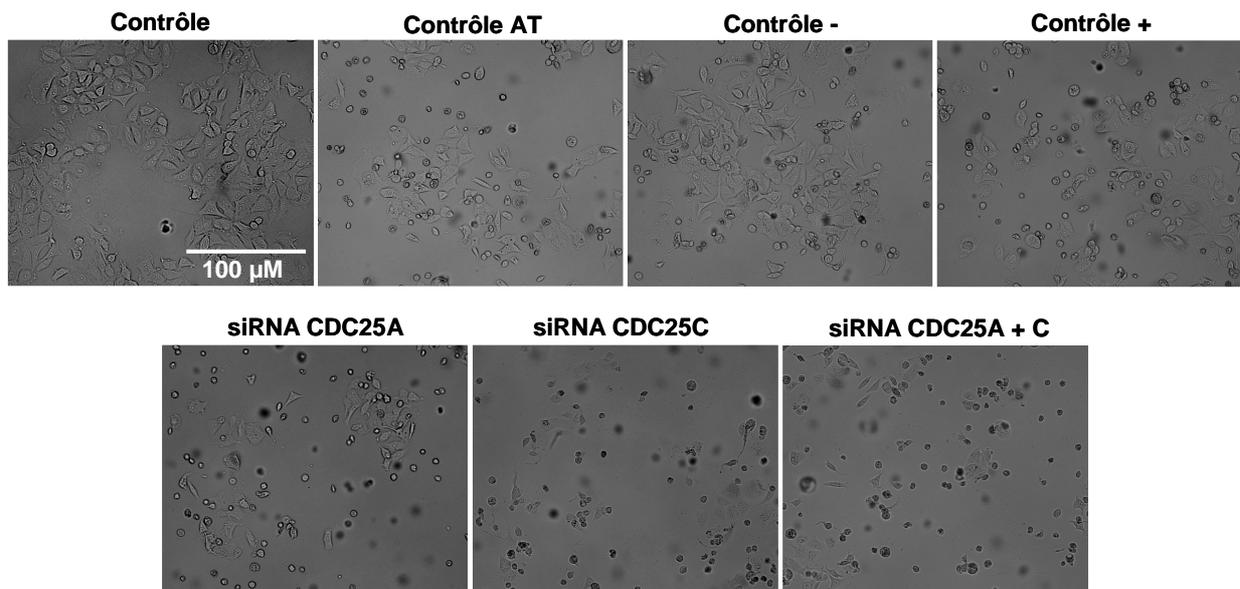


Figure 56 : Observation microscopique des cellules MCF-7 (contrôle), en présence d'agent de transfection seul (contrôle AT) et transfectées avec différents siRNA (5 nM de siRNA contrôle -, 5 nM de siRNA MAPK1, 25 nM de siRNA CDC25A, 25 nM de siRNA CDC25C et 25 nM de siRNA CDC25A + 25 nM de siRNA CDC25C) pendant 48 h.

Nous avons montré que l'inhibition post-transcriptionnelle de CDC25A et/ou C altère la prolifération des cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7 (inhibition de l'ordre de 50 % par rapport au contrôle). Ainsi, nous avons entrepris d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués, notamment au niveau de la régulation du cycle cellulaire et de l'induction de l'apoptose.

3.3 Analyse du cycle cellulaire

Afin d'évaluer l'impact de l'inhibition des phosphatases CDC25A et/ou C sur la répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle cellulaire, nous avons réalisé l'analyse du cycle en cytométrie en flux après marquage des cellules à l'iodure de propidium.

Comme le montre la **figure 57**, la répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle n'est pas significativement affectée après inhibition des phosphatases CDC25C et A+C. Seule une légère induction de la proportion des cellules en phase G2/M est observée après transfection des cellules MCF-7 avec le siRNA CDC25A.

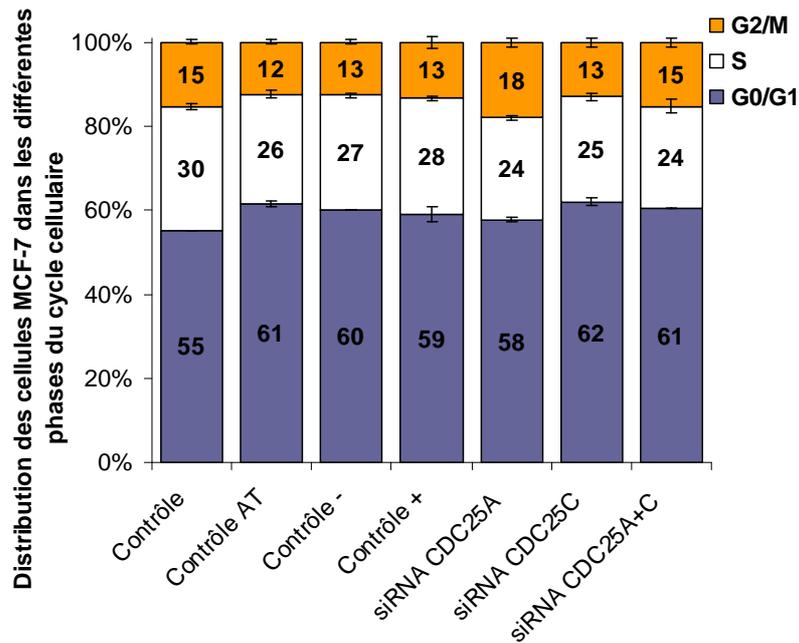


Figure 57 : Analyse de la répartition des cellules MCF-7 dans les différentes phases du cycle après 48 h de transfection avec les différents siRNA testés. Trois essais indépendants ont été réalisés pour chaque condition.

Etant donné le rôle primordial de CDC25A et C, aussi bien lors de l'entrée en mitose que lors du passage en phase S, nous nous attendions à ce que l'inhibition de l'une ou l'autre des isoformes induise des perturbations du cycle des cellules MCF-7. Notamment, Turowsky *et al.* ont montré que l'inhibition spécifique de CDC25A ou C inhibait la synthèse d'ADN dans des cellules HeLa transfectées pendant 24 h avec des siRNA spécifiques de chaque isoforme (Turowsky *et al.* 2003). Plus récemment, Pereg *et al.* ont montré que l'inhibition de CDC25A altère la prolifération de cellules U2-OS (ostéosarcome) et est associée à un arrêt de la synthèse d'ADN et à une perturbation de la transition G2/M dans les cellules préalablement synchronisées par le nocodazole (Pereg *et al.* 2010). Les résultats que nous avons obtenus sont assez surprenants mais il est important de noter que nos essais ont été réalisés sur des cellules MCF-7 asynchrones après 48 h de transfection. A partir de cet essai préliminaire, il paraît difficile d'évaluer l'implication de CDC25A et C dans la régulation du cycle cellulaire des cellules MCF-7. Ce travail nécessiterait la réalisation d'une cinétique de transfection ainsi que l'utilisation d'une technique de synchronisation cellulaire

3.4 Induction de l'apoptose

Dans la mesure où les phosphatases CDC25 jouent un rôle clé lors du processus apoptotique, nous avons recherché si l'inhibition des isoformes A et/ou C était capable d'induire la mort cellulaire programmée des cellules MCF-7. La mise en évidence de l'apoptose a été réalisée à l'aide d'une seule technique : le clivage de la PARP (Poly-(ADP-ribose) polymérase). L'analyse en western-blot présentée dans la **figure 58** révèle, de manière surprenant, que l'inhibition des phosphatases A, C et A+C altère la mise en place du processus apoptotique. En effet, le fragment clivé de la PARP (85 KDa) apparaît clairement dans les différents contrôles de transfection (contrôle AT, contrôle - et contrôle +) qui est probablement due à l'activité cytotoxique de l'agent de transfection utilisé. Par contre, le clivage de la PARP est peu visible après extinction des CDC25A et/ou C dans les cellules MCF-7. Cette observation ne semble pas relier à un défaut d'homogénéité des dépôts protéiques comme l'indique la coloration des membranes de nitrocellulose au rouge Ponceau. Ceci suggère que l'extinction de CDC25A et/ou C réduirait l'apoptose des cellules MCF-7 induite par l'agent de transfection.

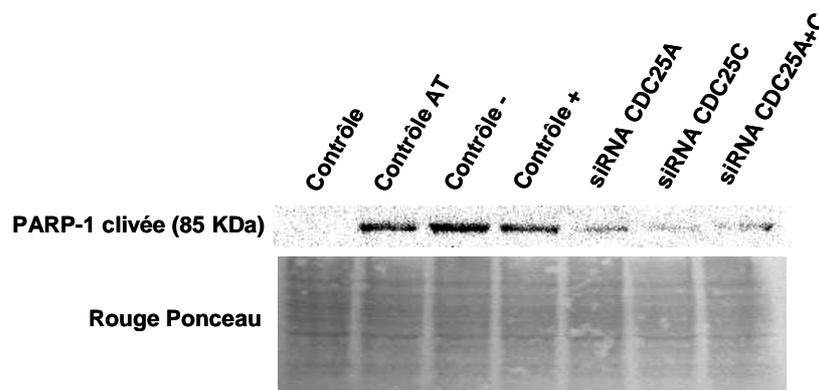


Figure 58 : Etude du clivage de la PARP-1 en western-blot après transfection des cellules MCF-7 avec l'agent de transfection seul (contrôle AT), 5 nM de « scramble siRNA » (contrôle -), 5 nM de siRNA MAPK1 (contrôle +), 25 nM de siRNA CDC25A, 25 nM de siRNA CDC25C et 25 nM de siRNA CDC25A + 25 nM de siRNA CDC25C pendant 48 h.

De tels effets ont récemment été reportés par Chou *et al.* en 2010. En effet, ils ont montré l'extinction de CDC25A dans les cellules Jurkat (lymphome), par l'utilisation de siRNA spécifique, réduisait significativement l'induction de l'apoptose par la staurosporine. De plus, des expériences réalisées sur des cellules non transfectées indiquent que l'apoptose induite par la staurosporine fait intervenir le clivage de CDC25A et conduit à la formation d'un fragment C-terminal de 37 KDa possédant une activité pro-apoptotique. Ainsi, lors du processus

apoptotique, les auteurs observent une diminution de la protéine complète (67 KDa) au profit de l'apparition du fragment C-terminal de 37 KDa (Chou *et al.* 2010). Cependant, lors de nos expériences, aucune condition de transfection ne nous a permis d'observer de modification du niveau de CDC25A malgré l'utilisation d'un anticorps reconnaissant l'extrémité C-terminal de la protéine. Concernant la phosphatase CDC25C, aucune étude à ce jour n'a reporté une potentielle activité pro-apoptotique de la protéine. Pour vérifier l'implication d'une activité pro-apoptotique de CDC25A et C, nous pourrions également, comme Chou *et al.*, étudier les effets de l'induction de l'apoptose par un agent cytotoxique dans les cellules MCF-7 transfectées ou non avec les siRNA CDC25A et/ou C.

3.5 Inhibition post-transcriptionnelle vs inhibition chimique de CDC25A et C

Nous avons suggéré précédemment que l'inhibition chimique de l'activité des phosphatases CDC25A et C par deux tétrasulfures naturellement présent dans l'ail et l'oignon, **DAS₄** et **DPS₄**, pouvait être responsable de leur activité antiproliférative vis-à-vis de la lignée d'adénocarcinome mammaire MCF-7. Ces effets ont pu être associés à un blocage du cycle cellulaire en G2/M ainsi qu'à l'induction de l'apoptose de ces cellules.

De plus, nos expériences d'inhibition spécifique des phosphatases CDC25A et C par l'utilisation des petits ARN interférents (siRNA) ont conduit également à une altération de la prolifération des cellules MCF-7. Dans les conditions testées, aucune modification du cycle cellulaire n'a été rapportée et ces inhibitions spécifiques n'ont pas permis d'induire une apoptose accrue des cellules MCF-7. Cependant, nous ne sommes pas certains d'avoir inhibé complètement CDC25A et cette étude, très préliminaire, nécessite encore d'être approfondie. Ainsi, il est difficile de conclure quant à l'impact cellulaire de l'inhibition de CDC25A et C dans les cellules MCF-7.

L'objectif premier de l'utilisation de deux techniques d'inhibition des phosphatases CDC25A et C était de pouvoir comparer les effets obtenus suite à leurs inhibitions spécifique par siRNA et chimique par **DAS₄** et **DPS₄**. Ainsi, l'observation d'effets comparables aurait conforté l'hypothèse que l'inhibition de CDC25A et C est un des mécanismes par lequel **DAS₄** et **DPS₄** exercent leur activité antiproliférative vis-à-vis des cellules MCF-7. Cependant, les quelques résultats obtenus en réalisant l'inhibition post-transcriptionnelle des CDC25A et C ne nous permettent ni d'infirmer ni de confirmer cette hypothèse.

De plus, plusieurs limites à la comparaison de ces deux approches sont apparues. D'une part, ces deux techniques ne nous permettent pas d'effectuer des comparaisons en terme d'amplitude et de cinétique d'inhibition. En effet, les mécanismes d'inhibition impliqués sont très différents dans le cas des deux techniques. L'inhibition chimique de l'activité enzymatique par les composés **DAS₄** et **DPS₄** semble s'exercer rapidement (< 6 h d'après les résultats obtenus précédemment) contrairement à l'inhibition post-transcriptionnelle qui nécessite d'attendre l'arrêt de la synthèse *de novo* des protéines. De plus, l'amplitude de l'inhibition chimique est difficilement quantifiable dans les cellules. Ainsi, l'inhibition partielle ou totale des CDC25A et C n'induit probablement pas les mêmes effets cellulaires en terme d'intensité et de cinétique d'action. D'autre part, nous ne pouvons exclure que la présence « physique » des protéines ait un rôle à jouer dans la mise en place certains évènements cellulaires. Ceci a été montré pour CDC25A notamment, dont la présence et le clivage favorisent l'entrée des cellules Jurkat en apoptose (Chou *et al.* 2010). Ainsi, l'absence des protéines au sein des cellules lors de l'inhibition post-transcriptionnelle de CDC25A et C pourrait perturber la mise en place de certains évènements cellulaires.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours des dernières années, de nombreuses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire sont apparues comme des cibles de choix dans le cadre du développement de nouvelles molécules utilisables en chimiothérapie. Les phosphatases CDC25, de par leurs fonctions, sont apparues comme des candidats intéressants. Dans ce contexte, l'un des objectifs de notre travail était de mettre en évidence une structure inhibitrice des phosphatases CDC25 et d'en étudier les mécanismes d'action cellulaires sur différentes lignées d'adénocarcinome mammaire humain.

Dans un premier temps, la recherche de nouvelles molécules inhibitrices des phosphatases CDC25 a nécessité la constitution de stocks protéiques des trois isoformes de CDC25 humaines purifiées (A, B et C). Parallèlement à cela, nous avons réalisé l'optimisation de la mesure de l'activité phosphatase *in vitro* par une technique fluorimétrique. Ces outils nous ont permis de tester l'efficacité de différentes molécules susceptibles d'exercer une activité inhibitrice vis-à-vis des CDC25 et d'en évaluer la spécificité d'action.

Un travail préliminaire de criblage de différentes classes de molécules potentiellement inhibitrices a mené à l'identification de substances naturelles actives. Ces molécules sont des composés organosoufrés retrouvés à l'état naturel dans deux types de plantes herbacées, l'ail (*Allium sativum*) et l'oignon (*Allium cepa*). Nous avons montré que l'activité inhibitrice des composés organosoufrés testés augmentait avec le nombre d'atomes de soufre présents dans la molécule. Ainsi, les deux composés les plus actifs, **DAS₄** (diallyl tétrasulfure) et **DPS₄** (dipropyl tétrasulfure), ont été choisis pour une évaluation plus complète de leur activité. Les résultats obtenus indiquent que ces deux tétrasulfures agissent comme des inhibiteurs irréversibles des phosphatases CDC25A et C *in vitro* (CI₅₀ de l'ordre de 16 μM et 1 μM, respectivement) alors que le domaine catalytique de l'isoforme B est moins sensible (CI₅₀ > 100 μM). Afin d'appréhender plus précisément la surprenante spécificité d'action de ces inhibiteurs, il serait intéressant d'évaluer leur potentiel vis-à-vis de l'isoforme complète de CDC25B et des sites catalytiques des isoformes A et C. En effet, la capacité de ces composés à réagir avec les thiols protéiques nous laissait penser que ces derniers agissaient avec la cystéine catalytique présente au niveau du site actif des phosphatases CDC25. Or, le domaine catalytique de ces enzymes est une région hautement conservée et il paraît assez surprenant que l'activité de CDC25B ne soit pas altérée. Or, nous disposons des formes complètes de CDC25A et C et uniquement du site catalytique de l'isoforme B. Ces résultats suggèrent donc que l'action de **DAS₄** et **DPS₄** pourraient faire intervenir d'autres sites que le site catalytique de l'enzyme.

L'activité antiproliférative des deux tétrasulfures a été confirmée sur des modèles cellulaires d'adénocarcinome mammaire humain sensibles (MCF-7 et MDA-MB-231) et résistants à différents agents anticancéreux (Vcr-R). Cette altération de la croissance des cellules a pu être associée à l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M. Ce blocage concorde avec l'accumulation de pCdk1 et 2 observée après des traitements de courte durée (6 h) des cellules MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄**. Bien que ces observations soient en adéquation avec l'inhibition des phosphatases CDC25A et C observée sur les enzymes purifiées *in vitro*, cette technique d'évaluation indirecte de l'activité CDC25 dans les cellules permet de consolider notre hypothèse. Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'effectuer une mesure directe de l'activité CDC25 en fluorimétrie après immuno-précipitation des enzymes suite au traitement des cellules MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄**.

Par ailleurs, une induction de l'apoptose des cellules MCF-7 a également été reportée en l'absence de toute perturbation du statut redox. Une analyse plus précise des mécanismes moléculaires impliqués suggère que la mitochondrie et les protéines de la famille Bcl-2 pourraient jouer un rôle primordial dans le déclenchement du processus apoptotique suite au traitement des cellules MCF-7 par **DAS₄** et **DPS₄**.

Afin de mieux appréhender la sélective d'action de ces inhibiteurs vis-à-vis de cellules cancéreuses, il aurait été intéressant de pouvoir compléter cette étude en testant l'activité de ces composés sur un modèle de cellules saines. Bien que nous disposions au laboratoire d'une lignée épithéliale mammaire non tumorale immortalisée par la télomérase, l'utilisation de celle-ci n'est pas parue très judicieuse dans le cadre d'une étude du cycle cellulaire car la capacité de ces cellules à se multiplier a été modifiée.

L'ensemble des résultats obtenus lors de la caractérisation des tétrasulfides **DAS₄** et **DPS₄** suggèrent que l'inhibition des phosphatases CDC25A et C serait un des mécanismes qui contribuerait à l'activité anticancéreuse de ces composés.

D'autre part, ce projet a permis la mise en place d'une approche, inédite au laboratoire, d'inhibition post-transcriptionnelle des phosphatases CDC25A et C à l'aide de petits ARN interférents. L'étude de l'impact cellulaire de l'inhibition spécifique de CDC25A et/ou C reste encore trop préliminaire pour pouvoir préciser le rôle de chaque isoforme dans la lignée MCF-7. De nombreuses interrogations persistent encore qu'en à la possibilité d'effectuer un parallèle entre les résultats obtenus après inhibition post-transcriptionnelle et chimique des phosphatases CDC25A et C.

Pour la suite de ce projet, il paraît essentiel de poursuivre la recherche de nouveaux inhibiteurs en utilisant des approches « raisonnées » comme le criblage *in silico* par exemple. Les données issues de la littérature ainsi que les résultats des criblages réalisés au laboratoire pourraient servir de point de départ à la mise en place de cette approche.

De plus, les résultats d'inhibition encourageant obtenus avec les composés organosoufrés ont permis d'identifier que la présence d'une chaîne polysoufrée pouvait être potentiellement intéressante dans le cas d'inhibiteur de CDC25. Ainsi, des modifications chimiques autour de cette partie active pourraient être envisagées en vue d'améliorer l'efficacité de ces composés.

D'autre part, il semble également important d'envisager l'utilisation des inhibiteurs de CDC25 en complément d'agents chimiothérapeutiques conventionnels (anthracyclines, cisplatine, taxanes...) plutôt qu'en utilisation seule. En effet, l'intérêt de tels inhibiteurs porte aussi sur le fait qu'ils pourraient potentialiser les effets de molécules classiquement utilisées en thérapeutique. Ceci peut être réalisé en évaluant les effets d'association d'inhibiteurs de CDC25 et de différents agents cytotoxiques sur des cellules cancéreuses en culture.

Enfin, pour les inhibiteurs de CDC25 présentant le potentiel le plus prometteur, il sera envisagé d'étudier leur activité *in vivo* en évaluant notamment leur capacité à altérer la croissance de tumeurs humaines xénogreffées chez la souris nude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1 Production des phosphatases CDC25 purifiées et mesure d'activité *in vitro*

1.1 Expression et purification des protéines de fusion GST-CDC25A, B et C

Les bactéries utilisées sont de la souche BL21 (DE3) pLys S de *Escherichia coli*. Leur phénotype est le suivant : BF⁻, dcm, cmpT, hsdS (r_B-, m_B-), gal λ (DE3), [pLysS Cam^r]. Ces cellules offrent la propriété d'être facilement transformables, même par de grands plasmides, avec une stabilité satisfaisante de l'ADN étranger, tout en permettant la sélection des colonies. Les cellules BL21 sont habituellement cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) [Bacto-tryptone 10 g/L, extrait Bacto-yeast 5 g/L, NaCl 10 g/L (pH = 7,0 avec NaOH)], contenant 100 mg/L d'ampicilline pour maintenir le plasmide.

Les gènes CDC25A, B et C sont intégrés dans le plasmide pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech, **figure 57**). Les séquences codant la forme complète des isoformes A et C sont intégrées au plasmide alors que seule la séquence codant le site catalytique de CDC25B est présente. Les bactéries transformées vont ensuite pouvoir être sélectionnées grâce à la résistance à l'ampicilline qui leur est conférée.

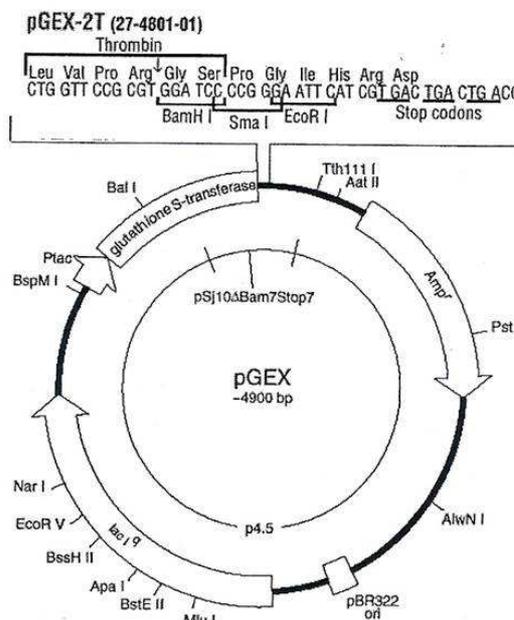


Figure 57 : Carte de restriction et caractéristiques principales du vecteur pGEX-2T

1.1.1 Préparation des cellules compétentes

Une culture de bactéries BL21 (6 mL), en phase exponentielle de croissance ($A_{600} \sim 0,4$), est arrêtée en la plongeant dans la glace pendant 10 min. Les cellules sont sédimentées par centrifugation à froid à $1\ 500\times g$, puis remises en suspension dans 2,4 mL d'une solution froide de CaCl_2 (50 mM). Après incubation 10 min à 0°C , les cellules sont centrifugées à nouveau, avant d'être remises en suspension dans 240 μL de la solution froide de CaCl_2 (50 mM). Cette suspension est ensuite distribuée par fraction de 120 μL dans des microtubes, puis congelée immédiatement dans l'azote liquide. Les cellules conservent ainsi leur compétence pendant plusieurs mois.

1.1.2 Transformation des cellules compétentes

20 ng de plasmide circulaire sont ajoutés à la suspension de cellules compétentes. Le mélange est homogénéisé doucement puis placé dans la glace. Après 30 min d'incubation, la suspension est placée pendant 90 s à 42°C , puis aussitôt replonger dans la glace pendant 5 min. 300 μL de milieu SOB [Bacto-tryptone 20 g/L, extrait Bacto-yeast 5 g/L, NaCl 0,5 g/L (pH = 7,0 avec NaOH), 10 mM MgCl_2 , 20 mM de glucose], contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline pour maintenir le plasmide, est inoculé avec un clone de cellules transformées avec le plasmide pGEX-CDC25. La préculture est incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation.

1.1.3 Cultures bactériennes

- Préculture

Du milieu LB (3 mL), contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, est inoculé avec un clone bactérien transformé avec le vecteur plasmidique permettant d'exprimer les protéines GST-CDC25. La préculture est incubée pendant une nuit sous agitation à 37°C .

- Culture d'expression

Un litre de milieu LB, contenant 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ampicilline, est inoculé avec la préculture. Cette culture est incubée sous agitation à 37°C jusqu'à atteindre une absorbance à 600 nm supérieure 0,4. A ce moment, l'expression des protéines de fusion GST-CDC25 est induite par addition d'IPTG (Isopropyl-thio- β -galactoside). Cette étape d'induction est réalisée

pendant 5 h, sous agitation à 30°C en présence de 0,5 mM d'IPTG. Enfin, les bactéries sont récupérées sous forme de culot après centrifugation à $3\,000 \times g$, 15 min, 4°C. Les culots bactériens sont conservés à -80°C jusqu'à l'extraction.

1.1.4 Extraction des protéines de fusion GST-CDC25

Les homogénats cellulaires sont obtenus après incubation des bactéries dans du tampon de lyse [Tris 50 mM, NaCl 250 mM, EDTA 1 mM, PMSF 0,1 mM, Triton X-100 0,1 % (v/v), 3 % de cocktail d'antiprotéases (Sigma-Aldrich)] pendant 30 min à 4°C puis sonication (5×30 s, sonicateur Vibra-cell, Bioblock, puissance 50). Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à $25\,000 \times g$, 45 min, 4°C. Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C jusqu'à la purification.

1.1.5 Purification des GST-CDC25

La protéine de fusion est purifiée par chromatographie d'affinité sur un gel de GSH-agarose (Sigma-Aldrich). Après équilibration de la colonne de GSH-agarose avec du tampon de lyse, l'extrait bactérien est incubé pendant 3 h à 4°C. La colonne est ensuite lavée avec 5 volumes de tampon de lyse puis 5 volumes de tampon Tris A pH 8,2 [Tris 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, DTT 1mM]. La protéine de fusion est éluée par addition de 20 mM de glutathion réduit dans du tampon Tris A. L'éluat est recueilli par fraction de 1 mL et l'activité phosphatase de chaque fraction est évaluée *in vitro* par fluorimétrie (technique décrite dans la section « 1.2. Mesure de l'activité phosphatase des CDC25 *in vitro* »).

1.2 Mesure de l'activité phosphatase des CDC25 *in vitro*

La mesure d'activité phosphatase des protéines de fusion GST-CDC25 est réalisée grâce à une technique fluorimétrique basée sur la déphosphorylation de la 3-O-méthylfluorescéine phosphate (OMF-P). Ceci conduit à la formation d'un produit fluorescent, la 3-O-méthylfluorescéine (OMF) (**figure 58**). La réaction est réalisée en microplaque 96 puits dans un volume final de 100 μ L en présence de 315 ng de CDC25A, 500 ng de CDC25B et 414 ng de CDC25C. La réaction s'effectue dans du tampon Tris dépourvu d'agent réducteur [Tris-HCl 50 mM (pH = 8,0), NaCl 50 mM, EDTA 1mM, SAB 0,1 % (m/v)] et est déclenchée par

l'ajout de substrat ($500 \mu\text{M} = 10 \times K_M$). La fluorescence émise est suivie pendant 2 h à 30°C grâce à un lecteur Cytofluor®, Biosystem (filtre d'excitation = 485 nm et filtre d'émission = 510 nm).

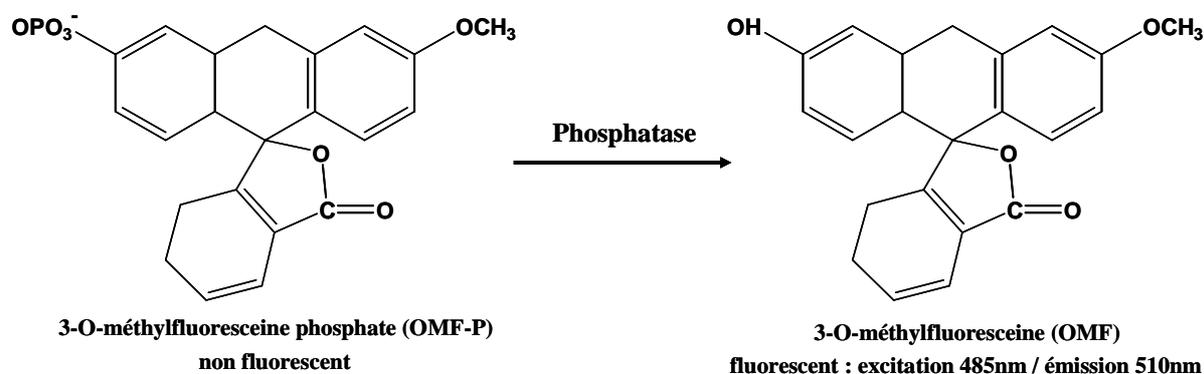


Figure 58 : Principe de la mesure d'activité phosphatase en fluorimétrie

La vitesse de déphosphorylation du substrat (OMF-P) par les phosphatases est proportionnelle à l'activité des enzymes. Ainsi, nous pouvons évaluer *in vitro* l'activité de composés potentiellement inhibiteurs des phosphatases CDC25. En effet, en présence d'inhibiteur, la vitesse la formation du produit (OMF) sera diminuée en comparaison de l'activité contrôle sans inhibiteur. Pour les essais, les protéines recombinantes CDC25 sont préalablement mises en contact avec l'inhibiteur potentiel pendant 20 min à 30°C . Puis le substrat (OMF-P) est ajouté et la mesure d'activité est suivie pendant 2 h afin d'obtenir une cinétique de formation du produit.

L'essai de réversibilité de l'inhibition des CDC25 a été mis en place à partir du protocole décrit par Brezak *et al.* en 2005 et adapté à nos conditions expérimentales de mesure d'activité phosphatase *in vitro*. La phosphatase CDC25C purifiée ($10 \mu\text{g}$) est incubée en présence d'une concentration active en inhibiteur ($10 \mu\text{M}$) pendant différents temps (0-90 min). Ensuite, le mélange réactionnel enzyme-inhibiteur est dilué 100 fois dans du tampon de réaction [Tris-HCl 50 mM (pH = 8,2), NaCl 50 mM, EDTA 1mM, SAB 0,1 % (m/v)] de manière à atteindre une concentration en inhibiteur qui est inactive ($0,1 \mu\text{M}$). L'activité phosphatase est ensuite mesurée, comme décrit précédemment, en présence de 414 ng de protéine et $500 \mu\text{M}$ de substrat (OMF-P).

2 Culture cellulaire

2.1 Les lignées cellulaires

La lignée cellulaire MCF-7 (ECACC, UK) issue d'adénocarcinome mammaire humain sera utilisée. Cette lignée a été développée par M. Rich (Michigan Cancer Foundation). Lors de cette étude, nous avons également utilisé une lignée de cellules de cancer de sein métastatiques isolées d'une effusion pleurale, MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26). Nous disposons aussi d'une lignée de cellules MCF-7 rendues résistantes à la vincristine, Vcr-R (Whelan *et al.* 1992). Enfin, la lignée épithéliale mammaire non cancéreuse immortalisée avec une transcriptase inverse, hTERT-HME1 (ATCC, CRL-4010), a été utilisée comme modèle de cellules saines.

2.2 Conditions de culture

Les manipulations sont effectuées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cellules sont maintenues en culture en monocouche en flacon de 75 cm² en présence de milieu complet (**Tableaux 6 et 7 en annexe 9**) dans un incubateur à 37°C, en atmosphère humide à 5% de CO₂. Le milieu est renouvelé tous les 2 ou 3 jours.

Lorsque les cellules sont au stade sub-confluent, le milieu de culture est éliminé par aspiration et les cellules sont détachées du support à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA 1X. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout d'un volume de milieu de culture. Les cellules sont récupérées sous forme de culot après centrifugation à 500 × g, pendant 5 min à température ambiante puis sont resuspendues dans du milieu complet. Une fraction de cette nouvelle culture est utilisée pour la numération cellulaire, réalisée au moyen d'une cellule de Mallassez, après coloration au bleu trypan (0,4% v/v). De nouvelles cultures peuvent alors être ensemencées à la densité souhaitée.

2.3 Congélation et décongélation des cellules

Lors de la congélation, les cellules sont mises en suspension à raison de 3×10^6 cellules/mL dans du milieu de congélation froid [milieu complet additionné de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) et de 5 % (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma)]. Cette suspension cellulaire est conditionnée par fraction de 1 mL dans des cryotubes qui subissent

alors des paliers de congélation (20 min à -20°C puis 1 à 24h à -80°C) avant d'être plongés dans l'azote liquide pour conservation.

Lors de la remise en culture, la suspension cellulaire est décongelée rapidement à 37°C. Puis le milieu de congélation est éliminé avant la mise en culture des cellules dans du milieu complet.

2.4 Traitement et récupération des cellules en culture

Les traitements sont réalisés sur des cultures ensemencées à 1×10^6 cellules en boîtes de Pétri (surface = 63,6 cm²). 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec des concentrations connues de molécules à tester. Parallèlement à cela, les témoins reçoivent le même pourcentage de solvant que les cellules traitées (généralement 0,5 % (v/v) de DMSO). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant le temps désiré.

A l'issue du traitement, la totalité des cellules est récupérée. Le milieu de culture contenant les cellules détachées est prélevé et les cellules adhérentes sont récupérées, soit par grattage, soit par trypsination. Les cellules sont récupérées sous forme de culot après centrifugation à $500 \times g$ pendant 5 min à 4°C. Le culot cellulaire est ensuite lavé trois fois dans du tampon PBS 1X froid [0,2 g/L KH₂PO₄, 1,15 g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KCl, 8 g/L NaCl, Eurobio]. Les culots secs ainsi obtenus sont conservés à -80°C jusqu'à extraction des ARN totaux ou récupération des protéines.

2.5 Transfection transitoire des cellules MCF-7 par des ARN interférents (siRNA)

Les expériences de transfection ont été réalisées en plaque 6 puits sur des cultures ensemencées à 2×10^5 cellules / puits. 24h après ensemencement, les cellules sont transfectées à l'aide d'un agent de transfection, DharmaFECT® 1 (Dharmacon) selon le protocole décrit par le fournisseur. L'inactivation des phosphatases CDC25A et C a été réalisée en présence de 25 nM de SmartPool siRNA CDC25A et/ou 25 nM de SmartPool CDC25C (Dharmacon). Parallèlement à cela, différents contrôles ont été effectués : un contrôle positif de transfection grâce à l'utilisation de 5 nM de siRNA MAPK1 (Qiagen) et des contrôles négatifs en présence d'agent de transfection seul (0,2 % v/v) et de 5 nM d'un siRNA ne possédant pas de cible cellulaire (scramble siRNA, Qiagen). Les cultures sont ensuite incubées à 37°C pendant le temps désiré.

3 Mesure de la viabilité cellulaire

3.1 Test de cytotoxicité au MTT

Ce test est utilisé pour évaluer la viabilité cellulaire en présence de molécules potentiellement cytotoxiques. Il est basé sur la réduction du MTT (bromure de 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium ou bleu de thiazole) par la succinate déshydrogénase en cristaux insolubles de formazan (Mosmann 1983) (**figure 59**). La quantité de cristaux formés est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

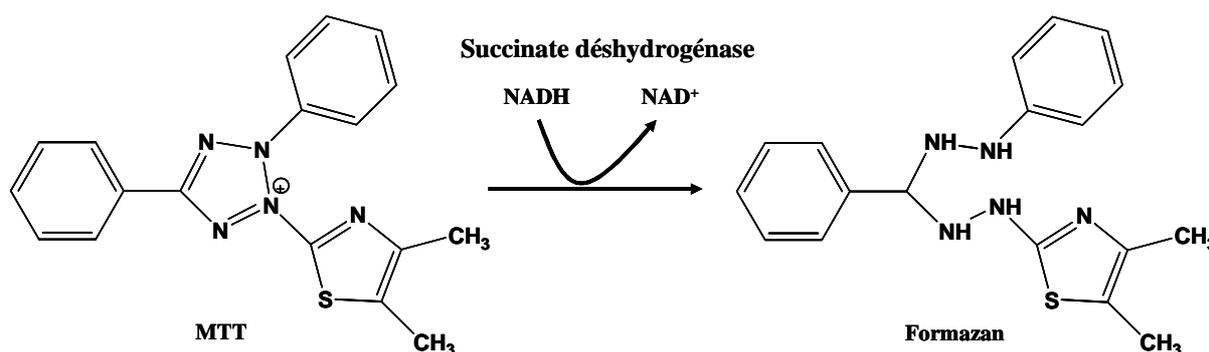


Figure 59 : Principe du test de cytotoxicité au MTT

Les tests de viabilité sont réalisés en microplaques de culture 96 puits (surface individuelle de 0,36 cm²) après ensemencement de chaque puits avec 10 000 cellules. Après 24 h d'incubation, les cellules ont adhéré au fond des puits et 100 µL des différentes dilutions d'agents cytotoxiques, préparées dans du milieu de culture frais, sont substitués au milieu initial. Deux témoins sont réalisés en présence du milieu de culture seul et du milieu de culture contenant le solvant de solubilisation des molécules à tester (0,5 % v/v). Après un temps de traitement approprié (6-72 h) à 37°C, les milieux sont éliminés par aspiration et les tapis cellulaires sont lavés avec du tampon PBS 1X. Une solution de MTT (500 µg/mL de milieu de culture) est ajoutée à raison de 100 µL par puits et est laissée au contact des cellules. Après 3h d'incubation à 37°C, le DMSO est substitué à la solution de MTT dans chaque puits afin de dissoudre les cristaux de formazan. L'intensité de coloration est mesurée par spectrophotométrie à 550 nm au moyen d'un lecteur de plaques (Dynatech MR5000). Les valeurs de CI₅₀ sont estimées grâce à un programme informatique de calcul, GlnTox (Maul 1992).

3.2 Test d'exclusion au bleu Trypan

L'effet des composés sur la croissance cellulaire va pouvoir être évalué grâce à la réalisation de courbes de croissance. Pour cela, les cellules sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 2×10^5 cellules/puits. Après adhésion cellulaire, les cellules sont mises en présence des composés à tester. Toutes les 24 h, le milieu de culture (contenant les cellules mortes flottantes) est récupéré et les cellules adhérentes sont détachées de leur support après action de la trypsine. Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé directement par comptage en cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan, colorant ne marquant que les cellules perméables, donc non viables.

3.3 Détection de l'apoptose en microscopie à fluorescence

Afin de visualiser la condensation et la fragmentation de l'ADN lors de l'apoptose, nous avons utilisé un marquage classique des noyaux cellulaires au DAPI. Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est une molécule fluorescente capable de se lier à l'ADN double brin. Celui-ci émet une fluorescence bleue ($\lambda_{\text{émission}} = 454 \text{ nm}$) après excitation dans l'UV ($\lambda_{\text{excitation}} = 364 \text{ nm}$). A l'issue des traitements, les cellules en suspension et les cellules adhérentes, préalablement décollées à la trypsine, sont récupérées puis lavées au PBS 1X. Les cellules sont ensuite projetées sur lames histologiques par centrifugation (Rotofix 32, Hettich). Le marquage au DAPI (10 $\mu\text{g/mL}$) est effectué entre lame et lamelle pendant 20 min à l'obscurité puis les lames sont immédiatement observées sous microscope à fluorescence Nikon Eclipse 80i.

3.4 Evaluation du potentiel membranaire mitochondrial

L'évaluation du potentiel mitochondrial cellulaire a été réalisée en microscopie à l'aide d'une sonde fluorescente nommée JC-1 (invitrogen). JC-1 est une molécule cationique qui s'accumule spécifiquement dans la mitochondrie sous forme de dimères lorsque cette dernière est polarisée et émet une fluorescence rouge ($\lambda_{\text{émission}} = 590 \text{ nm}$). Par contre, lorsque la mitochondrie est dépolarisée la sonde est libre dans le cytoplasme et émet une fluorescence verte ($\lambda_{\text{émission}} = 525 \text{ nm}$). Lors de ces expériences, un contrôle positif a été réalisé en présence

de 20 μM d'une molécule connue pour induire une rapide chute du potentiel mitochondrial (CCCP ou carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone).

Après traitement des cellules MCF-7, le marquage est réalisé en petites boîtes de Pétri (surface = 9,6 cm^2) en présence de 1 $\mu\text{g/mL}$ de JC-1. Il est important de noter que le marquage s'effectue pendant 15 min à 37°C et à l'obscurité. Le tapis cellulaire est ensuite lavé deux fois au PBS 1X à 37°C. Les cellules sont immédiatement observées sous UV à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 80i (filtres passe-bande 510/56 et 450/90). Les images obtenues sont issues de la superposition des deux signaux de fluorescence.

4 Etude de l'expression des gènes (RT-PCR)

Cette étude permet d'évaluer l'abondance des ARNm par la méthode de rétrotranscription (RT) associée à la réaction en chaîne par la Taq-polymérase (PCR). Les ARN totaux sont extraits et la fraction des ARNm polyadénylés est ensuite sélectionnée lors de l'étape de RT. Les ADNc d'intérêt sont ensuite amplifiés par PCR semi-quantitative.

4.1 Extraction des ARN totaux à partir des culots cellulaires

L'extraction des ARN s'effectue en utilisant un réactif prêt-à-l'emploi, l'EXTRACT-ALL[®] (Eurobio) selon le protocole décrit par Chomczynski et Sacchi. Ce réactif permet d'isoler, en une seule étape, simultanément les ARN, ADN et protéines à partir de cellules. Les cellules cultivées en boîte de Pétri sont lysées par addition d'1 mL d'EXTRACT-ALL[®] (pour $1-10 \times 10^6$ cellules). Après homogénéisation, une incubation de 5 min à température ambiante va permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. 200 μL de chloroforme sont ajoutés et le mélange est agité vigoureusement pendant 15 s. Après 3 min d'incubation, l'ensemble est centrifugé à $12\,000 \times g$ pendant 15 min à 4°C. Après centrifugation, les ARN, présents dans la phase aqueuse supérieure incolore, sont soigneusement prélevés. La précipitation des ARN s'effectue ensuite par ajout de 500 μL d'isopropanol (incubation pendant 10 min à température ambiante). Après une centrifugation à $12\,000 \times g$ pendant 10 min à 4°C, les ARN forment un précipité blanchâtre au fond du tube. Le culot d'ARN est ensuite lavé une fois dans l'éthanol à 75 % puis en centrifugeant à $7\,500 \times g$ pendant 5 min à 4°C. Après séchage à l'air, le culot d'ARN est solubilisé dans l'eau ultra-pure exempte d'activité RNase et DNase (NFW ou *Nuclease-free water*).

La concentration en ARN de la solution ainsi obtenue est estimée par spectrophotométrie UV à 260 nm ($1 \text{ UA}_{260} \sim 40 \mu\text{g ARN} / \text{mL}$). La qualité des ARN totaux sera estimée grâce à la valeur du ratio A_{260}/A_{280} ($> 1,8$ pour des solutions sans contaminant ADN ou protéique) et par électrophorèse en gel d'agarose à 2 %.

4.2 Rétrotranscription des ARNm

L'étape de rétrotranscription (RT) va permettre la synthèse d'ADNc simple brin à partir des molécules d'ARN présentes en solution. L'utilisation d'amorces oligodT permet la rétrotranscription sélective des ARNm polyadénylés. Chaque réaction de rétrotranscription est réalisée sur 2 μg d'ARN totaux et en présence de M-MLV RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Proméga) dans un thermocycleur de type PTC-100™ (MJ Research) selon les conditions décrites dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Conditions réactionnelles de la rétrotranscription

Réactifs	Volume réactionnel	Concentration finale
ARN totaux	2 μg	-
OligodT (200 μM)	2 μL	10 μM
NFW	qsp 15 μL	-
Dénaturation (10 min à 70°C)		
Tampon RT (5X)	8 μL	1 X
dNTP (25 mM)	0,8 μL	0,5 mM
M-MLV RT (200 U/ μL)	2 μL	0,25 U / μL
RNasin (40 U/ μL)	1,2	0,03 U / μL
NFW	13 μL	-
Rétrotranscription (1 h à 40°C)		

4.3 Amplification des ADNc par PCR

Lors de l'étape de PCR, les séquences d'ADNc d'intérêt vont être amplifiées grâce à l'action de la *Taq* ADN polymérase (Eurobio), dans les conditions décrites ci-dessous (**tableau 9**).

Tableau 9 : Conditions réactionnelles de PCR

Réactifs	Volume réactionnel	Concentration finale
NFW	18 μ L	-
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μ L	1,5 mM
Tampon PCR (10X)	2,5 μ L	1 X
dNTP (25 mM)	0,25 μ L	0,25 mM
Taq ADN polymérase (5 U / μ L)	0,5 μ L	0,1 U / μ L
ADNc	2 μ L	-
Amorce cible S/AS (10 μ M)	1 μ L	0,4 μ M

La réaction d'amplification est réalisée dans thermocycleur de type PTC-100™ (MJ Research) selon le programme suivant :

- 2 min à 95°C
 - Dénaturation : 45 s à 95°C
 - Hybridation : 45 s à 60°C
 - Elongation : 1 min 30 s à 72°C
 - 5 min à 72°C
- } x nombre de cycle

Préalablement à cela, d'autres conditions expérimentales ont du être optimisées telles que le choix des amorces, la température d'hybridation, le nombre de cycle réalisé... Les séquences des amorces des gènes étudiés ont été définies à partir des séquences d'ADNc décrites dans la littérature. Les couples d'amorce ont été choisi en respectant les règles habituelles : aucun risque d'hybridation intra- ou intermoléculaire entre amorces, même longueur et même composition en G et C. Les séquences des amorces utilisées (Eurobio) sont présentées dans le **tableau 10** Enfin, des cinétiques d'amplification de chaque ADNc d'intérêt ont été réalisées afin de définir le nombre de cycle de PCR nécessaire permettant d'effectuer une analyse quantitative.

Tableau 10 : Amorces utilisées pour l'étude par PCR de l'expression de gènes d'intérêt

Gène d'intérêt		Séquence (5'→3')	région amplifiée (pb)	Nombre de cycle de PCR
β actine	S	GGA CGA CAT GGA GAA AAT CTG G	174	24
	AS	TGG ATA GCA ACG TAC ATG GCT G		
CDC25A	S	TGG AGA GAA TCT GAA GAA TG	447	32
	AS	TTG CCA TTC AAA ACA GAT GC		
CDC25B	S	AAT CTT CTG ATG CAG GTC TC	273	28
	AS	CAT CAT TCT CCT TGT CTT CC		
CDC25C	S	TCT ACG GAA CTC TTC TCA TC	309	30
	AS	AAG TCC TGA AGA ATC CAG GT		
cdk 1	S	GGA GTT GTG TAT AAG GGT AG	456	30
	AS	GAG TGT TAC TAC CTC ATG TG		
cdk 2	S	ATC AAG AGC TATCTG TTC CA	396	30
	AS	ATC AGG CAT AGA AGT AAC TC		
Mapk1	S	TAT TCG AGC ACC AAC CAT CGA GCA	221	26
	AS	TGA GAT CAC AGG TGG TGT TGA GCA		
p21	S	AGG AGG CGC CAT GTC AGA AC	531	28
	AS	AGG ACT GCA GGC TTC CTG TG		
p53	S	ATT CTG GGA CAG CCA AGT CT	437	28
	AS	GGA GTC TTC CAG TGT GAT GA		
bcl-2	S	CTG TGG ATG ACT GAG TAC CT	127	32
	AS	GAG ACA GCC AGG AGA AAT CA		
Bax	S	GTT TCA TCC AGG ATC GAG CA	489	32
	AS	CCA TCT TCT TCC AGA TGG TG		

5 Western blot

5.1 Préparation des échantillons cellulaires

La préparation des échantillons utilisés pour western-blot nécessite de resuspendre et d'incuber pendant 30 min à 4°C les culots cellulaires dans du tampon de lyse [10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 100 mM NaCl, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM

Na_3VO_4 , 0,3 M PMSF, 0,1 % (m/v) SDS, 0,5 % (m/v) déoxycholate, 1 % (v/v) Triton X-100, 10 % (v/v) glycérol, 3 % de cocktail d'antiprotéases (Sigma-Aldrich)]. Les suspensions cellulaires obtenues sont traitées aux ultrasons à raison de trois séries de 10 s (sonicateur Vibra-cell, Bioblock, puissance 50). Une centrifugation (15 min, $12\,000 \times g$, 4°C) permet de séparer les molécules solubles présentes dans le surnageant des débris membranaires retrouvés dans le culot. 40 μg de protéines sont déposés dans les puits du gel après détermination de la concentration en protéines par la méthode de Lowry (Lowry *et al.* 1951).

5.2 Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) est réalisée en conditions dénaturantes, en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) qui confère aux protéines une charge négative et permet de les séparer selon leur taille. Les protéines sont dénaturées dans du tampon [Tris-HCl 100mM pH 8,0, urée 3,6 M, DTT 50 mM, SDS 20 % (m/v), bleu de bromophénol 0,003 % (m/v)] et leur séparation est réalisée après passage dans un gel de concentration à 5 % puis dans un gel de séparation de 10-14 %. Le système Mini-PROTEAN® 3 (Bio-Rad) est utilisé pour réaliser l'électrophorèse. La migration est faite à température ambiante dans un champ électrique (150 V) en présence de tampon de migration [Tris 250 mM, glycine 1,92 M, SDS 1 % (m/v)].

5.3 Immunoblot

Après SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose en présence de tampon de transfert [12,5 mM Tris, 0,1 M glycine, 10% (v/v) méthanol]. Cette étape utilise un système de transfert humide XCell SureLock™ Mini-Cell (Invitrogen) à une tension de 25 V pendant 1 h. L'efficacité du transfert est alors vérifiée par coloration de la membrane au rouge Ponceau [0,2 % (m/v) de Rouge Ponceau, 3 % (v/v) d'acide acétique]. La membrane est ensuite saturée dans du tampon TBST 1X [Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1 %] contenant 5 % (m/v) de lait écrémé. La membrane est ensuite lavée (3×5 min) dans du TBST 1X puis incubée avec l'anticorps primaire pendant la nuit à 4°C . Les anticorps primaires sont dilués dans du tampon TBST 1X : anti-CDC25A monoclonal (F-6, Santa Cruz) au 1/200, anti-CDC25B polyclonal (C-20, Santa Cruz) au 1/1000, anti-CDC25C polyclonal (C-20, Santa Cruz) au 1/1000, anti-Cdk1 monoclonal (P0H1, Cell Signaling) au

1/2000, anti-Cdk2 monoclonal (D-12, Santa Cruz) au 1/500, anti-pCdk1 polyclonal (C-19, Santa Cruz) au 1/1000, anti-pCdk2 polyclonal (Santa Cruz) au 1/1000, anti-PARP clivée polyclonal (214/215, Invitrogen) au 1/1000, anti-Bcl2 monoclonal (Clone 124, Dako Cytomation) au 1/500, anti-MAPK1 polyclonal (C-19, Santa Cruz) au 1/750 et anti-tubuline monoclonal (DM-1A, Sigma) au 1/3500.

La membrane est ensuite lavée (3×5 min) avant d'être marquée pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) : anti-IgG de lapin préparé chez la chèvre (Santa Cruz) dilué au 1/7500 ou anti-IgG de souris préparé chez le lapin (Bio-Rad) dilué au 1/7500.

Après lavage (3×5 min) dans le TBST 1 X, la membrane est mise en présence du substrat de la HRP (kit luminol reagent, Santa Cruz) et le marquage est révélé à l'aide du bioanalyseur ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

6 Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

L'analyse du contenu en ADN des cellules permet de déterminer la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2, M). Au cours du cycle cellulaire, les cellules vont passer du stade diploïde ($2n$ chromosomes), qui correspond aux phases G0 ou G1, au stade tétraploïde ($4n$ chromosomes), qui correspond aux phases G2 et M, avant de se diviser et de retrouver un contenu $2n$. L'iodure de propidium (IP) est un fluorochrome et un agent intercalant de l'ADN qui va permettre de discriminer les cellules $2n$ et $4n$. L'intensité du marquage à l'IP va être proportionnelle à la quantité d'ADN présent dans les cellules. L'IP permet également d'identifier les cellules en phase S dont le contenu en ADN est transitoire entre l'état diploïde et tétraploïde.

Après traitement, la totalité des cellules est récupérée et lavée au PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées dans l'éthanol à 80 % puis sont stockées à -20°C jusqu'au moment de l'analyse. Le marquage à l'iodure de propidium (IP 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RNase A 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Triton X-100 0,1 % dans du PBS 1X) est effectué 15 min avant passage sur le cytomètre (FACScalibur, Becton Dickinson®). L'acquisition du signal est réalisée par le logiciel CellQuest™ et l'analyse des données est effectuée par la suite par un logiciel spécifique de l'analyse du cycle cellulaire, ModFit LT™.

7 Evaluation du stress oxydant cellulaire

Le 2',7'-dichlorodihydrofluoresceine diacétate (H₂DCF-DA) est utilisé pour la détection d'espèces radicalaires oxygénées (ERO) intracellulaires. Les ERO sont principalement : l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le radical hydroxyle (HO[•]), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les radicaux peroxydes (ROO[•]), l'oxyde nitrique (NO[•])...

Le H₂DCF-DA est une petite molécule non polaire, non fluorescente qui diffuse librement dans les cellules dans lesquelles elle sera déacétylée par les estérases intracellulaires en un composé polaire et non fluorescent. En présence de ERO, et plus particulièrement en présence de peroxyde d'hydrogène, ce composé va être rapidement oxydé en 2',7'-dichlorofluoresceine (DCF), hautement fluorescent. La fluorescence résultante sera donc proportionnelle à la concentration en ERO intracellulaires.

Après traitement, la totalité des cellules est récupérée et lavée au PBS 1X. Les cellules sont ensuite marquées au H₂DCF-DA (5 µM). Après 15 min d'incubation à l'obscurité, l'analyse des échantillons est réalisée par cytométrie en flux.

8 Dosage de protéines par la méthode de Lowry

La concentration en protéines des échantillons cellulaires est estimée grâce à la méthode proposée par Lowry *et al.*, par comparaison à une gamme de concentration comprises entre 0 et 25 µg/mL de sérum albumine bovine (SAB). L'absorbance est mesurée à 660 nm. La qualité des dosages est contrôlée en vérifiant la concentration d'un standard, une solution de SAB de concentration connue, qui est traitée en parallèle des échantillons mesurés.

9 Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats sont données pour des expériences réalisées au moins trois fois et de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne ± écart-type. Leur significativité a été évaluée par le test t de Student qui permet la comparaison de moyennes de petits échantillons. Les résultats ont été jugés statistiquement différents lorsque *p* était inférieur à 0,05 en comparaison du contrôle.

BIBLIOGRAPHIE

A

Aggarwal B. B., Shishodia S. **Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer.** *Biochem. Pharmacol.* 71 (2006) 1397-1421.

Ahmad N., Adhami V.M., Afaq F., Feyes D.K., Mukhtar H. **Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells.** *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 1466-1473.

Arantes G. M. **The catalytic acid in the dephosphorylation of the Cdk2-pTpY/CycA protein complex by CDC25B phosphatase.** *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 15244-15247.

Arantes G. M. **Flexibility and inhibitor binding in CDC25 phosphatases.** *Proteins* (2010)

Aressy B., Bugler B., Valette A., Biard D., Ducommun B. **Moderate variations in CDC25B protein levels modulate the response to DNA damaging agents.** *Cell Cycle* 7 (2008) 2234-2240.

Aressy B. and Ducommun B. **Cell Cycle Control by the CDC25 Phosphatases.** *Anticancer Agents Med. Chem.* 8 (2008) 818-824.

Arora A., Seth K., Shukla Y. **Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by diallyl sulfide in K562 leukemic cells and in mouse liver.** *Carcinogenesis* 25 (2004) 941-949.

Athar M., Back J. H., Tang X., Kim K. H., Kopelovich L., Bickers D. R., Kim A. L. **Resveratrol: A Review of Pre-clinical Studies for Human Cancer Prevention.** *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224 (2007) 274-283.

B

Bahassi M., Hennigan R. F., Myer D. L., Stambrook P. J. **CDC25C phosphorylation on serine 191 by Plk3 promotes its nuclear translocation.** *Oncogene* 23 (2004) 2658-2663.

Baldin V., Cans C., Knibiehler M., Ducommun B. **Phosphorylation of human CDC25B phosphatase by CDK1-Cyclin A triggers its proteasome-dependent degradation.** *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 32731-32734.

Bansal P. and Lazo J. S. **Induction of CDC25B regulates cell cycle resumption after genotoxic stress.** *Cancer Res.* 67 (2007) 3356-3363.

Bäurle S., Blume T., Günther J., Henschel D., Hillig R. C., Husemann M., Mengel A., Parchmann C., Schmid E., Skuballa W. **Design and synthesis of macrocyclic inhibitors of phosphatase CDC25B.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (2004) 1673-1677.

Begouin A., Hesse S., Queiroz M.-J. R. P., Kirsch G. **Synthesis of diarylamines in the thiophene series by Buchwald-Hartwig coupling.** *Synthesis* 14 (2005) 2373-2378.

Begouin A., Hesse S., Queiroz M.-J. R. P., Kirsch G. **Reactivity of substituted bromothiophenecarboxylates in palladium-catalyzed N-arylation of hetarylaminines.** *Synthesis* 16 (2006) 2794-2798.

Begouin A., Hesse S., Queiroz M.-J. R. P., Kirsch G. **Palladium-catalyzed Buchwald-Hartwig coupling of deactivated aminothiophenes with substituted halopyridines.** *Eur. J. Org. Chem.* 10 (2007) 1678-1682.

Bélot A., Velten M., Grosclaude P., Bossard N., Launoy G., Remontet L., Benhamou E., Chérié-Challine L. *et al.* **Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2005.** Institut de veille sanitaire (2008). Disponible sur : www.invs.sante.fr

Bhat B. A., Dhar K. L., Puri S. C., Saxena A. K., Shanmugavel M., Qazi G. N. **Synthesis and biological evaluation of chalcones and their derived pyrazoles as potential cytotoxic agents.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 3177-3180.

- Blanchard J. L., Epstein D. M., Boisclair M. D., Rudolph J., Pal K. **Dysidiolide and related γ -hydroxy butenolide compounds as inhibitors of the protein tyrosine phosphatase, CDC25.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 2537-2538.
- Blasina A., Van de Weyer I., Laus M. C., Luyten W. H. M. L., Parker A. E., McGowan C. H. **A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits CDC25 phosphatase.** *Curr. Biol.* 9 (1999) 1-10.
- Blomberg I. and Hoffmann I. **Ectopic expression of CDC25A accelerates the G1/S transition and leads to premature activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases.** *Mol. Cell Biol.* 19 (1999) 6183-6194.
- Bonnet J., Coopman P., Morris M. C. **Characterization of centrosomal localization and dynamics of CDC25C phosphatase in mitosis.** *Cell Cycle* 7 (2008) 1991-1998.
- Boutros R., Dozier C., Ducommun B. **The when and wheres of CDC25 phosphatases.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18 (2006) 185-191.
- [a] Boutros R., Lobjois V., Ducommun B. **CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation.** *Cancer Res.* 67 (2007) 11557-11564.
- [b] Boutros R., Lobjois V., Ducommun B. **CDC25 phosphatases in cancer key players? Good targets?** *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 495-507.
- Braud E., Goddard M. L., Kolb S., Brun M. P., Mondésert O., Quaranta M., Gresh N., Ducommun B., Garbay C. **Novel naphthoquinone and quinolinedione inhibitors of CDC25 phosphatase activity with antiproliferative properties.** *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 9040-9049.
- Brault L. and Bagrel D. **Activity of novel CDC25 inhibitors and preliminary evaluation of their potentiation of chemotherapeutic drugs in human breast cancer cells.** *Life Sci.* 82 (2008) 315-323.
- Brault L., Denancé M., Banaszak E., El Maadidi S., Battaglia E., Bagrel D., Samadi M. **Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of CDC25 dual specificity phosphatases.** *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 243-247.
- Brezak M. C., Quaranta M., Mondésert O., Galcera M. O., Lavergne O., Alby F., Cazales M., Baldin V., Thurieau C., Harnett J., Lanco C., Kasprzyk P. G., Prevost G. P., Ducommun B. **A novel synthetic inhibitor of CDC25 phosphatases: BN82002.** *Cancer Res.* 64 (2004) 3320-3325.
- Brezak M. C., Quaranta M., Contour-Galcera M. O., Lavergne O., Mondésert O., Auvray P., Kasprzyk P. G., Prevost G. P., Ducommun B. **Inhibition of human tumor cell growth in vivo by an orally bioavailable inhibitor of CDC25 phosphatases.** *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1378-1387.
- Brezak M. C., Kasprzyk P.G., Galcera M. O., Lavergne O., Prévost G. P. **CDC25 Inhibitors as Anticancer Agents Are Moving Forward.** *Anticancer Agents Med. Chem.* 8 (2008) 857-862.
- Brezak M. C., Valette A., Quaranta M., Contour-Galcera M. O., Jullien D., Lavergne O., Frongia C., Bigg D., Kasprzyk P. G., Prevost G. P., Ducommun B. **IRC-083864, a novel bis quinone inhibitor of CDC25 phosphatases active against human cancer cells.** *Int. J. Cancer* 124 (2009) 1449-1456.
- Brisson M., Foster C., Wipf P., Joo B., Tomko R. J. Jr., Nguyen T., Lazo J. S. **Independent Mechanistic Inhibition of CDC25 Phosphatases by a Natural Product Caulibugulone.** *Mol. Pharmacol.* 71 (2007) 185-192.
- Brisson M., Nguyen T., Vogt A., Yalowich J., Giorgianni A., Tobi D., Bahar I., Stephenson C. R., Wipf P., Lazo J. S. **Discovery and characterization of novel small molecule inhibitors of human CDC25B dual specificity phosphatase.** *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 824-833.
- Brisson M., Nguyen T., Wipf P., Joo B., Day B. W., Skoko J. S., Schreiber E. M., Foster C., Bansal P., Lazo J. S. **Redox Regulation of CDC25B by Cell-Active Quinolinediones.** *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1810-1820.

Brun M. P., Braud E., Angotti D., Mondésert O., Quaranta M., Montes M., Miteva M., Gresh N., Ducommun B., Garbay C. **Design, synthesis, and biological evaluation of novel naphthoquinone derivatives with CDC25 phosphatase inhibitory activity.** *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 4871–4879.

Bugler B., Schmitt E., Aressy B., Ducommun B. **Unscheduled expression of CDC25B in S-phase leads to replicative stress and DNA damage.** *Mol. Cancer* 9 (2010) 29-31.

Bulavin D. V., Higashimoto Y., Popoff I. J., Gaarde W. A., Basur V., Potapova O., Appella E., Fornace A. J. Jr. **Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase.** *Nature* 411 (2001) 102-107.

Bulavin D. V., Higashimoto Y., Demidenko Z. N., Meek S., Graves P., Phillips C., Zhao H., Moody S. A., Appella E., Piwnica-Worms H., Fornace A.J. Jr. **Dual phosphorylation controls CDC25 phosphatases and mitotic entry.** *Nat. Cell Biol.* 5 (2003) 545-551.

Busch C., Barton O., Morgenstern E., Götz C., Günther J., Noll A., Montenarh M. **The G2/M checkpoint phosphatase CDC25C is located within centrosomes.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 1707-1713.

Busch C., Jacob C., Anwar A., Burkholz T., Ba L. A., Cerella C., Diederich M., Brandt W., Wessjohann L., Montenarh M. **Diallylpolsulfides induce growth arrest and apoptosis.** *Int. J. Oncol.* 36 (2010) 743-749.

Busino L., Chiesa M., Draetta G. F., Donzelli M. **CDC25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis.** *Oncogene* 23 (2004) 2050-2056.

C

Cangi M. G., Cukor B., Soung P., Signoretti S., Moreira G. Jr, Ranashinge M., Cady B., Pagano M., Loda M. **Role of the CDC25A phosphatase in human breast cancer.** *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 763-761.

Cao S., Foster C., Brisson M., Lazo J. S., Kingston D. G. I. **Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of CDC25B phosphatase from a Xestospongia sp.** *Bioorg. Med. Chem.* 13 (2005) 999-1003.

Cao S., Murphy B. T., Foster C., Lazo J. S., Kingston D. G. I. **Bioactivities of simplified adociaquinone B and naphthoquinone derivatives against CDC25B, MKP-1, and MKP-3 phosphatases.** *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 2276-2281.

Cao Z., Fang J., Xia C., Shi X., Jiang B.H. **Trans-3,4',5-trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells.** *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 5253–5263.

Cazales M., Boutros R., Brezak M. C., Chaumeron S., Prevost G., Ducommun B. **Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly.** *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 318-325.

Cebula R. E., Blanchard J. L., Boisclair M. D., Pal K., Bockovich N. J. **Synthesis and phosphatase inhibitory activity of analogs of sulfircin.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 2015-2020.

Cerella C., Scherer C., Cristofanon S., Henry E., Anwar A., Busch C., Montenarh M., Dicato M., Jacob C., Diederich M. **Cell cycle arrest in early mitosis and induction of caspase-dependent apoptosis in U937 cells by diallyltetrasulfide (A12S4).** *Apoptosis* 14 (2009) 641-654.

Chen M.-S., Ryan C. E., Piwnica-Worms H. **Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of CDC25A phosphatase through 14-3-3 binding.** *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7488-7497.

Cheon H. G., Kim S. M., Yang S. D., Ha J. D., Choi J. K. **Discovery of a novel protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor, KR61639: potential development as an antihyperglycemic agent.** *Eur. J. Pharmacol.* 485 (2004) 333-339.

Chomczynski P. and Sacchi N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Anal. Biochem.* 162 (1987) 156-159.

Chou S. T., Yen Y. C., Lee C. M., Chen M. S. **Pro-apoptotic role of CDC25A: activation of cyclin B1/Cdc2 by the CDC25A C-terminal domain.** *J. Biol. Chem.* (2010) 285 : 17833-17845.

Conklin D. S., Galaktionov K., Beach D. **14-3-3 proteins associate with CDC25 phosphatases.** *PNAS* 92 (1995) 7892-7896.

Contour-Galceran M.-O., Sidhu A., Prévost G., Bigg D., Ducommun B. **What's new on CDC25 phosphatase inhibitors.** *Pharmacol. Ther.* 115 (2007) 1-12.

D

Davezac N., Baldin V., Blot J., Ducommun B., Tassan J. P. **Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B phosphatase: a potential role for pEg3 in cell cycle regulation.** *Oncogene* 21 (2002) 7630-7641.

Deep G. and Agarwal R. **New combination therapies with cell cycle agents.** *Curr. Opin. Investig. Drugs* 9 (2008) 591-604.

Demidova A. R., Aau M. Y., Zhuang L., Yu Q. **Dual regulation of CDC25A by Chk1 and p53-ATF3 in DNA replication checkpoint control.** *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4132-4139.

Derbesy G. and Harpp D. N. **A simple method to prepare unsymmetrical di- tri- and tetrasulfides.** *Tetrahed. Lett.* 35 (1994) 5381-5384.

Dodo K., Takahashi M., Yamada Y., Sugimoto Y., Hashimoto Y., Shirai R. **Synthesis of a novel class of CDC25A inhibitors from vitamin D3.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 615-617.

Donzelli M., Squatrito M., Ganoth D., Hershko A., Pagano M., Draetta G. F. **Dual mode of degradation of CDC25A phosphatase.** *EMBO J.* 21 (2002) 4875-4884.

Druesne N., Pagniez A., Mayeur C., Thomas M., Cherbuy C., Duee P. H., Martel P., Chaumontet C. **Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21waf1/cip1 expression in human colon tumor cell lines.** *Carcinogenesis* 25 (2004) 1227-1236.

Ducruet A. P. and Lazo J. S. **Regulation of CDC25A half-life in interphase by cyclin-dependent kinase 2 activity.** *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31838-31842.

Dutertre S., Cazales M., Quaranta M., Froment C., Trabut V., Dozier C., Mirey G., Bouché J.-P., Theis-Febvre N., Schmitt E., Monsarrat B., Prigent C., Ducommun B. **Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition.** *J. Cell Sci.* 117 (2004) 2523-2531.

E

Erdogan-Orhan I., Sener B., De Rosa S., Perez-Baz J., Lozach O., Leost M., Rakhilin S., Meijer L. **Polyprenyl-hydroquinones and -furans from three marine sponges inhibit the cell cycle regulating phosphatase CDC25A.** *Nat. Prod. Res.* 18 (2004) 1-9.

F

Fantes P. **Epistatic gene interactions in the control of division in fission yeast.** *Nature* 279 (1979) 428-430.

Fauman E. B., Cogswell J. P., Lovejoy B., Rocque W. J., Holmes W., Montana V. G., Piwnica-Worms H., Rink M. J., Saper M. A. **Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, CDC25A.** *Cell* 93 (1998) 617–625.

Feng X., Wang L. N., Zhou Y. Y., Yu H. P., Shen Q., Zang Y., Zhou Y. B., Li J. Y., Zhang H. X., Li J. **Discovery and characterization of a novel inhibitor of CDC25B, LGH00045.** *Acta Pharmacol. Sin.* 10 (2008) 1268-1274.

Ferguson A. M., White L. S., Donovan P. J., Piwnica-Worms H. **Normal Cell cycle and checkpoint responses in mice and cells lacking CDC25B and CDC25C protein phosphatases.** *Mol. Cell. Biol.* 25 (2005) 2853-2860.

Ferlay J., Parkin D.M., Steliarova-Foucher E. **Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008.** *Eur. J. Cancer* 46 (2010) 765-781.

G

Gabrielli B. G., De Souza C. P. C., Tonks I. D., Clark J. M., Hayward N. K., Ellem K. A. O. **Cytoplasmic accumulation of CDC25B phosphatase in mitosis triggers centrosomal microtubule nucleation in HeLa cells.** *J. Cell Sci.* 109 (1996) 1081-1093.

Gabrielli B. G., Clark J. M., McCormack A. K. and Ellem K. A. O. **Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of CDC25 regulates activity toward Cyclin B1/Cdc2 but not Cyclin A/Cdk2.** *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 28607-28614.

Galaktionov K., Lee A. K., Eckstein J., Draetta G., Meckler J., Loda M., Beach D. **CDC25 phosphatases as potential human oncogenes.** *Science* 269 (1995) 1575-1577.

Galaktionov K., Chen X., Beach D. **CDC25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc.** *Nature* 382 (1996) 511-517.

Garner-Hamrick P. A. and Fisher C. **Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate CDC25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects.** *Int. J. Cancer* 76 (1998) 720-728.

Gunasekera S. P., McCarthy P. J., Kelly-Borges M., Lobkovsky E., Clardy J. **Dysidiolide: A novel protein phosphatase inhibitor from the Caribbean sponge *Dysidea etheria* de Laubenfels.** *J. Am. Chem. Soc.* 118 (1996) 8759-8760.

Guo J., Kleeff J., Li J., Ding J., Hammer J., Zhao Y., Giese T., Korc M., Büchler M. W., Friess H. **Expression and functional significance of CDC25B in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Oncogene* 23 (2004) 71-81.

Guo J., Parise R. A., Joseph E., Lan J., Pan S. S., Joo B., Egorin M. J., Wipf P., Lazo J. S., Eiseman J. L. **Pharmacology and antitumor activity of a quinolinedione CDC25 phosphatase inhibitor DA3003-1 (NSC 663284).** *Anticancer Res.* 27 (2007) 3067-3074.

H

Ham S. W., Park H. J., Lim D. H. **Studies on menadione as an inhibitor of the CDC25 phosphatase.** *Bioorg. Chem.* 25 (1997) 33-36.

Herman-Antosiewicz A. and Singh S. V: **Checkpoint kinase 1 regulates diallyl trisulfide-induced mitotic arrest in human prostate cancer cells.** *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28519-28528.

- Herman-Antosiewicz A., Powolny A. A., Singh S. V. **Molecular targets of cancer chemoprevention by garlic-derived organosulfides.** *Acta Pharmacol. Sin.* 9 (2007) 1355-1364.
- Hochegger H., Takeda S., Hunt T. **Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?** *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 (2008) 910-916.
- Hoffmann I., Clarke P. R., Marcote M. J., Karsenti E., Draetta G. **Phosphorylation and activation of human CDC25-C by cdc2 -cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis.** *EMBO J.* 12 (1993) 53-63.
- Hoffmann I., Draetta G., Karsenti E. **Activation of the phosphatase activity of human CDC25A by a cdk2-cyclin E dependent phosphorylation at the G1/S transition.** *EMBO J.* 13 (1994) 4302-4310.
- Honaker Y. and Piwnicka-Worms H. **Casein kinase 1 functions as both penultimate and ultimate kinase in regulating CDC25A destruction.** *Oncogene* 29 (2010) 3324-3334.
- Horiguchi T., Nishi K., Hakoda S., Tanida S., Nagata A., Okayama H. **Dnacin A1 and dnacin B1 are antitumor antibiotics that inhibit CDC25B phosphatase activity.** *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 2139-2141.
- Hosono T., Fukao T., Ogihara J., Ito Y., Shiba H., Seki T., Ariga T. **Diallyl trisulfide suppresses the proliferation and induces apoptosis of human colon cancer cells through oxidative modification of beta-tubulin.** *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41487-41493.
- Howard E. W., Ling M. T., Chua C. W., Cheung H. W., Wang X., Wong Y. C. **Garlic-derived S-allylmercaptocysteine is a novel in vivo antimetastatic agent for androgen-independent prostate cancer.** *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1847-1856.
- Hsing A. W., Chokkalingam A. P., Gao Y. T., Madigan M. P., Deng J., Gridley G., Fraumeni J.F. **Allium vegetables and risk of prostate cancer: a population-based study.** *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 1648-1651.
- Huang W. G., Jiang Y. Y., Li Q., Li J., Li J. Y., Lu W., Cai J. C. **Synthesis and biological evaluation of (G)-cryptotanshinone and its simplified analogues as potent CDC25 inhibitors.** *Tetrahedron* 61 (2005) 1863-1870.
- Huang W. G., Li J. Y., Luo Y., Li J., Lu W. **Synthesis of tanshinone IIA analogues and their inhibitory activities against CDC25 phosphatases.** *Chin. Chem. Lett.* 20 (2009) 1461-1464.

I

- Iciek M., Kwiecien I., Włodek L. **Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds.** *Environ. Mol. Mutagen.* 50 (2009) 247-265.

J

- Jacob C., Anwar A., Burkholz T. **Perspective on Recent Developments on Sulfur-Containing Agents and Hydrogen Sulfide Signaling.** *Planta Med.* 74 (2008) 1580-1592.
- Jacob C. and Anwar A. **Sulfides in Allium Vegetables.** In: Chemoprevention of cancer and DNA damage by dietary factors. Knasmüller S, DeMarini D, Johnson IT, Gerhäuser C (ed.) Wiley-VCH, Weinheim (2009) pp663-684.
- Jang M., Cai L., Udeani G. O., Slowing K. V., Thomas C. F., Beecher C. W., Fong H. H., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Mehta R. G., Moon R. C., Pezzuto J. M. **Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.** *Science* 275 (1997) 218-220.

Jinno S., Suto K., Nagata A., Igarashi M., Kanaoka Y., Nojima H. and Okayama H. **CDC25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle.** *EMBO J.* 13 (1994) 1549-1556.

Johnston P. A., Foster C. A., Brisson Tierno M., Shun T. Y., Shinde S. N., Paquette W. D., Brummond K. M., Wipf P., Lazo J. S. **CDC25B Dual-Specificity Phosphatase Inhibitors Identified in a High-Throughput Screen of the NIH Compound Library.** *Assay Drug Dev. Technol.* 7 (2009) 250-265.

Ju J., Lu G., Lambert J. D., Yang C. S. **Inhibition of Carcinogenesis by Tea Constituents.** *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 395-402.

Juan C.C. and Wu F. Y.-H. **Vitamin K3 inhibits growth of human hepatoma HepG2 cells by decreasing activities of both p34^{cdc2} kinase and phosphatase.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 (1993) 907-913.

K

Källström H., Lindqvist A., Pospisil V., Lundgren A., Karlsson Rosenthal C. **CDC25A localisation and shuttling: characterisation of sequences mediating nuclear export and import.** *Exp. Cell Res.* 303 (2005) 89-100.

Kanemori Y., Uto K., Sagata N. **β-TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in CDC25A and CDC25B phosphatases.** *PNAS* 102 (2005) 6279-6284.

Kar S., Wang M., Ren Z., Chen X., Carr B. I. **Antitumor and anticarcinogenic action of Cpd 5: a new class of protein phosphatase inhibitor.** *Carcinogenesis* 24 (2003) 411-416.

[a] Kar S., Wang M., Ham S. W., Carr B. I. **H32, a non-quinone sulfone analog of vitamin K3, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting CDC25 and activating ERK.** *Cancer Biol. Ther.* 5 (2006) 1340-1347.

[b] Kar S., Wang M., Yao W., Michejda C. J., Carr B. I. **PM-20, a novel inhibitor of CDC25A, induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo.** *Mol. Cancer Ther.* 5 (2006) 1511-1519.

[c] Kar S., Wang M., Ham S. W., Carr B. I. **Fluorinated Cpd 5, a pure arylating K-vitamin derivative, inhibits human hepatoma cell growth by inhibiting CDC25 and activating MAPK.** *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1217-1227.

Kar S., Wang M., Carr B. I. **2-Methoxyestradiol inhibits hepatocellular carcinoma cell growth by inhibiting CDC25 and inducing cell cycle arrest and apoptosis.** *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62 (2007) 831-840.

Khan N., Afaq F., Saleem M., Ahmad N., Mukhtar H. **Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate.** *Cancer Res.* 66 (2006) 2500-2505.

Khanum F., Anilakumar K. R., Viswanathan K. R. **Anticarcinogenic properties of garlic: a review.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44 (2004) 479-488.

Kieffer I., Lorenzo C., Dozier C., Schmitt E., Ducommun B. **Differential mitotic degradation of the CDC25B phosphatase variants.** *Oncogene* 26 (2007) 7847-7858.

Kim K. S., Kawasaki I., Chong Y., Shim Y. H. **Inhibition of overexpressed CDC-25.1 phosphatase activity by flavone in *Caenorhabditis elegans*.** *Mol. Cells* 27 (2009) 345-350.

Kim Y.A., Choi B.T., Lee Y.T., Park D.I., Rhee S.H., Park K.Y., Choi Y.H. **Resveratrol inhibits cell proliferation and induces apoptosis of human breast carcinoma MCF-7 cells.** *Oncol. Rep.* 11 (2004) 441-446.

Kolb S., Mondésert O., Goddard M. L., Jullien D., Villoutreix B. O., Ducommun B., Garbay C., Braud E. **Development of Novel Thiazolopyrimidines as CDC25B Phosphatase Inhibitors.** Chem. Med. Chem. 4 (2009) 633-648.

Kristjansdottir K. and Rudolph J. **CDC25 phosphatases and cancer.** Chem. Biol. 11 (2004) 1043-1051.

Kundu J. K., Surh Y. J. **Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: Mechanistic perspectives.** Cancer Lett. 269 (2008) 243–261.

L

Lammer C., Wagerer S., Saffrich R., Mertens D., Ansorge W., Hoffmann I. **The CDC25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells.** J. Cell Sci. 111 (1998) 2445-2453.

Lavecchia A., Coluccia A., Di Giovanni C., Novellino E. **CDC25B phosphatase inhibitors in cancer therapy: latest developments, trends and medicinal chemistry perspective.** Anti-Cancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 843-856.

Lavecchia A., Di Giovanni C., Novellino E. **CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy.** Curr. Med. Chem. 16 (2009) 1831-1849.

Lavecchia A., Di Giovanni C., Novellino E. **Inhibitors of CDC25 phosphatases as anticancer agents: a patent review.** Expert Opin. Ther. Pat. 20 (2010) 405-425.

Lazo J. S., Aslan D. C., Southwick E. C., Cooley K. A., Ducruet A. P., Joo B., Vogt A., Wipf P. **Discovery and Biological Evaluation of a New Family of Potent Inhibitors of the Dual Specificity Protein Phosphatase CDC25.** J. Med. Chem. 44 (2001) 4042-4049.

Lazo J., Nemoto K., Pestell K. E., Cooley K., Southwick E. C., Mitchell D. A., Furey W., Gussio R., Zaharevitz D. W., Joo B., Wipf P. **Identification of a Potent and Selective Pharmacophore for CDC25 Dual Specificity Phosphatase Inhibitors.** Mol. Pharmacol. 61 (2002) 720-728.

Lazo J. S. and Wipf P. **Is CDC25A druggable target?** Anticancer Agents Med. Chem. 8 (2008) 837-842.

Lemaire M., Froment C., Boutros R., Mondesert O., Nebreda A. R., Monsarrat B., Ducommun B. **CDC25B Phosphorylation by p38 and MK-2.** Cell Cycle 5 (2006) 1649-1653.

Lemaire M., Ducommun B., Nebreda A. R. **UV-induced downregulation of the CDC25B protein in human cells.** FEBS Lett. 584 (2010) 1199-1204.

Lindqvist A., Källström H., Lundgren A., Barsoum E. and Karlsson Rosenthal C. **CDC25B cooperates with CDC25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1–Cdk1 at the centrosome.** J. Cell Biol. 171 (2005) 35-45.

Lisowski V., Léonce S., Kraus-Berthier L., Sopkova-de Oliveira Santos J., Pierré A., Atassi G., Caignard D.-H., Renard P., Rault S. **Design, synthesis, and evaluation of novel thienopyrrolizinones as antitubulin agents.** J. Med. Chem. 47 (2004) 1448-1464.

Löffler H., Syljuåsen R. G., Bartkova J., Worm J., Lukas J., Bartek J. **Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic CDC25A phosphatase in human breast cancer cell lines.** Oncogene 22 (2003) 8063-8071.

Lolli G. and Johnson L. N. **CAK–Cyclin-Dependent Activating Kinase. A key kinase in cell cycle control and a target for drugs ?** Cell cycle 4 (2005) 572-577.

Loukaci A., Le Saout I., Samadi M., Leclerc S., Damiens E., Meijer L., Debitus C., Guyot M. **Coscinosulfate, a CDC25 phosphatase inhibitor from the sponge *Coscinoderma matthewsi*.** Bioorg. Med. Chem. 9 (2001) 3049–3054.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193 (1951) 265-275.

M

Ma Z. Q., Chua S. S., DeMayo F. J., Tsai S. Y. **Induction of mammary gland hyperplasia in transgenic mice over-expressing human CDC25B.** Oncogene 18 (1999) 4564-4576.

MacKeigan J. P., Murphy L. O., Blenis J. **Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance.** Nat. Cell Biol. 7 (2005) 591-600.

Mailand N., Podtelejnikov A. V., Groth A., Mann M., Bartek J., Lukas J. **Regulation of G(2)/M events by CDC25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability.** EMBO J. 21 (2002) 5911-5920.

Manke I. A., Nguyen A., Lim D., Stewart M. Q., Elia A. E., Yaffe M.B. **MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation.** Mol. Cell. 17 (2005) 37-48.

Matsuoka S., Huang M., Elledge S. J. **Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase.** Science 282 (1998) 1893-1897.

Maul A. **Application of generalized linear models to the analysis of toxicity tests data.** Environ. Monit. Assess. 23 (1992) 153-163.

Mehdipour P., Pirouzpanah S., Sarafnejad A., Atri M., Shahrestani S. T., Haidari M. **Prognostic implication of CDC25A and cyclin E expression on primary breast cancer patients.** Cell Biol. Int. 33 (2009) 1050-1056.

Meijer L. **Le cycle de division cellulaire et sa régulation.** Oncologie 5 (2003) 311-326.

Melixetian M., Klein D. K., Sørensen C. S., Helin K. **NEK11 regulates CDC25A degradation and the IR-induced G2/M checkpoint.** Nat. Cell. Biol. 11 (2009) 1247-1253.

Milligan B., Saville B. and Swan J. M. **New syntheses of trisulphides.** J. Chem. Soc. (1961) 4850-4853.

Mimoto J., Kiura K., Matsuo K., Yoshino T., Takata I., Ueoka H., Kataoka M., Harada M. **Epigallocatechin gallate can prevent cisplatin-induced lung tumorigenesis in A/J mice.** Carcinogenesis 21 (2000) 915-919.

Mirey G., Chartrain I., Froment C., Quaranta M., Bouché J. P., Monsarrat B., Tassan J. P., Ducommun B. **CDC25B phosphorylated by pEg3 localizes to the centrosome and the spindle poles at mitosis.** Cell Cycle 4 (2005) 806-811.

Montes M., Braud E., Miteva M. A., Goddard M. L., Mondésert O., Kolb S., Brun M. P., Ducommun B., Garbay C., Villoutreix B. O. **Receptor-Based Virtual Ligand Screening for the Identification of Novel CDC25 Phosphatase Inhibitors.** J. Chem. Inf. Model. 48 (2008) 157-165.

Mosmann T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** J. Immunol. Methods 65 (1983) 55-63.

Münchberg U., Anwar A., Mecklenburg S., Jacob C. **Polysulfides as biologically active ingredients of garlic.** Org. Biomol. Chem. 5 (2007) 1505-1518.

Myer D. L., Bahassi el M., Stambrook P. J. **The Plk3-CDC25 circuit.** Oncogene 24 (2005) 299-305.

N

Nilsson I. and Hoffmann I. **Cell cycle regulation by the CDC25 phosphatase family.** Prog. Cell Cycle Res. 4 (2000) 107-114.

P

Park H., Carr B. I., Li M., Ham S. W. **Fluorinated NSC as a CDC25 inhibitor.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 17 (2007) 2351-2354.

Park H., Bahn Y. J., Jung S. K., Jeong D. G., Lee S. H., Seo I., Yoon T. S., Kim S. J., Ryu S. E. **Discovery of Novel CDC25 Phosphatase Inhibitors with Micromolar Activity Based on the Structure-Based Virtual Screening.** J. Med. Chem. 51 (2008) 5533-5541.

[a] Park H., Bahn Y. J., Ryu S. E. **Structure-based de novo design and biochemical evaluation of novel CDC25 phosphatase inhibitors.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 4330-4334.

[b] Park H., Li M., Choi J., Cho H., Ham S. W. **Structure-based virtual screening approach to identify novel classes of CDC25B phosphatase inhibitors.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 19 (2009) 4372-4375.

Parks J. M., Hu H., Rudolph J., Yang W. **Mechanism of CDC25B phosphatase with the small molecule substrate p-nitrophenyl phosphate from QM/MM-MFEP calculations.** J. Phys. Chem. B. 113 (2009) 5217-5224.

Peng C.-Y., Graves P. R., Ogg S., Thoma R. S., Bymes III M. J., Wu Z., Stephenson M. T., Piwnicka-Worms H. **C-TAKI protein kinase phosphorylates human CDC25C on serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding.** Cell Growth Differ. 9 (1998) 197-208.

Pereg Y., Liu B. Y., O'Rourke K. M., Sagolla M., Dey A., Komuves L., French D. M., Dixit V. M. **Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing CDC25A.** Nat. Cell. Biol. 12 (2010) 400-406.

Peyregne V. P., Kar S., Ham S. W., Wang M., Wang Z., Carr B. I. **Novel hydroxyl naphthoquinones with potent CDC25 antagonizing and growth inhibitory properties.** Mol. Cancer Ther. 4 (2005) 595-602.

Pu L., Amoscato A. A., Bier M. E., Lazo J. S. **Dual G1 and G2 phase inhibition by a novel, selective CDC25 inhibitor 7-Chloro-6-(2-morpholin-4-ylethylamino)-quinoline-5,8-dione.** J. Biol. Chem. 277 (2002) 46877-46885.

R

Ray D., Terao Y., Nimbalkar D., Hirai H., Osmundson E. C., Zou X., Franks R., Christov K., Kiyokawa H. **Hemizygous disruption of CDC25A inhibits cellular transformation and mammary tumorigenesis in mice.** Cancer Res. 67 (2007) 6605-6611.

Reynolds R. A., Yem A. W., Wolfe C. L., Deibel Jr M. R., Chidester C. G., Watenpaugh K. D. **Crystal structure of the catalytic subunit of CDC25B required for G2/M phase transition of the cell cycle.** J. Mol. Biol. 293 (1999) 559-568.

Rudolph J. **Redox Regulation of the CDC25 Phosphatases.** Antiox. Redox Signaling 7 (2005) 761-767.

Rudolph J. **CDC25 phosphatases : structure, specificity and mechanism.** Biochemistry 46 (2007) 3595-3604.

S

- Sadhu K., Reed S., Richardson H., Russell P. **Human homolog of fission yeast CDC25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2.** PNAS 87 (1990) 5139-5143.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S. **Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints.** Annu. Rev. Biochem. 73 (2004) 39-85.
- Savitsky P. A. and Finkel T. **Redox Regulation of CDC25C.** J. Biol. Chem. 277 (2002) 20535-20540.
- Schaffer E. M., Liu J. Z., Green J., Dangler C. A., Milner J.A. **Garlic and associated allyl sulfur components inhibit N-methyl-N-nitrosourea induced rat mammary carcinogenesis.** Cancer Lett. 102 (1996) 199-204.
- Scherer C., Jacob C., Dicato M., Diederich M. **Potential role of organic sulfur compounds from Allium species in cancer prevention and therapy.** Phytochem. Rev. 8 (2009) 349-368.
- Schwartz G. K. and Shah M. A. **Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy.** J. Clin. Oncol. 23 (2005) 9408-9421.
- [a] Shimazawa R., Suzuki T., Dodo K., Shirai R. **Design and synthesis of dysidiolide analogs from vitamin D3: novel class of CDC25A inhibitors.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 3291-3294.
- [b] Shimazawa R., Gochomori M., Shirai R. **Design and synthesis of novel CDC25A-inhibitors having phosphate group as a hydrophilic residue.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 14 (2004) 4339-4342.
- Shimazawa R., Kuriyama M., Shirai R. **Design and synthesis of N-alkyl oxindolylidene acetic acids as a new class of potent CDC25A inhibitors.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 3350-3353.
- Shreeram S., Hee W. K., Bulavin D. V. **CDC25A serine 123 phosphorylation couples centrosome duplication with DNA replication and regulates tumorigenesis.** Mol. Cell. Biol. 28 (2008) 7442-7450.
- Sohn J. and Rudolph J. **Catalytic and chemical competence of regulation of CDC25 phosphatase by oxidation/reduction.** Biochemistry 42 (2003) 10060-10070.
- Sohn J., Kristjánisdóttir K., Safi A., Parker B., Kiburz B., Rudolph J. **Remote hot spots mediate protein substrate recognition for the CDC25 phosphatase.** PNAS 101 (2004) 16437-16441.
- Sohn J., Parks J. M., Buhrman G., Brown P., Kristjánisdóttir K., Safi A., Edelsbrunner H., Yang W., Rudolph J. **Experimental validation of the docking orientation of CDC25 with its Cdk2-CycA protein substrate.** Biochemistry 44 (2005) 16563-16573.
- Spitkovsky D., Jansen-Dürr P., Karsenti E., Hoffman I. **S-phase induction by adenovirus E1A requires activation of CDC25A tyrosine phosphatase.** Oncogene 12 (1996) 2549-2554.
- Stan S. D., Kar S., Stoner G. D., Singh S. V. **Bioactive Food Components and Cancer Risk Reduction.** J. Cell. Biochem. 104 (2008) 339-356.
- Stuart E. C., Scandlyn M. J., Rosengren R. J. **Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer.** Life Sci. 79 (2006) 2329-2336.
- Surh Y. J. **Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals.** Nat. Rev. Cancer. 3 (2003) 768-780.

T

- Takahashi M., Dodo K., Sugimoto Y., Aoyagi Y., Yamada Y., Hashimoto Y., Shirai R. **Synthesis of the novel analogues of Dysidiolide and their structure-activity relationship.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 (2000) 2571-2574.

Theis-Febvre N., Filhol O., Froment C., Cazales M., Cochet C., Monsarrat B., Ducommun B., Baldin V. **Protein kinase CK2 regulates CDC25B phosphatase activity.** *Oncogene* 22 (2003) 220-232.

Thomae D., Kirsch G., Seck P., Kaminskia T. **One-Pot Synthesis of 7-Hydroxythieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-ones.** *Synthesis* 14 (2007) 2153-2156.

Timofeev O., Cizmecioglu O., Hu E., Orlik T., Hoffmann I. **Human CDC25A phosphatase has a non-redundant function in G2 phase by activating Cyclin A-dependent kinases.** *FEBS Lett.* 583 (2009) 841-847.

Timofeev O., Cizmecioglu O., Settele F., Kempf T., Hoffmann I. **CDC25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition.** *J Biol Chem.* 285 (2010) 16978-16990.

Toyoshima-Morimoto F., Taniguchi E., Nishida E. **Plk1 promotes nuclear translocation of human CDC25C during prophase.** *EMBO Rep.* 3 (2002) 341-348.

Turowski P., Franckhauser C., Morris M. C., P. Vaglio, A. Fernandez and N. J. C. Lamb. **Functional CDC25C Dual-Specificity Phosphatase is required for S-phase entry in human cells.** *Mol. Biol. Cell* 14 (2003) 2984-2998.

U

Uchida S., Ohtsubo M., Shimura M., Hirata M., Nakagama H., Matsunaga T., Yoshida M., Ishizaka Y., Yamashita K. **Nuclear export signal in CDC25B.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316 (2004) 226-232.

Uchida S., Yoshioka K., Kizu R., Nakagama H., Matsunaga T., Ishizaka Y., Poon R. Y., Yamashita K. **Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target CDC25B for degradation.** *Cancer Res.* 69 (2009) 6438-6444.

V

Valente S., Bana E., Viry E., Bagrel D., Kirsch G. **Synthesis and Biological Evaluation of Novel Coumarin-Based Inhibitors of CDC25 Phosphatases.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 5827-5830.

Van Vugt M. A., Bràs A., Medema R.H. **Restarting the cell cycle when the checkpoint comes to a halt.** *Cancer Res.* 65 (2005) 7037-7040.

Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif.* 36 (2003) 131-149.

W

Wang Z., Trope C. G., Flørenes V. A., Suo Z., Nesland J. M., Holm R. **Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes.** *BMC Cancer* 10 (2010) 233-244.

Whelan R.D., Waring C.J., Wolf C.R., Hayes J.D., Hosking L.K., Hill B.T. **Over-expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase pi in MCF-7 cells selected for vincristine resistance in vitro.** *Int. J. Cancer* 52 (1992) 241-246.

Wipf P., Joo B., Nguyen T., Lazo J. S. **Synthesis and biological evaluation of caulibugulones A–E.** *Org. Biomol. Chem.* 2 (2004) 2173-2174.

Wu C. C., Chung J. G., Tsai S. J., Yang J. H., Sheen L. Y. **Differential effects of allyl sulfides from garlic essential oil on cell cycle regulation in human liver tumor cells.** Food Chem. Toxicol. 42 (2004) 1937-1947.

Wu F.Y.-H. and Sun T.-P. **Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting CDC25 phosphatase.** Eur. J. Cancer 35 (1999) 1388-1393.

Wu C. C., Sheen L. Y., Chen H. W., Kuo W. W., Tsai S. J., Lii C.K. **Differential effects of garlic oil and its three major organosulfur components on the hepatic detoxification system in rats.** J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 378-383.

Wu X., Kassie F., Mersch-Sundermann V. **Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds.** Mutat. Res. 589 (2005) 81-102.

X

Xiao D., Choi S., Johnson D. E., Vogel V. G., Johnson C. S., Trump D. L., Lee Y. J., Singh S. V. **Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human prostate cancer cells involves c-Jun N-terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase-mediated phosphorylation of Bcl-2.** Oncogene 23 (2004) 5594-5606.

Xiao D., Herman-Antosiewicz A., Antosiewicz J., Xiao H., Brisson M., Lazo J. S., Singh S. V. **Diallyl trisulfide-induced G(2)-M phase cell cycle arrest in human prostate cancer cells is caused by reactive oxygen species-dependent destruction and hyperphosphorylation of Cdc 25 C.** Oncogene 24 (2005) 6256-6268.

Xiao D., Lew K. L., Kim Y. A., Zeng Y., Hahm E. R., Dhir R., Singh S. V. **Diallyl trisulfide suppresses growth of PC-3 human prostate cancer xenograft in vivo in association with Bax and Bak induction.** Clin. Cancer Res. 12 (2006) 6836-6843.

Xiao D., Zeng Y., Singh S. V. **Diallyl trisulfide-induced apoptosis in human cancer cells is linked to checkpoint kinase 1-mediated mitotic arrest.** Mol. Carcinog. 48 (2009) 1018-1029.

Y

Yamashita Y., Kasugai I., Sato M., Tanuma N., Sato I., Nomura M., Yamashita K., Sonoda Y., Kumabe T., Tominaga T., Katakura R., Shima H. **CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples.** J Neurooncol (2010) 1-7.

Yang H., Zheng S., Meijer L., Li S.-M., Leclerc S., Yu L.-L., Cheng J.-Q., Zhang S.-Z. **Screening the active constituents of Chinese medicinal herbs as potent inhibitors of CDC25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34cdc2 kinase.** J. Zhejiang Univ. SCI. 6B (2005) 656-663.

You W. C., Blot W. J., Chang Y. S., Ershow A., Yang Z. T., An Q., Henderson B. R., Fraumeni J. F., Wang T. G. **Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer.** J. Natl. Cancer Inst. 81 (1989) 162-164.

Yuan J. P., Wang G. H., Ling H., Su Q., Yang Y. H., Song Y., Tang R. J., Liu Y., Huang C. **Diallyl disulfide-induced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways.** World J. Gastroenterol. 10 (2004) 2731-2734.

Z

Zakharova O. D., Ovchinnikova L. P., Goryunov L. I., Troshkova N. M., Shteingarts V. D., Nevinsky G. A. **Cytotoxicity of new alkylamino- and phenylamino-containing polyfluorinated derivatives of 1,4-naphthoquinone.** EJMC 45 (2010) 2321-2326.

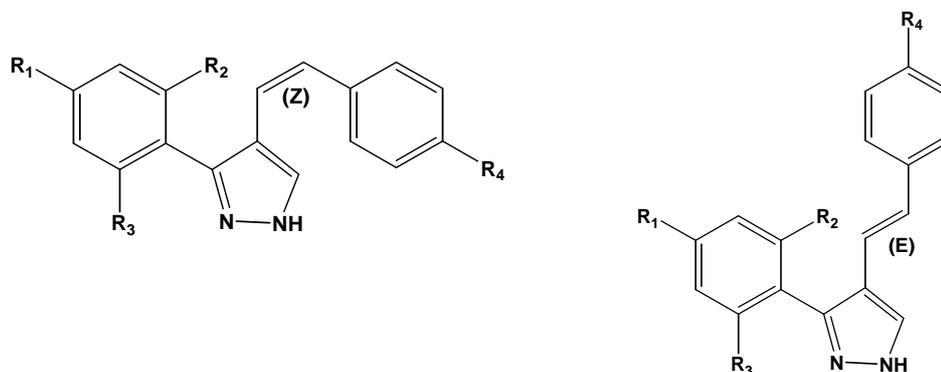
Zhang Q., Tang X., Lu Q.Y., Zhang Z.F., Brown J., Le A.D. **Resveratrol inhibits hypoxia -induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells.** *Mol. Cancer Ther.* 4 (2005) 1465–1474.

Zhou Y. B., Feng X., Wang L. N., Du J. Q., Zhou Y. Y., Yu H. P., Zang Y., Li J. Y., Li J. **LGH00031, a novel ortho-quinonoid inhibitor of cell division cycle 25B, inhibits human cancer cells via ROS generation.** *Acta Pharmacol. Sin.* 30 (2009) 1359-136.

ANNEXES

Annexe 1**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : dérivés de pyrazole**

Potentiel inhibiteur de CDC25A d'une série de dérivés de pyrazole (100 μ M)



Composé	-R ₁	-R ₂	-R ₃	-R ₄	Configuration	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
S1	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-NO ₂	E	30 ± 22
S2	-OCH ₃	-H	-OH	-NO ₂	E	ND
S3	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-NO ₂	E	40 ± 6
S4	-H	-H	-OH	-NO ₂	E	9 ± 16
S5	-H	-H	-OCH ₃	-Cl	E	0
S6	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-Cl	E	19 ± 9
S7	-OCH ₃	-H	-OH	-Cl	Z	0
S9	-OCH ₃	-H	-OH	-H	Z	35 ± 10
S10	-H	-H	-OH	-H	Z	59 ± 14
S11	-H	-H	-OH	-H	E	47 ± 13
S12	-OCH ₃	-H	-OH	-H	E	31 ± 11
S13	-OCH ₃	-OCH ₃	-OH	-H	Z	30 ± 10
S14	-H	-H	-OH	-OC ₂ H ₅	Z	5 ± 5
S15	-OCH ₃	-H	-OH	-OC ₂ H ₅	Z	44 ± 21
S16	-OCH ₃	-H	-OH	-OC ₂ H ₅	E	46 ± 14
S17	-H	-H	-OH	-CF ₃	E	14 ± 4

ND : non déterminé

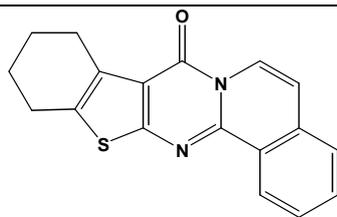
Annexe 2**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Dérivés de thiénopyridine et de thiénoypyrimidine**Potentiel inhibiteur de CDC25A d'une série des dérivés de thiénopyridine (100 μ M)

Composé	Structure	-R ₁	-R ₂	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
DT60		-H		103 \pm 2
DT109		-CH ₃		111 \pm 4
DT64		-H		96 \pm 2
DT71		-H		94 \pm 2
DT72		-H		100 \pm 2
DT86		-H		106 \pm 3
DT116		-H		108 \pm 1
DT89				107 \pm 3
DT103				101 \pm 4

Potentiel inhibiteur de CDC25A d'une série des dérivés de thiénoypyrimidine (100 μ M)

Composé	Structure	- R	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
1			59 \pm 1
2			25 \pm 5
3			48 \pm 6
5			19 \pm 1
4			44 \pm 6
6			21 \pm 7
7		-H	13 \pm 3
8		-CH3	2 \pm 3
9		-H	59 \pm 2
10		-CH3	56 \pm 1

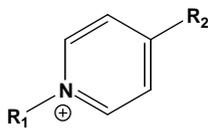
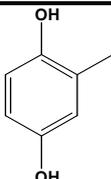
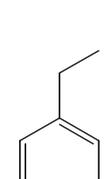
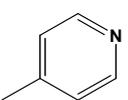
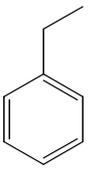
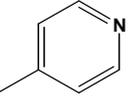
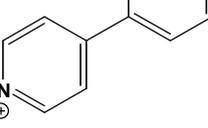
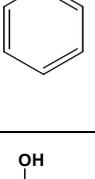
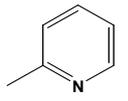
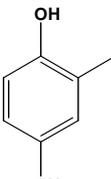
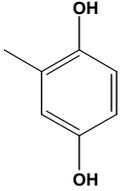
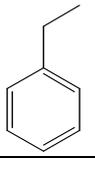
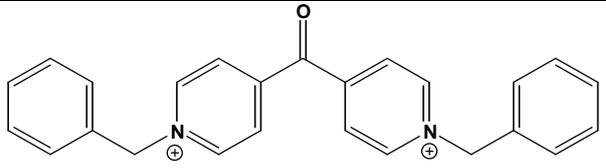
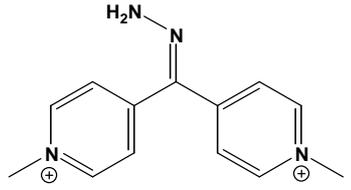
11



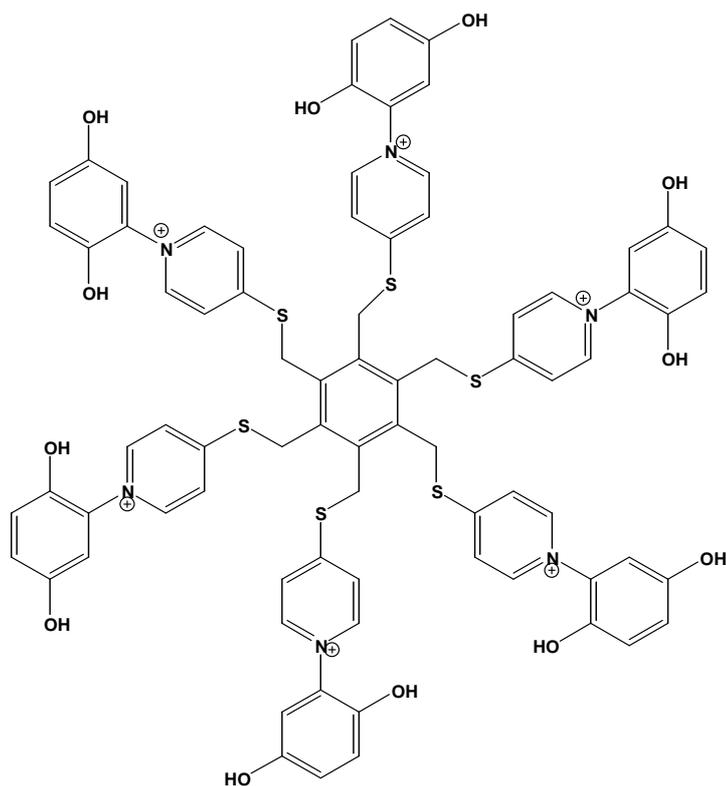
0

Annexe 3**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Sels de pyridinium**

Evaluation *in vitro* de l'inhibition des trois isoformes des phosphatases CDC25 par des sels de pyridinium (50 μ M)

Composé	Structure	-R ₁	-R ₂	Activité CDC25 résiduelle (% du contrôle)		
				CDC25A	CDC25B	CDC25C
1			-H	9 ± 12	30 ± 3	7 ± 1
3				5 ± 13	28 ± 2	6 ± 1
4				98 ± 0	ND	ND
6				93 ± 3	98 ± 2	91 ± 2
2				5 ± 11	22 ± 3	6 ± 1
5			-CH ₃	98 ± 1	ND	ND
8				97 ± 2	ND	ND
9				78 ± 12	98 ± 3	94 ± 4

13

 8 ± 7

ND

ND

ND : non déterminé

Annexe 4**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Composés mésoioniques dérivés de pyridine**

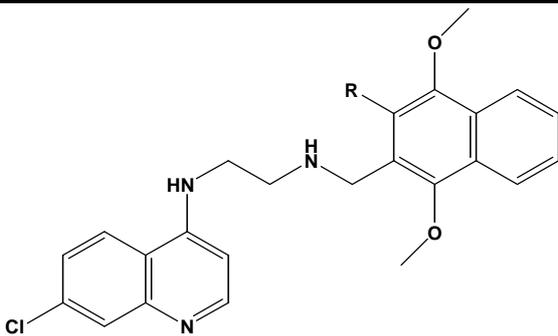
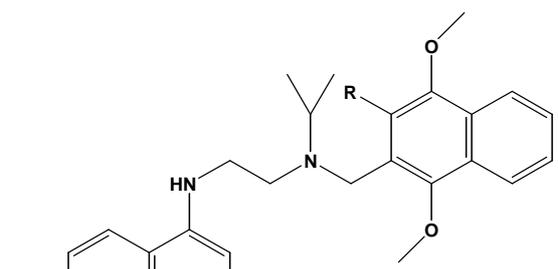
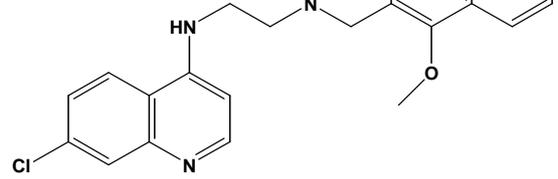
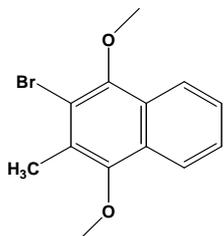
Evaluation *in vitro* de l'inhibition des phosphatases CDC25 par des composés mésoioniques dérivés de pyridine (50µM)

Composé	Structure	-R	Activité CDC25 résiduelle (% du contrôle)		
			CDC25A	CDC25B	CDC25C
7			91 ± 4	ND	ND
11		-H	93 ± 4	ND	ND
12			90 ± 4	33 ± 2	83 ± 1

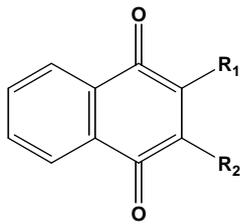
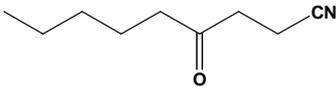
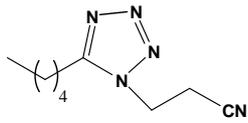
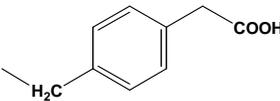
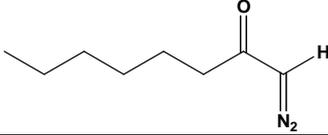
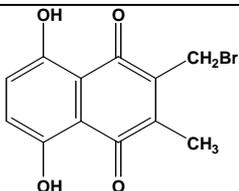
Annexe 5**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Dérivés de benzopyrone**Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par des dérivés benzopyrone (50µM)

Composé	Structure	-R ₁	-R ₂	-R ₃	-R ₄	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
T23			-H	-Br	-H	90 ± 8
T31			-OCH ₃	-H	-OCH ₃	85 ± 3
T17						70 ± 2
T67						84 ± 4
T2803						79 ± 6
LP36						84 ± 2

Annexe 6**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Dérivés de quinone**Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par des précurseurs de naphtoquinones (50µM)

Composé	Structure	-R	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
WF10		- CH ₃	111 ± 3
WF27		-H	116 ± 8
WF31		-H	121 ± 15
WF35		- CH ₃	107 ± 11
HB60			96 ± 4

Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par des naphtoquinones (10 μ M)

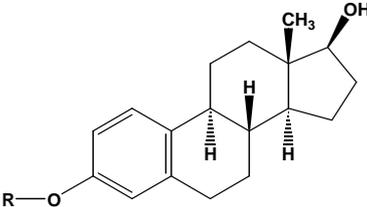
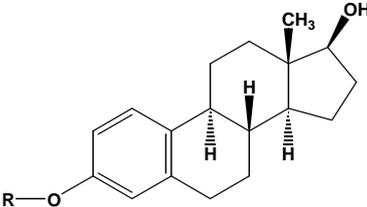
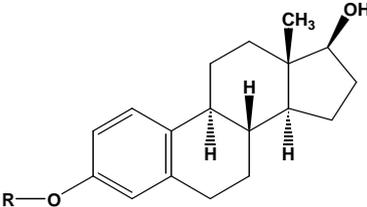
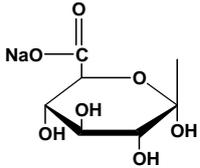
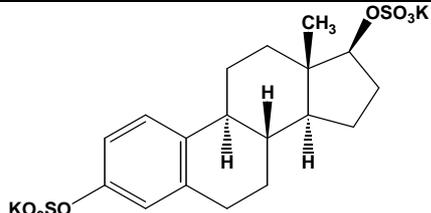
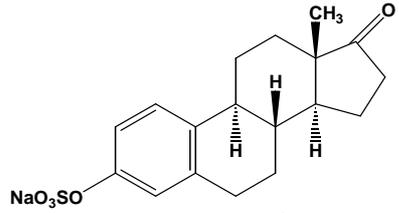
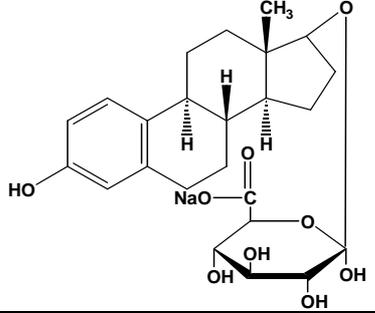
Composé	Structure	-R ₁	-R ₂	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
M5				91 \pm 1
HB2				96 \pm 2
HB3		-CH ₃		97 \pm 6
HB29				98 \pm 4
P- TM20				99 \pm 4
HB26		-CH ₂ -F	-H	12 \pm 2
HB40		-CH ₂ -COOH	-H	58 \pm 4
JD159				17 \pm 2

Annexe 7**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Dérivés stéroïdiens**

Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par des dérivés stéroïdiens (100 µM)

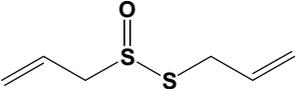
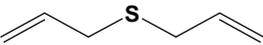
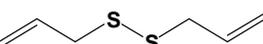
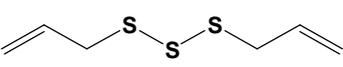
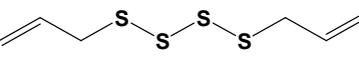
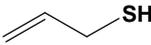
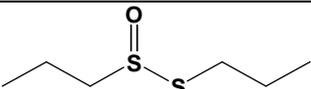
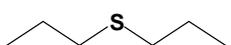
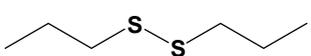
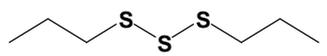
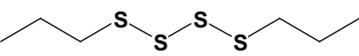
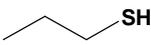
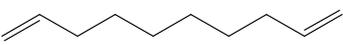
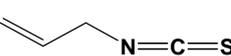
Composé	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)	Composé	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
ADT	98 ± 4	32	102 ± 2
HY	103 ± 5	36	109 ± 1
3α-diol	99 ± 2	39	88 ± 4
EM-2048	111 ± 4	41	98 ± 2
RM	96 ± 5	47	80 ± 6
A3	104 ± 4	53	96 ± 2
A8	100 ± 3	60	101 ± 3
A18	97 ± 5	64	102 ± 2
B8	91 ± 5	66	109 ± 1
B18	93 ± 9	68	88 ± 4
C8	98 ± 4	73	98 ± 2
C33	99 ± 7	75	80 ± 6
C48	94 ± 3	77	96 ± 2
C77	86 ± 7	78	101 ± 3
21	89 ± 11		

Evaluation *in vitro* de l'inhibition de CDC25A par des dérivés de l'estradiol (10 μ M)

Composé	Structure	-R	Activité CDC25A résiduelle (% du contrôle)
1 (17 β -estradiol)		-H	100 \pm 4
2		-SO ₃ Na	102 \pm 6
3			91 \pm 3
4			100 \pm 3
5			99 \pm 3
6			97 \pm 5

Annexe 8**Criblage d'inhibiteurs potentiels de CDC25 : Composés naturels organosoufrés**

Evaluation *in vitro* de l'inhibition des trois isoformes des phosphatases CDC25 par des composés organosoufrés naturellement présents dans l'ail et l'oignon (100 μ M)

	Composé	Structure	Activité CDC25 résiduelle (% du contrôle)		
			CDC25A	CDC25B	CDC25C
A I L	Alicine		26 \pm 16	67 \pm 8	7 \pm 2
	Diallyl sulfure (DAS)		> 100	94 \pm 4	88 \pm 8
	Diallyl disulfure (DAS ₂)		76 \pm 15	97 \pm 6	50 \pm 7
	Diallyl trisulfure (DAS ₃)		70 \pm 14	87 \pm 6	24 \pm 6
	Diallyl tétrasulfure (DAS ₄)		8 \pm 10	48 \pm 6	0 \pm 1
	Allyl mercaptan		> 100	94 \pm 4	82 \pm 8
O I G N O N	Propyl alicine		48 \pm 11	67 \pm 5	16 \pm 4
	Dipropyl sulfure (DPS)		> 100	99 \pm 4	96 \pm 4
	Dipropyl disulfure (DPS ₂)		99 \pm 4	96 \pm 1	68 \pm 3
	Dipropyl trisulfure (DPS ₃)		85 \pm 13	84 \pm 2	20 \pm 3
	Dipropyl tétrasulfure (DPS ₄)		12 \pm 8	58 \pm 8	2 \pm 2
	Propyl mercaptan		100 \pm 22	79 \pm 4	50 \pm 3
	1,9-décadiène		> 100	> 100	99 \pm 14
	3-isothiocyanatopropène		> 100	100 \pm 9	72 \pm 8

Annexe 9**Tableau 6 :** Préparation du milieu RPMI complet pour la culture des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et Vcr-R

Par flacon de 500 mL de RPMI sans rouge de phénol (4,5g/L Glucose, 3,7g/L NaHCO₃) ajouter stérilement :

	Quantité/500 mL	Concentration finale
Pyruvate de sodium	6,25 mL	1,25 mM
Acides aminés essentiels	5 mL	0,5 X
Acides aminés non essentiels	2,5 mL	0,5 X
L-Glutamine	5 mL	2 mM
Vitamines	2 mL	0,4 X
L-Sérine	1,8 mL	0,01 mg/mL
L-Asparagine	2 mL	0,02 mg/mL
Antibiotique/antifongique*	5 mL	100 UI/mL
SVF inactivé	56 mL	10 %

* Le mélange antibiotique/antifongique contient 10 000 UI/mL pénicilline G, 10 mg/mL streptomycine, 25 µg/mL amphotéricine B.

Tableau 7 : Préparation du milieu complet pour la culture des cellules hTERT-HME1

Ce milieu est constitué à 90 % de RPMI complet sans antibiotique/antifongique et à 10 % de milieu MEGM. Le milieu MEGM est préparé à partir du milieu MEBM (Cambrex) complété par :

	Quantité/500 mL	Concentration finale
Bovine Pituitary Extract (BPE)	2 mL	0,52 µg/mL
human epidermal growth factor (hEGF)	0,5 mL	10 ng/mL
Hydrocortisone	0,5 mL	0,5µg/mL
Insuline	0,5 mL	5 mg/mL

Sauf exceptions suivantes, l'ensemble des réactifs et solutions de culture ont été fournis par Eurobio (Les Ulis, France) :

- L-sérine et L-asparagine (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France)
- Amphotéricine B d'origine Streptomyces sp. (Fluka, St Quentin Fallavier, France)
- Mammary Epithelial Growth Medium (MEGM) par Cambrex (Walkersville, USA).

