



HAL
open science

Validation in silico de la valeur prédictive du gène codant la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) et caractérisation in vitro des effets de complexes organométalliques dans des modèles de cancers du sein

Florian Cornu

► To cite this version:

Florian Cornu. Validation in silico de la valeur prédictive du gène codant la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) et caractérisation in vitro des effets de complexes organométalliques dans des modèles de cancers du sein. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Lorraine, 2020. Français. NNT : 2020LORR0146 . tel-03128582

HAL Id: tel-03128582

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03128582>

Submitted on 20 Oct 2022

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>

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Florian CORNU**

**Validation *in silico* de la valeur prédictive du gène codant la protéine DDB2
(Damaged-DNA Binding 2) et caractérisation *in vitro* des effets de
complexes organométalliques dans des modèles de cancers du sein**

Le 28 Septembre 2020

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Monique DONTENWILL	DR CNRS, UMR7021 CNRS-Unistra, LBP, Strasbourg
	Mr Éric HERVOUET	MCU, UMR1098 Inserm-UFC-EFS, Besançon
Examineurs :	Mr Pascal REBOUL	PU, UMR7365 CNRS-UL IMoPA, Nancy
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	MCU, UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy, directrice de thèse
Invité :	Mr Antonio MONARI	MCU, UMR7019 CNRS-UL LPCT, Nancy, co-directeur de thèse

École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

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

par **Florian CORNU**

**Validation *in silico* de la valeur prédictive du gène codant la protéine DDB2
(Damaged-DNA Binding 2) et caractérisation *in vitro* des effets de
complexes organométalliques dans des modèles de cancers du sein**

Le 28 Septembre 2020

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Monique DONTENWILL	DR CNRS, UMR7021 CNRS-Unistra, LBP, Strasbourg
	Mr Éric HERVOUET	MCU, UMR1098 Inserm-UFC-EFS, Besançon
Examineurs :	Mr Pascal REBOUL	PU, UMR7365 CNRS-UL IMoPA, Nancy
	Mme Stéphanie GRANDEMANGE	MCU, UMR7039 CNRS-UL CRAN, Nancy, directrice de thèse
Invité :	Mr Antonio MONARI	MCU, UMR7019 CNRS-UL LPCT, Nancy, co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma gratitude à Mme Monique Dontenwill, Directrice de recherche CNRS (Strasbourg) et Mr Eric Hervouet, Chercheur Inserm à UFR-ST UFC (Besançon) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie également Mr Pascal Reboul, Professeur CNRS à IMoPA (Nancy) d'avoir accepté de juger ces travaux en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Stéphanie Grandemange et le Docteur Antonio Monari de m'avoir encadré tout au long de cette thèse. Stéphanie, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec toi en stage, de m'avoir préparé au concours de l'école doctorale, et d'ensuite m'avoir accompagné pendant ces 3 années de thèse. Travailler avec toi m'a appris la rigueur et la patience indispensables à la recherche. Antonio, je suis très reconnaissant pour ta vision chimiste, qui m'a poussé à envisager ce projet de thèse sous d'autres aspects. Je vous souhaite une bonne continuation à vous deux.

J'ai une pensée pour toutes les personnes du laboratoire que j'ai pu côtoyer à un moment ou un autre de ma thèse. Vanessa, je te remercie pour toutes ces discussions passionnantes sur des sujets variés allant de l'accouchement à la fonction publique. Il ne manque plus que toi chez France 3 ! Merci également pour ton savoir-faire inégalable en recherche, et ta disponibilité continue. Je te souhaite tout le bonheur du monde. Émilie, merci pour ta bonne humeur et ton calme, ainsi que pour tous les conseils que tu m'as prodigués. Audrey, ton passage au laboratoire, certes court, restera toujours gravé dans ma mémoire. Merci pour ta bonne humeur et pour ton aide. Je remercie également Elia qui réussit toujours à animer les repas de midi avec ses histoires.

Quand je me remémore cette thèse, je ne peux oublier mes collègues devenus amis, en particulier les « 5 mousquetaires » (on ne s'est jamais appelé comme cela, mais c'est ma thèse, je fais ce que je veux !). Mama, j'ai découvert en toi une personne formidablement honnête et droite, avec qui les discussions sérieuses (et moins sérieuses) sont d'une facilité déconcertante. Merci à toi pour ton soutien et tes conseils, et merci pour ce week-end en Bretagne qui nous a failli coûter cher tellement on a rit ! Mon Guigui, après avoir été mon professeur (notamment au cours d'une dissection de merlan où tu excellais par des compétences théoriques et pratiques

... !), j'ai découvert ta personnalité en stage et au début de ma thèse. Tu as été d'une aide précieuse autant en recherche que personnellement. Nos chemins professionnels ne se sont pas séparés à la fin de ta thèse, puisque tu m'as collé jusqu'à Strasbourg pour notre formation avec des camarades, disons, authentiques. Je suis fier et heureux de te compter comme ami proche, avec ta femme pétillante Amélie et ton petit garçon d'amour. Claire/Foufoune, je ne peux pas compter le nombre de fois où on a rit, pleuré, et critiqué ensemble, tellement il y en a eu. Tu es une personne tellement formidable, gentille et drôle (indépendamment de ta volonté la plupart du temps...). J'espère que Rom's Rom's et Shadow s'occupe bien de ton genou. Chacha, tu es celle qui est restée le plus longtemps « physiquement » à mes côtés, entre ta thèse et ton ATER à la fac de sciences. Tu m'as soutenu dans des moments difficiles, et tu m'as fait sourire et rire dans tellement d'autres moments. Je ne vais pas revenir sur à quel point tu comptes pour moi, car je te connais, tu vas avoir besoin de tellement de mouchoirs que Foufoune va devoir nous faire un diapo sur l'impact environnemental.... Merci à vous 4 pour votre amitié sans faille qui va durer encore longtemps.

Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai eu la chance et le privilège de me rapprocher de 2 personnes extraordinaires : Marine numéro 4354134 et Alexandra. Si la terrasse pouvait parler, elle en raconterait des choses ! Alexandra, merci pour ta bonne humeur, ton soutien et ton amitié, je ne t'oublierai pas de si tôt. Marine, j'ai tellement de chose à dire à ton sujet que ton paragraphe serait plus grand que toi ... Tu es une boule d'énergie et d'amour qui ne s'arrête jamais. Je sens que tu iras très loin en recherche, tu as tout ce qu'il faut pour. Merci pour tous ces fous rires, ces discussions plus ou moins sérieuses pendant les repas de midi et les pauses. Je suis tellement heureux de te considérer comme mon amie.

J'ai une pensée également pour toutes les personnes du 9^{ème} étage que j'ai côtoyé pendant 3 ans : Catherine, Isabelle, Sandra, Sabine, Stéphane, Amand et Nadège. Nos discussions m'ont été précieuses.

Au cours de cette thèse, j'ai également eu la chance d'enseigner. Je tiens ainsi à remercier toutes les personnes qui m'ont fait confiance, en particulier Stéphanie, Nadège, Sandra et Sabine. J'ai pu apprendre grâce à vous ce qui fait un bon enseignant. Je remercie également tous les étudiants qui m'ont eu en cours et en stage, notamment Annaïck. J'ai eu le plaisir de t'accompagner pendant tes stages de L3 et de M1, au cours desquels notre relation étudiant-professeur s'est transformée en une véritable amitié. J'ai rarement autant rit avec une

personne. J'ai découvert en toi une personne de confiance, et je sais que nos chemins ne vont pas se séparer de si tôt. Je peux te dire avec certitude que tu iras très loin dans tout ce que tu veux entreprendre. A travers toi, j'ai également fait la connaissance de ta compétition ultime, j'ai nommé le brillant Reuben. Je suis heureux d'avoir fait ta connaissance et de te compter parmi mes amis. Et un grand merci pour tous les UberEats que tu m'as payé, indépendamment de ta volonté bien sûr. Tu vas également briller dans la recherche, c'est une certitude.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui n'étaient pas physiquement présents au laboratoire, mais qui ont rendu cette thèse tellement plus agréable. Je remercie évidemment en premier ma Marion. Après notre rencontre en M1, nos chemins ne se sont plus jamais écartés, pour mon plus grand plaisir. Tu es l'une des personnes les plus importantes de ma vie, et sans toi, je n'aurais jamais tenu la distance de cette thèse. Merci pour tes conseils, ton soutien et ton amitié infaillible. Marion, on y est enfin arrivé : on est docteurs ! Je remercie également mes amis de Thionville, notamment Marine et Gaëtan. Marine, nous nous sommes rencontrés pour la 1^{ère} fois en Terminal, même si nous avons grandi l'un à côté de l'autre sans le savoir. Après 8 ans d'amitié, je sais au fond de moi, que toi et moi, c'est pour la vie. Je remercie également mes amis du centre aéré : Élise, Célia, Franz, Ophélie, Marine, Léa, Adeline, Faustine et Matthias. Merci pour votre amitié, mais arrêtez de faire des enfants, le budget cadeau ne suit pas ! Je remercie également mes amis de Nancy, qui sont devenus Toulousains pour la plupart : Carmen, Claudia, Hugo et Alison. J'ai de la chance d'avoir des amis comme vous, avec qui chaque moment est un bonheur.

Pendant cette thèse, j'ai également rencontré un homme formidable qui fait maintenant partie intégrante de ma vie : Julien. Même si une certaine personne (Marine) dira que c'est grâce à elle que nous nous sommes rencontrés, on sait tous les deux que ce n'est pas vrai ! S'il y a bien une personne à remercier pour le soutien quotidien pendant cette thèse, c'est toi. Tu as réussi à me remotiver quand la motivation n'était plus là, à sécher mes larmes, à s'enthousiasmer de mes réussites, à me consoler de mes échecs, à faire disparaître mes doutes et mes craintes. Les mots me manquent pour décrire à quel point tu es important pour moi. Je nous souhaite une longue vie heureuse ensemble. Je ne peux évidemment pas oublier le 2^{ème} homme que cette thèse m'a apporté : mon petit O'malley. Tu étais là au quotidien pendant la grande majorité de cette thèse, et tant que je te donnais de la carotte, tu m'as soutenu pendant toute cette période.

Je remercie finalement toute ma famille qui m'a aidé tout au long de cette thèse. Je remercie en particulier mes parents, qui m'ont donné la chance de poursuivre des études longues. Maman, Papa, merci d'avoir toujours cru en moi, et merci pour votre amour inconditionnel. Je remercie également mes grands-parents. Merci pour votre intérêt et vos questions, mais surtout votre soutien. Papi, tu nous as quitté à quelques jours du rendu du manuscrit, mais je sais que tu es fier de moi. J'ai une énorme pensée pour mes deux frères : Quentin et Matthieu. Matthieu, je te souhaite tout le bonheur du monde avec Fanny, Marie, Lucas et le petit dernier qui arrive. Je remercie tous les autres membres de ma famille, mes oncles/tantes et cousins/cousines, qui ont participé, à leur manière, à cette thèse.

A mon grand-père...

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	10
LISTE DES ABBREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION.....	24
I. LE CANCER DU SEIN.....	24
<i>I. 1. Épidémiologie & Facteurs de risque.....</i>	<i>24</i>
I. 1. 1. Épidémiologie.....	24
I. 1. 2. Facteurs de risques.....	24
<i>I. 2. Carcinogenèse mammaire.....</i>	<i>25</i>
I. 2. 1. Initiation.....	25
I. 2.1. 1. Mutations génétiques et initiation de la tumorigenèse mammaire.....	25
I. 2.1. 2. Modifications épigénétiques et initiation de la tumorigenèse mammaire.....	27
I. 2. 2. Promotion et progression.....	29
<i>I. 3. Classifications.....</i>	<i>31</i>
I. 3. 1. Classification basée sur des critères phénotypiques.....	31
I. 3. 2. Basée sur des critères moléculaires.....	32
<i>I. 4. Traitements.....</i>	<i>33</i>
I. 4. 1. Chirurgie.....	33
I. 4. 2. Radiothérapie.....	33
I. 4. 3. Chimiothérapie.....	34
I. 4. 3. 1. Doxorubicine.....	36
I. 4. 3. 2. 5-Fluorouracile.....	39
I. 4. 3. 3. Protocoles de chimiothérapie dans le cancer du sein.....	41
I. 4. 4. Hormonothérapie & Thérapies ciblées.....	41
II. LA RECHERCHE EN CANCEROLOGIE.....	45
<i>II. 1. La protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2).....</i>	<i>45</i>
II. 1. 1. Structure du gène et de la protéine.....	45
II. 1. 2. Rôles de DDB2 dans le cancer.....	46
II. 1. 2. 1. Rôle dans la prolifération des cellules tumorales.....	46
II. 1. 2. 2. Rôle dans la migration et l'invasion tumorale.....	47
II. 1. 2. 3. Rôle dans l'apoptose.....	49
II. 1. 3. Régulation de l'expression de DDB2.....	50
II. 1. 4. La protéine DDB2 en clinique.....	51
<i>II. 2. Les complexes organométalliques dans le traitement du cancer.....</i>	<i>53</i>
II. 2. 1. Généralités sur les complexes organométalliques.....	53

II. 2. 2. Les complexes à base de platine	55
II. 2. 2. 1. Le cisplatine	55
II. 2. 2. 2. Mécanismes de résistance au cisplatine	58
II. 2. 2. 3. 2 ^{ème} génération de complexes à base de platine	59
a. Le carboplatine	59
b. L'oxaliplatine	61
II. 2. 3. Les complexes organométalliques à base de Fer	62
II. 2. 3. 1. Le Fer dans le cancer	62
II. 2. 3. 2. Le Ferrocène	63
II. 2. 3. 3. Les ions Ferrocénium	64
II. 2. 3. 4. Les conjugués à base de Ferrocène	65
a. Les conjugués Ferrocène-azoles	65
b. Les conjugués Ferrocène-acide rétinoïque	66
c. Les conjugués Ferrocène-peptides	66
d. Les conjugués Ferrocène-analogues nucléotidiques	67
e. Les conjugués Ferrocène-Tamoxifène	67
II. 2. 4. Les complexes à base de Ruthénium	69
II. 2. 4. 1. Généralités	69
a. Transport par la Transferrine	69
b. Activation par réduction	70
c. Interaction avec l'ADN	70
II. 2. 4. 2. NAMI-A	71
II. 2. 4. 3. KP1019	72
II. 2. 4. 4. Autres complexes	73
II. 2. 5. Conclusion sur les complexes organométalliques	74
III. LA SENESCENCE CELLULAIRE	75
<i>III. 1. Introduction</i>	75
III. 1. 1. Sénescence répllicative	75
III. 1. 2. Sénescence prématurée	77
III. 1. 3. Sénescence vs quiescence	78
<i>III. 2. Marqueurs de la sénescence</i>	80
III. 2. 1. Modifications phénotypiques	80
III. 2. 2. Activation du DDR (DNA-Damage Response)	81
III. 2. 3. Augmentation du contenu lysosomal	81
III. 2. 4. Modifications nucléaires	81
III. 2. 5. Acquisition d'un phénotype sécrétoire	81
<i>III. 3. Rôles de la sénescence</i>	82
III. 3. 1. Rôle antitumoral	82
III. 3. 2. Rôle protumoral	83
III. 3. 3. Sénescence et réponse aux traitements	84
III. 3. 4. Ciblage de la sénescence	86

HYPOTHESES & OBJECTIFS	88
MATERIEL & METHODES	91
PARTIE 1 : ÉTUDE <i>IN VITRO</i>	91
I. CULTURE CELLULAIRE	91
<i>I. 1. Lignées cellulaires.....</i>	<i>91</i>
<i>I. 2. Conditions de culture.....</i>	<i>91</i>
<i>I. 3. Traitements.....</i>	<i>92</i>
I. 3. 1. Traitements avec les molécules AIMs.....	92
I. 3. 2. Traitements avec des agents de chimiothérapie.....	92
I. 3. 3. Exposition aux Ultra-Violets.....	93
I. 3. 4. Exposition à des rayons ionisants utilisés en radiothérapie.....	93
II. ÉTUDE DE LA PROLIFERATION	93
<i>II. 1. Par comptage cellulaire</i>	<i>93</i>
<i>II. 2. Par analyse du cycle cellulaire</i>	<i>93</i>
<i>II. 3. Par mesure de l'incorporation de l'EdU</i>	<i>94</i>
III. ÉTUDE DE LA SYNERGIE D'ACTION.....	95
IV. ÉTUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE	96
<i>IV. 1. Au niveau transcriptionnel.....</i>	<i>96</i>
IV. 1. 1. Extraction des ARNs totaux	96
IV. 1. 2. Transcription inverse des ARNs (RT).....	96
IV. 1. 3. Réaction de polymérisation (PCR)	96
<i>IV. 2. Au niveau traductionnel.....</i>	<i>98</i>
IV. 2. 1. Extraction des protéines totales	98
IV. 2. 2. Dosage des protéines	98
IV. 2. 3. Électrophorèse et transfert sur membrane	98
IV. 2. 4. Détection immunologique	99
V. ÉTUDE DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN ESPECES REACTIVES DE L'OXYGENE	99
<i>V. 1. Par la sonde DHE.....</i>	<i>99</i>
<i>V. 2. Par la sonde MitoSox</i>	<i>100</i>
VI. MARQUAGES DES CASSURES DOUBLES BRINS DE L'ADN	100
VII. ÉTUDE DE L'ACTIVITE DE LA SA-B-GALACTOSIDASE	101
<i>VII. 1. Par cytométrie en flux (sonde C12FDG)</i>	<i>101</i>
<i>VII. 2. Par marquage colorimétrique de la SA-β-Galactosidase.....</i>	<i>102</i>
VIII. ANALYSES STATISTIQUES	102
PARTIE 2 : ÉTUDE <i>IN SILICO</i>.....	103
I. ANALYSE DU NIVEAU PROTEIQUE DE DDB2 DANS DIFFERENTS TISSUS HUMAINS.....	103
II. ANALYSE DES ALTERATIONS DU GENE CODANT DDB2	103
III. ANALYSE DU NIVEAU DE TRANSCRITS CODANT DDB2.....	104

III. 1. Par Oncomine.....	104
III. 2. Par BCIP.....	104
III. 3. Par GEPIA.....	104
IV. ÉTUDE DE LA SURVIE SELON L'EXPRESSION DE DDB2.....	104
IV. 1. Par BCIP.....	104
IV. 2. Par PrognoScan.....	105
IV. 3. Par Kaplan-Meier Plotter.....	105
IV. 4. Par SurvExpress.....	105
RESULTATS.....	107
I. VALIDATION DU POTENTIEL PREDICTIF DE DDB2 DANS LE CANCER DU SEIN PAR UNE ETUDE IN SILICO.....	107
I. 1. Analyse de l'expression de DDB2 dans des tissus humains sains.....	107
I. 2. Comparaison du niveau d'expression de ddb2 entre tissus sains et tissus cancéreux.....	107
I. 3. Analyse de l'expression de ddb2 dans le cancer du sein.....	108
I. 4. Comparaison de l'expression de ddb2 selon le pronostic des tumeurs mammaires.....	109
I. 4. 1. Validation du potentiel prédictif de l'expression de dd2 lors de la progression métastatique des tumeurs mammaires.....	110
I. 4. 2. Validation du potentiel prédictif de ddb2 dans la réponse thérapeutique des tumeurs mammaires.....	111
I. 4. 3. Validation du potentiel prédictif de ddb2 lors de l'apparition de récurrences.....	111
II. ÉTUDE DES MECANISMES A L'ORIGINE DE L'EFFET CYTOSTATIQUE D'AIM2 ET AIM3 DANS DES LIGNEES MAMMAIRES.....	112
II. 1. Étude des relations structures/fonctions antiprolifératives des complexes organométalliques à base de fer.....	112
II. 2. Étude de l'induction de la sénescence par AIM2 et AIM3.....	113
II. 2. 1. Observation du phénotype des cellules traitées.....	113
II. 2. 2. Analyse de l'activité de la SA-β-Galactosidase.....	115
II. 2. 2. 1. Par cytométrie en flux.....	115
II. 2. 2. 2. Par colorimétrie.....	116
II. 2. 3. Réversibilité de la sénescence.....	118
II. 2. 4. Étude des mécanismes moléculaires à l'origine de l'induction de la sénescence par les complexes AIM2 et AIM3.....	120
II. 2. 4. 1. Analyse de l'expression de p21.....	120
II. 2. 4. 2. Analyse de la quantité intracellulaire en ROS.....	121
II. 2. 4. 3. Analyse des lésions de l'ADN induites par AIM2 et AIM3.....	122
II. 3. Conclusion.....	124
III. EFFET D'UN PRETRAITEMENT AVEC AIM2 OU AIM3 SUR LA SENSIBILITE DE CELLULES TUMORALES MAMMAIRES A DIFFERENTS TRAITEMENTS ANTICANCEREUX.....	125
III. 1. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires au Tamoxifène.....	126

<i>III. 2. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires à la Doxorubicine et au 5-Fluorouracile</i>	127
<i>III. 3. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires aux rayons ionisants utilisés en radiothérapie</i>	129
<i>III. 4. Conclusion</i>	130
DISCUSSION GENERALE	132
I. LE GENE CODANT DDB2 COMME BIOMARQUEUR DANS LE CANCER DU SEIN	132
II. EFFET DES COMPLEXES AIM2 ET AIM3 SUR LA SENESCENCE DE CELLULES TUMORALES MAMMAIRES ET LEUR REPOSE A DIFFERENTS TRAITEMENTS	138
CONCLUSION & PERSPECTIVES	158
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	164
CURRICULUM VITAE	199

TABLE DES ILLUSTRATIONS

INTRODUCTION

- Figure 1 :** *Évolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein entre 1975 et 2015.*
- Figure 2 :** *Schéma représentatif de la carcinogenèse mammaire selon le modèle initiation-promotion-progression.*
- Figure 3 :** *Schéma représentatif de la transition épithélio-mésenchymateuse.*
- Figure 4 :** *Représentation schématique de la classification histologique des tumeurs mammaires.*
- Figure 5 :** *Représentation schématique de la classification moléculaire des tumeurs mammaires.*
- Figure 6 :** *Représentation schématique du mode d'action des agents alkylants.*
- Figure 7 :** *Représentation schématique du mode d'action de la Doxorubicine.*
- Figure 8 :** *Représentation schématique du métabolisme de 5-Fu.*
- Figure 9 :** *Représentation schématique du mode d'action des anti-œstrogènes.*
- Figure 10 :** *Représentation schématique du rôle de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires.*
- Figure 11 :** *Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle du gène codant la protéine DDB2.*
- Figure 12 :** *Représentation schématique de la régulation post-transcriptionnelle de DDB2.*
- Figure 13 :** *Représentation schématique du rôle de DDB2 comme marqueur clinique de la progression métastatique de différents cancers.*
- Figure 14 :** *Représentation schématique du devenir intracellulaire du cisplatine.*
- Figure 15 :** *Représentation schématique des mécanismes moléculaires de résistance au cisplatine.*
- Figure 16 :** *Structure chimique des composés à base de platine de 2^{ème} génération.*
- Figure 17 :** *Représentation schématique du devenir du fer.*

- Tableau 1 :** *Tableau récapitulatif de certains conjugués de ferrocène.*
- Figure 18 :** *Représentation schématique du devenir du Ruthénium.*
- Figure 19 :** *Structure chimique de certains composés à base de Ruthénium.*
- Figure 20 :** *Représentation schématique des mécanismes de sénescence répllicative et prématurée.*
- Figure 21 :** *Représentation schématique des différences entre cellules prolifératives, cellules quiescentes et cellules sénescents.*
- Figure 22 :** *Représentation schématique de l'effet antitumoral de la sénescence cellulaire.*
- Figure 23 :** *Représentation schématique de l'effet protumoral de la sénescence cellulaire.*
- Figure 24 :** *Mise en évidence l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 sur une lignée cancéreuse mammaire et une lignée mammaire saine.*
- Figure 25 :** *Analyse de la réversibilité d'un traitement de 72h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 et des cellules mammaires saines MCF-10A.*
- Figure 26 :** *Mise en évidence de la capacité de la molécule AIM2 à induire une diminution du taux de 5-méthylcytosines.*

MATERIEL & METHODES

- Tableau 2 :** *Caractéristiques des lignées cellulaires mammaires utilisées au cours de ce travail.*
- Figure 27 :** *Représentation de la structure chimique des différents complexes à base de Fer (AIM1, AIM2 et AIM3) et à base de Ruthénium (Ru).*
- Figure 28 :** *Représentation schématique du protocole d'étude de la synergie d'action entre les molécules AIMs et des agents de chimiothérapie.*
- Tableau 3 :** *Tableau récapitulatif des amorces utilisées par les expériences de RT-PCR semi-quantitative et en temps réel.*
- Tableau 4 :** *Liste des anticorps utilisés au cours des expériences de Western.*
- Tableau 5 :** *Liste des anticorps utilisés au cours des expériences d'études des lésions de l'ADN.*
- Figure 29 :** *Représentation schématique du protocole d'étude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la sénescence cellulaire.*

RESULTATS

- Figure 30 :** *Niveau d'expression de la protéine DDB2 dans différents tissus humains.*
- Figure 31 :** *Comparaison du taux d'ARNm codant DDB2 entre différents tissus sains et cancéreux.*
- Figure 32 :** *Comparaison du taux de transcrits codant DDB2 entre tissus mammaires sains et cancéreux.*
- Figure 33 :** *Fréquences des altérations génétiques du gène ddb2 dans différents cancers.*
- Figure 34 :** *Comparaison du niveau d'expression de ddb2 dans des tumeurs mammaires selon leur signature moléculaire.*
- Figure 35 :** *Comparaison du niveau d'expression de ddb2 selon l'agressivité et le pronostic de tumeurs mammaires.*
- Figure 36 :** *Comparaison du niveau d'expression de ddb2 selon le statut métastatique de tumeurs mammaires.*
- Figure 37 :** *Comparaison de la survie globale avec thérapie adjuvante et de la survie sans récurrence après thérapie adjuvante de patientes atteintes de tumeurs mammaires selon le niveau d'expression de ddb2.*
- Figure 38 :** *Corrélation entre le niveau d'expression de ddb2 et le risque de récurrence de tumeurs mammaires traitées à l'aide de thérapie adjuvante.*
- Figure 39 :** *Étude de l'effet antiprolifératif des molécules AIM1 et Ru sur les cellules MDA-MB231 et MCF-10A.*
- Figure 40 :** *Étude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la morphologie et la taille des noyaux des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*
- Figure 41 :** *Étude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la granulosité et la taille des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*
- Figure 42 :** *Étude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A par cytométrie en flux.*
- Figure 43 :** *Étude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A par cytométrie en flux.*
- Figure 44 :** *Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*

- Figure 45 :** *Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur l'entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A par colorimétrie.*
- Figure 46 :** *Étude de la réversibilité d'un traitement de 96h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*
- Figure 47 :** *Étude de la réversibilité d'un traitement de 96h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*
- Figure 48 :** *Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur le taux d'ARNm codant p21 et sur le taux protéique de p21 dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.*
- Figure 49 :** *Étude de l'impact des molécules sur la quantité intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules MDA-MB231.*
- Figure 50 :** *Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la formation de cassures doubles brins de l'ADN dans les cellules MDA-MB231.*
- Figure 51 :** *Effet du temps de traitement avec AIM2/3 et du temps post-irradiation dans les cellules MDA-MB231.*
- Figure 52 :** *Effet potentialisateur de la molécule AIM2 face à la mort induite par les UVs dans les cellules MDA-MB231.*
- Figure 53 :** *Étude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou du Tamoxifène.*
- Figure 54 :** *Étude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à sensibiliser les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A au Tamoxifène.*
- Figure 55 :** *Étude de la réinduction génique par les molécules AIMs.*
- Tableau 6 :** *Tableau récapitulatif des résultats de synergie (CI) après coloration au cristal violet et des résultats de potentialisation par l'étude du clivage de PARP (cPARP) dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A en présence d'AIM2/3 et de Tamoxifène.*
- Figure 56 :** *Étude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou de la Doxorubicine.*
- Figure 57 :** *Étude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou de 5-Fluorouracile.*
- Figure 58 :** *Étude de l'effet sensibilisateur des molécules AIM2 et AIM2 dans les cellules MDA-MB231.*
- Figure 59 :** *Étude de l'effet sensibilisateur des molécules AIM2 et AIM2 dans les cellules T47D et MCF-10A.*

Tableau 7 : *Tableau récapitulatif des résultats de synergie (CI) après coloration au cristal violet et des résultats de potentialisation par l'étude du clivage de PARP (cPARP) dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A en présence d'AIM2/3 et de Doxorubicine ou de 5-Fluorouracile.*

Figure 60 : *Analyse du cycle cellulaire des cellules mammaires saines MCF-10A traitées avec AIM3 et/ou avec deux agents de chimiothérapie (Doxorubicine et 5-Fluorouracile).*

Figure 61 : *Effet potentialisateur des molécules AIM2/3 face à des rayonnements de radiothérapie dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A.*

DISCUSSION

Figure 62 : *Représentation schématique des effets cellulaires des complexes AIM2 et AIM3 sur différentes lignées mammaires.*

LISTE DES ABBREVIATIONS

5, 6

5aza	5-azadésoxycytidine
5-Fu	5-Fluorouracile
5-FUH2	5-Fluorodihydrouracile
5mC	5-méthylcytosine
6-4 PP	6,4 pyrimidine-pyrimidone

A

ABC	ATP-binding cassette transporter
ABCB4	ATP-binding cassette subfamily B member 4
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
ALDH1A1	Aldéhyde déshydrogénase 1 family member A1
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANSM	Agence nationale de sécurité des médicaments
ANXA2	Annexin A2
AP2	Activating protein
APC	Adenomatous polyposis coli
AR	Androgen receptor
ARF	Alternative reading frame
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATF6a	Activating transcription factor 6 alpha
ATG	Autophagy-related protein
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATP7A/B	ATPase copper transporting alpha/beta
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3 related

B

Bax	BCL2 associated X
BCIP	Breast cancer integrative platform
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BER	Base excision repair
BRCA1/2	Breast cancer associated 1/2
BSA	Bovine serum albumin

C

c-MYC	c-myelocytomatosis oncogene product
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
C12FDG	5-dodécanylaminofluorescéine di-beta-D- galactopyranoside
CD	Cluster de différenciation
CDDDP	cis-diaminedichloroplatine(II)
CDH1	Chromodomain helicase DNA binding protein 1
CDK	Cycline depend kinase
CDKN1/2A	Cyclin depend kinase inhibitor 1/2A
Chk1/2	Checkpoint kinase ½
CI	Combination index
CMF	Cyclophosphamide-Méthotrexate-5-Fluorouracile
CMV	Cytomégalovirus
CO ₂	Dioxyde de carbone
COX2	Cyclooxygénase
CPD	Cyclobutane pyrimidine dimer
CSF-1R	Colony stimulating factor 1 receptor
Ct	Cycle threshsold
ctDNA	Circulating tumor DNA
CTGF	Connective tissue growth factor
CTR1/2	Copper transport protein 1/2
Cul4A	Cullin-4A

D

D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
-------	--------------------------------------

DACH	1,2-Diaminocyclohexane
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DDB1/2	Damaged-DNA binding 1/2
DDR	DNA-damaged response
DHE	Dihydroethidium
DHFR	Dihydrofolate réductase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMT1	Divalent metal transporter 1
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT1	DNA methyltransferase 1
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DPD	Dihydropyrimidine déshydrogénase
dTMP	Désoxythymidine monophosphate
DTT	Dithiothréitol
dUMP	Désoxyuridine monophosphate

E

E2F1	E2F transcription factor 1
EAT	Ehrlich ascites tumor
EDTA	éthylènediaminetétraacétique
EdU	5-éthynyl-2'-désoxyruridine
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ENOA	Enolase A
EPHB1	Ephrin type-B receptor 1
ER α / β	Estrogen receptor alpha/beta
ERCC1/4	ERCC excision repair 1
ERE	Estrogen receptor element
ESR1	Estrogen receptor 1
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2

F, G

Fab	Fragment antigen-binding
-----	--------------------------

FAC	5-Fluorouracile-Doxorubicine-Cyclophosphate
FAK	Focal adhesion kinase
Fc	Ferrocène
FDA	Food and drug administration
FdUMP	fluorodésoxyuridine monophosphate
FdUTP	fluorodésoxyuridine triphosphate
Fe	Fer
FLT3	Fetal liver tyrosine kinase 3
FOXC1	Forkhead box C1
FSC	Forward Scatter
FUTP	fluorouridine triphosphate
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GEPIA	Gene expression profiling interactive analyse
GFP-LC3	Green fluorescent protein-LC3
GLB1	Galactosidase beta 1
GSH	Glutathion

H, I

H2AX	Variant de l'histone H2A
H ₂ DCFDA	2'-7'-dichlorodihydrofluorescein
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HAT	Histone acétyltransférase
HCl	Chlorure d'hydrogène
HDAC	Histone désacétylase
HDMT	Histone déméthylase
hEGF	Human Epidermal growth factor
HEPES	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonic acid
HER2	Human epithelial receptor 2
HMGB1	High mobility group box 1
hMOF	Human male absent of the first
HMT	Histone méthyltransférase
HOXA5	Homebox A5
HP1	Heterochromatin protein 1

HR	Hazard ratio
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncoprotein
IC50	Inhibitory concentration 50
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobuline G
IKB α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
IL	Interleukine
INCa	Institut nation du cancer
IP	Indice pronostic
IRES	Internal ribosome entry site

J, K, L

JMJD2c	Jumonji domain 2C
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Chlorure de potassium
Klrbl	Killer cell lectin like receptor B1
LC3	Light chain 3
LKB1	Liver kinase B1
LLC	Lewis lung carcinoma
lncRNA	Long non coding RNA
LSD1	Lysine-specific histone déméthylase 1

M

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCa	Mouse mammary carcinoma
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
MDM2	Murine double minute 2
MEF	Mouse embryonic fibroblast
MgCl ₂	Chlorure de manganèse
MGMT	6-O-méthylguanine-ADN méthyltransférase
miR	Micro-RNA

MMP	Matrix metallopeptidase
MnSOD	Superoxyde dismutase à manganèse
MRP-2	Multidrug resistance-associated protein 2
mTOR	Mechanistic target of rapamycin

N

NAC	N-acétylcystéine
NaCl	Chlorure de sodium
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NBS1	Nibrin 1
Ncf2	Neutrophil cytosolic factor 2
NEDD4L	NEDD4 like E3 ubiquitin protein ligase
NER	Nucleotide excision repair
NES1	Nesfatin 1
NF-1	Neurofibromin 1
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural killer
NLS	Nuclear localization signal
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1
NSCLC	Non small cells lung cancer

O, P

O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OCT2 (SLC22A2)	Solute carrier family 22 member 2
PAF	Paraformaldéhyde
PAQR3	Progesterin and adipoQ receptor family member 3
PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGR	Progesterone receptor
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

PKC	Protein kinase C
PR	Progestérone
pRB	Phosphorylated retinoblastoma protein
PSMB1	Proteosome subunit beta type-1 precursor
PTEN	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PVDF	Polyvinylidene fluoride

R

RASSF1A	Ras association domain family member 1
Rb	Retinoblastoma protein
RCMI	Radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité
RGD	Arginine-glycine-Acide Aspartique
RNF43	Ring finger protein 43
ROC1	Homeobox-leucine zipper protein 1
ROS	Reactive oxygen species
RPLPO	Large ribosomal protein
RPMI	Roswell park memorial institute medium
RT-qPCR	Reverse transcriptase-quantitative PCR
Ru	Ruthénium

S

SA-β-Gal	Senescence associated-Beta-Galactosidase
SAHF	Senescence associated heterochromatin foci
SASP	Senescence associated secretory phenotype
Sat2	Juxtacentrometric satellite 2
Satα	Centrometric satellite alpha
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
SDS	Sodium dodécylsulfate
SEM	Erreur standard de la moyenne
SERD	Selective estrogen receptor degradation
SERM	Selective estrogen receptor modulator
siRNA	Small-interference RNA
SMVT	Sodium dependent multivitamin transport

SOD2	Superoxyde dismutase
SSC	Side scatter
STAT1/3	Signal transducer and activator of transcription 1/3
STK11	Serine/threonine kinase 11
SVF	Sérum de veau fœtal

T

TBE	Tris, acide borique, EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TCF3	Transcription factor 2
TCGA	The cancer genome atlas
TC-NER	Transcription Coupled-Nucleotide Excision Repair
TEM	Transition épithélio-mésenchymateuse
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TET2	Tet méthylcytosine disoxygénase
TFEB	Transcription factor EB
TFR	Transferrin receptor
TGFβ	Transforming growth factor beta
TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3
TNBC	Triple negative breast cancer
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TNM	Tumor – node – metastasis
TP53	Tumor protein 53
TP53BP1	Tumor protein 53 binding protein 1
TS	Thymidylate synthase
TSA	Trichostatin A
TWIST	Twist related protein

U, V, W, X, Z

UBB	Ubiquitin B
UTR	Untranslated region
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelium growth factor

WD40	Tryptophane-aspartate 40
WT	Wild-type
XPA/E	Xeroderma pigmentosum group A/E
XRCC1	X-ray repar cross complementing 1
ZEB	Zing finger E-box binding homeobox 1

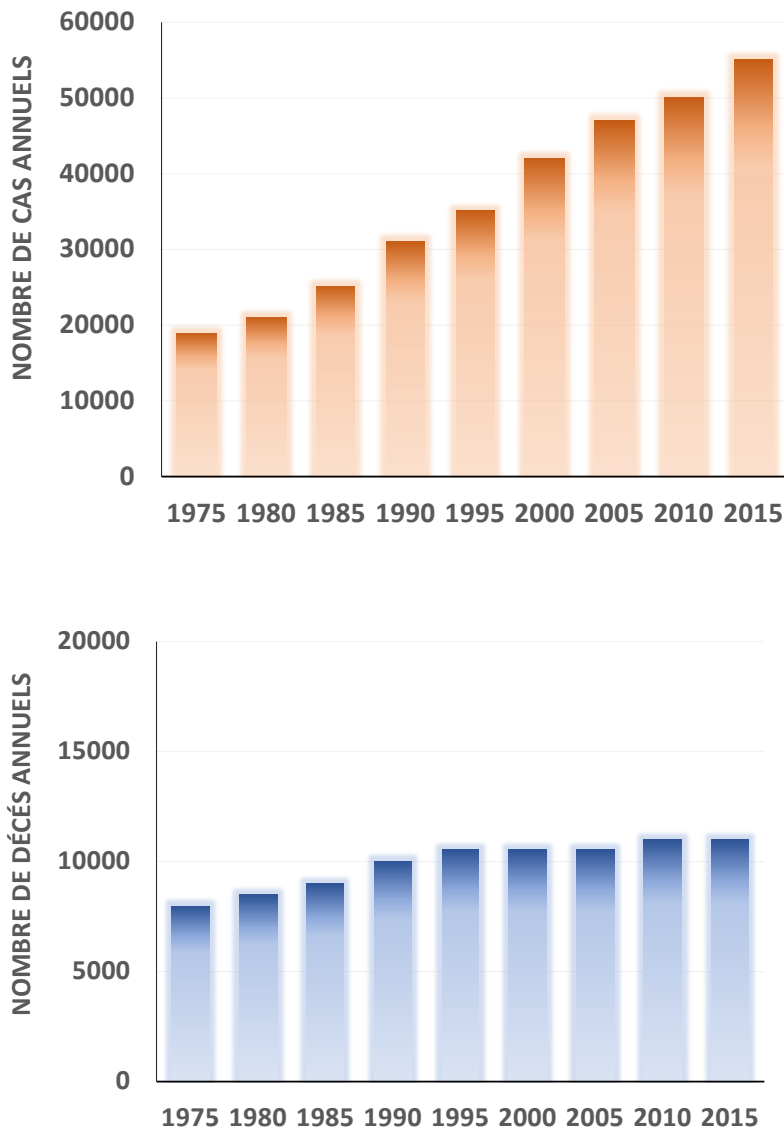


Figure 1. Evolution de l'incidence et de la mortalité du cancer du sein entre 1975 et 2015 en France. Le nombre de cas annuels déclarés et le nombre de décès annuels causés par le cancer du sein en France sont présentés. D'après (Bray et al., 2018).

INTRODUCTION

I. Le cancer du sein

I. 1. Épidémiologie & Facteurs de risque

I. 1. 1. Épidémiologie

Le cancer du sein est le second cancer le plus fréquent au monde tous genres confondus, et le plus fréquent chez les femmes, représentant 16% de l'ensemble des cancers féminins (World Cancer Research Fund, WCRF). Il correspond à l'une des causes principales de mortalité au monde, avec environ 12 000 décès en France en 2018 (Bray *et al.*, 2018). Pour autant, cette mortalité a légèrement diminué depuis 1975, alors que son incidence a fortement augmenté (**Figure 1**). L'incidence augmente proportionnellement avec l'âge de la patiente, avec moins de 10% des cas se révélant avant 40 ans, et un âge médian lors du diagnostic d'environ 61 ans. L'augmentation du nombre de cas annuels s'explique par l'amélioration des techniques de dépistage, et notamment grâce au programme de dépistage proposé en France à toutes les femmes de 50 à 74 ans. Ce test permet, dans certains cas, la découverte de tumeurs mammaires à des stades précoces, qui sont généralement de bon pronostic. Cette prise en charge précoce, ainsi que l'amélioration des traitements employés, permettent d'expliquer la diminution de la mortalité du cancer du sein. En termes de chiffre, le taux de survie à 5 ans était de 80% pour les femmes diagnostiquées entre 1989 et 1993, et ce taux est passé à 85% pour les femmes diagnostiquées entre 2005 et 2010 (INCa). Le taux de mortalité est en baisse d'environ 1,5% par an depuis 2005. Là encore, il existe une corrélation entre la mortalité et l'âge des patientes : en effet, le taux de mortalité pour des femmes de moins de 40 ans n'est que de 7%, alors qu'il est de 97% pour des femmes de 74 à 79 ans. L'âge médian au moment du décès est de 73 ans, alors que l'espérance de vie féminine est d'environ 85 ans.

I. 1. 2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont soit d'origines externes (liés à l'environnement et aux modes/conditions de vie) soit internes (constitutifs des individus).

Parmi les facteurs de risque interne, le genre reste le plus important. En effet, le cancer du sein est presque uniquement féminin, puisque seulement 1% des cancers du sein sont diagnostiqués chez les hommes, qui présentent généralement une instabilité hormonale et une prédisposition génétique (Giordano, 2018). Après le genre, l'âge est le facteur de risque le plus important, avec une corrélation positive entre l'âge et le risque de développer un cancer du sein.

De plus, une prédisposition génétique peut également représenter un risque de développer un cancer du sein. Ces cancers nommés « héréditaires » sont dus à 40% à des mutations des gènes *BRCA1* (Breast Cancer Associated) et *BRCA2*. Une étude a montré que 55% à 65% des femmes présentant une mutation *BRCA1* et 45% des femmes présentant une mutation *BRCA2* déclareront un cancer du sein avant 70 ans (Kotsopoulos, 2018). Pour autant, les femmes avec un historique familial de cancer du sein négatif pour les mutations *BRCA1* et *BRCA2* sont 11 fois plus susceptibles de développer un cancer du sein (Momenimovahed and Salehiniya, 2019).

Enfin, des facteurs externes peuvent également intervenir, tels que l'obésité, la consommation de tabac et d'alcool, le diabète, l'utilisation de moyens de contraception.

I. 2. Carcinogenèse mammaire

L'apparition et le développement d'un cancer du sein repose sur le modèle initiation-promotion-progression.

I. 2. 1. Initiation

L'initiation correspond à l'apparition de mutations au sein d'une cellule normale. Il existe deux cas de figure : soit les mutations sont déjà présentes au sein du génome et ont été héritées d'un ou des deux parents, soit elles apparaissent de manière sporadique.

I. 2.1. 1. Mutations génétiques et initiation de la tumorigenèse mammaire

Les mutations héréditaires sont retrouvées dans 10% des cancers du sein. Pour que ces mutations soient transmissibles à la génération suivante, il faut qu'elles affectent la lignée germinale. Comme cité précédemment, les mutations *BRCA1* et *BRCA2* correspondent au facteur de risque le plus important. Ces gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines impliquées dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN. Lorsqu'une

patiente présente un historique familial de cancer du sein, le statut mutationnel des gènes *BRCA1* et *BRCA2* est systématiquement établi.

Dans une moindre mesure, les tumeurs mammaires arborent, en plus des mutations *BRCA1/2*, des mutations au niveau des gènes codant les protéines PTEN (Phosphatase and TEnsiN homolog), TP53 (Tumor Protein 53), CDH1 (Cadherin 1) et STK11 (Serine/Threonin Kinase 11). D'autres mutations, beaucoup plus rares, notamment des gènes codant CHK2 (Checkpoint Kinase 2) et ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), interviennent également dans l'initiation de la carcinogenèse mammaire. L'ensemble de ces mutations héréditaires représente un risque accru de développer un cancer du sein, mais ne signifie pas pour autant que les individus vont obligatoirement déclarer la maladie.

Des mutations somatiques, c'est-à-dire des mutations n'affectant pas la lignée germinale, peuvent également conduire à une carcinogenèse mammaire. Ces mutations vont induire soit une surexpression d'oncogènes (*HRAS* pour Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogen Homolog et *c-MYC* pour cellular-Myelocytomatosis par exemple (Hall *et al.*, 1989)), soit une inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53* et *BRCA1* par exemple (Oliveira *et al.*, 2005)).

L'ensemble de ces mutations ont des causes endogènes, notamment des erreurs lors de la correction sur épreuve par les ADN polymérases au cours de la réplication (Venitt, 1996), ainsi que des causes exogènes causées par l'action de molécules dites « carcinogènes » (**Figure 2**). Il existe deux sous-catégories de carcinogènes : les génotoxiques et les non-génotoxiques. Les agents génotoxiques sont définis comme des molécules capables d'induire directement des altérations du génome, alors que les agents non-génotoxiques exercent leur effet pro-néoplasique *via* des mécanismes secondaires ne faisant pas intervenir des dommages directs de l'ADN.

Les agents génotoxiques sont classés selon leur probabilité à former des tumeurs (du groupe 1 « cancérigène » au groupe 4 « probablement non cancérigène »). L'amiante, les rayonnements solaires, les ultraviolets, certains virus (virus de l'Epstein-Barr, de l'hépatite B et C, du papillome humain...) et le goudron sont des exemples de cancérigènes génotoxiques du groupe 1.

Les hormones sexuelles font parties des agents non génotoxiques. Une exposition excessive aux œstrogènes est ainsi associée à un risque plus élevé de développer un cancer du

sein. En effet, le métabolisme des œstrogènes induit la formation d'adduits dépurinés qui seront excisés du génome, pour former des sites apuriniques responsables d'une instabilité génomique (Wen *et al.*, 2017).

Ces agents cancérigènes peuvent également ne pas être environnementaux, mais être synthétisés directement par l'organisme. L'environnement stromal cellulaire semble avoir une influence sur la formation de carcinomes mammaires (Mao *et al.*, 2013). En effet, un lien entre les facteurs de croissance sécrétés par les fibroblastes et l'initiation de la carcinogenèse mammaire a été établi. Parmi ces facteurs, le TGF β (Transforming Growth Factor Beta) semble être important. Dans ce sens, des fibroblastes mammaires surexprimant la protéine TGF β co-transplantés avec des cellules épithéliales mammaires humaines saines sur des souris nues sont capables d'induire la formation de carcinomes ductaux *in situ*, alors que la transplantation de fibroblastes sauvages n'induisait pas de carcinogenèse (Kuperwasser *et al.*, 2004). L'environnement acellulaire des cellules épithéliales mammaires peut également être impliqué dans le développement tumoral. En effet, une perturbation de l'interaction des protéines de la matrice extracellulaire avec leur récepteur membranaire est décrite comme inducteur de la formation de tumeurs. Par exemple, la perte de fonction des intégrines β 1 et β 4 (qui sont des récepteurs membranaires impliqués dans l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire et l'induction de voies de signalisation) dans des souris transgéniques induit une inhibition de l'initiation et de la progression de la tumorigenèse (Guo *et al.*, 2006). Cette inhibition peut s'expliquer par une perturbation des voies de signalisations médiées par les intégrines. L'un des effecteurs majoritaire de ces voies de signalisation correspond à la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase), qui est impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire notamment (Luo and Guan, 2010).

1. 2.1. 2. Modifications épigénétiques et initiation de la tumorigenèse mammaire

Les mutations génétiques ne sont pas les seules altérations responsables de l'initiation de la carcinogenèse mammaire. De plus en plus de preuves tendent à montrer l'implication d'altérations épigénétiques. L'épigénétique est un terme regroupant toutes les modifications de l'expression génique sans altération de la séquence d'ADN, et qui peuvent être transmissibles au cours des divisions cellulaires. Ces altérations épigénétiques comprennent notamment la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et les ARNs non codants tels que les microARN (miRNA) et les longs ARNs non codants (lncRNA).

La carcinogenèse mammaire s'accompagne d'une hypométhylation globale du génome, conduisant à une instabilité génomique par la réactivation d'éléments répétés notamment. Par exemple, la perte de la méthylation des séquences satellites Sat2 (juxtacentromeric satellite 2) et Sata α (centromeric satellite α) est associée au développement précoce de certains cancers du sein (Costa *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2004). Malgré l'hypométhylation globale, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une hyperméthylation de promoteurs de gènes spécifiques, en particulier de gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont déméthylés dans les tissus sains. Dans le cas du cancer du sein, une hyperméthylation associée à une répression transcriptionnelle a été détectée au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (*RASSF1A* pour Ras Association Domain Family Member 1, *CDK2NA* pour Cyclin Dependant Kinase Inhibitor 2A et *CDK2NB*), dans la réparation des lésions de l'ADN (*BRCA1* et *MGMT* pour MethylGuanine MethylTransFerase), dans l'apoptose (*HOXA5* pour HomeOboX A5), dans la migration et l'invasion cellulaire (*TWIST* pour Twist Related Protein 1, *CDH1* et *TIMP3* pour TIMP MetalloProtease Inhibitor 3) et dans la signalisation hormonale (*ESR1* pour Estrogen Receptor 1 et *PGR* pour Progesteron Receptor) (Huang *et al.*, 2011).

Les modifications post-traductionnelles des queues d'histones incluent des phosphorylations, des ubiquitinations, des SUMOylations, des acétylations et des méthylation. Ces modifications vont impacter la conformation de la chromatine, alternant entre sa forme condensée (ou hétérochromatine) et sa forme décompactée (ou euchromatine), qui respectivement limite et favorise l'accès des facteurs de transcription à leurs éléments de réponse. Dès lors, les altérations post-traductionnelles des histones, en impactant la conformation de la chromatine, vont dicter l'expression génique. Ces marques sont apposées par des enzymes de type HAT (Histones AcetylTransférases), HDAC (Histone DesACetylase), HMT (Histone MethylTransFerase) et HDMT (Histone DeMeThylase). Des variations du niveau d'expression de ces enzymes vont donc être à l'origine des différences de modifications des histones observées entre les cellules saines et les cellules tumorales. Par exemple, des mutations des gènes codant des enzymes de la famille HAT ont été observées dans différents cancers, dont celui du sein (Iyer *et al.*, 2004). Plus précisément, il a été montré que l'expression de l'histone AcetylTransfère hMOF est inhibée dans une lignée primaire de cellules cancéreuses mammaires, aboutissant à une perte de l'acétylation de H4K16 (Pfister *et al.*, 2008).

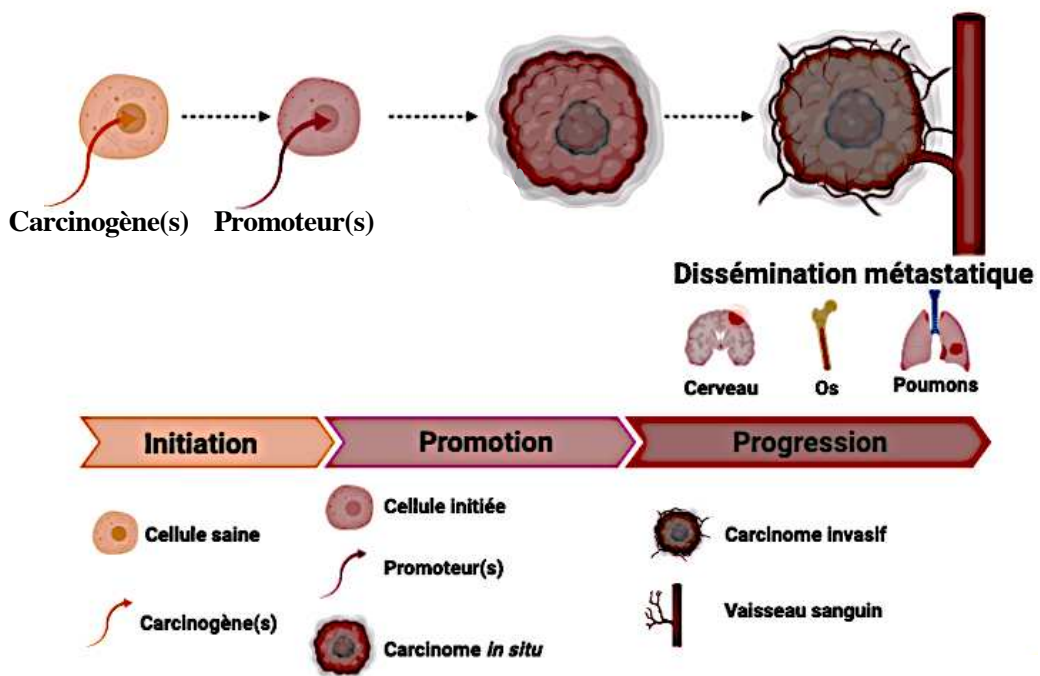


Figure 2. Schéma représentatif de la carcinogenèse mammaire selon le modèle initiation-promotion-progression. La 1^{ère} étape de la carcinogenèse correspond à l'apparition de mutations génétiques et/ou épigénétiques au sein d'une cellule normale (**initiation**). Ces mutations sont soit héritées d'1 ou des 2 parent(s), soit acquises sous l'action de molécules carcinogènes de types génotoxiques (induisant directement des lésions de l'ADN) ou non-génotoxiques (dont les effets passent par des mécanismes secondaires n'impliquant pas de dommages à l'ADN). La 2nde étape du développement d'une tumeur est appelée **promotion**. Au cours de cette étape, la cellule présentant des altérations génétiques et/ou épigénétiques, et dite « initiée », va se diviser de manière incontrôlée pour former une tumeur *in situ*, c'est-à-dire bien localisée et ne franchissant pas la membrane basale de l'épithélium. Cette étape se fait généralement de manière spontanée, mais peut être accélérée par des molécules appelées « promoteurs ». Enfin, la dernière étape de la carcinogenèse mammaire correspond à la **progression** métastatique. Une des premières étapes correspond à l'acquisition d'un pouvoir invasif, notamment au travers de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Les cellules invasives vont pouvoir ensuite rejoindre la circulation sanguine par intravasation, et envahir leurs tissus cibles, comme les poumons, le foie, le cerveau et les os dans le cas des tumeurs mammaires.

Les microRNAs (ou miRNA) correspondent à de courtes séquences (généralement entre 20 et 22 nucléotides) d'ARN simple brin. Ils sont capables de réguler l'expression des gènes au niveau traductionnel. En effet, leur séquence est complémentaire de l'ARNm qu'ils ciblent, et l'interaction entre les deux entraîne soit une répression traductionnelle soit une dégradation de l'ARNm. Deux familles de miRNA semblent être importantes pour l'initiation de la carcinogenèse mammaire : la famille de miR-200 et de let-7. Shimono *et al.* ont montré que l'expression de miR-200c est diminuée dans des cellules tumorales mammaires par rapport aux cellules saines, conduisant à une stabilisation du taux protéique de BMI-1, connu pour stimuler la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose (Shimono *et al.*, 2009). De la même manière, une diminution de l'expression de let-7a est observée dans des cellules dérivant de tumeurs mammaires. (Yu *et al.*, 2007). La réexpression de ce miRNA par infection des cellules tumorales limite leur capacité à former des mammosphères et réduit leur capacité proliférative.

I. 2. 2. Promotion et progression

La promotion correspond à l'étape au cours de laquelle la cellule dite initiée, c'est-à-dire présentant des altérations génétiques et épigénétiques la rendant cancéreuse, va se diviser de manière anarchique (**Figure 2**). Ces divisions anarchiques vont conduire à l'émergence de nouvelles instabilités génétiques qui seront transmissibles à toutes les cellules filles. Cette multiplication cellulaire reste assez lente, mais peut être accélérée par l'intervention de « promoteurs » qui correspondent généralement à des facteurs de croissance et à des hormones. Lors du développement du cancer du sein, les œstrogènes jouent un rôle central. En effet, dans les tumeurs qui expriment le récepteur aux œstrogènes (ER α), la fixation des œstrogènes sur ER α va induire une translocation nucléaire du complexe, et une régulation de l'expression des gènes cibles. La voie de signalisation des œstrogènes est connue pour induire une prolifération *via* la régulation d'IGF-1, un agent mitotique (Christopoulos *et al.*, 2015). En plus des œstrogènes, le récepteur HER2 (Human Epidermal Receptor 2) de la famille des récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor), active les voies de signalisation MAPK et PI3K favorisant la survie et la prolifération cellulaire (Ruiz-Saenz *et al.*, 2018). Quant aux facteurs de croissance, la voie Wnt est très souvent active de manière constitutive dans les cancers du sein, *via* une stabilisation de l'effecteur de la voie, la protéine β -caténine (Shang *et al.*, 2017). D'autres voies de signalisation sont impliquées dans la promotion du cancer du sein, même si

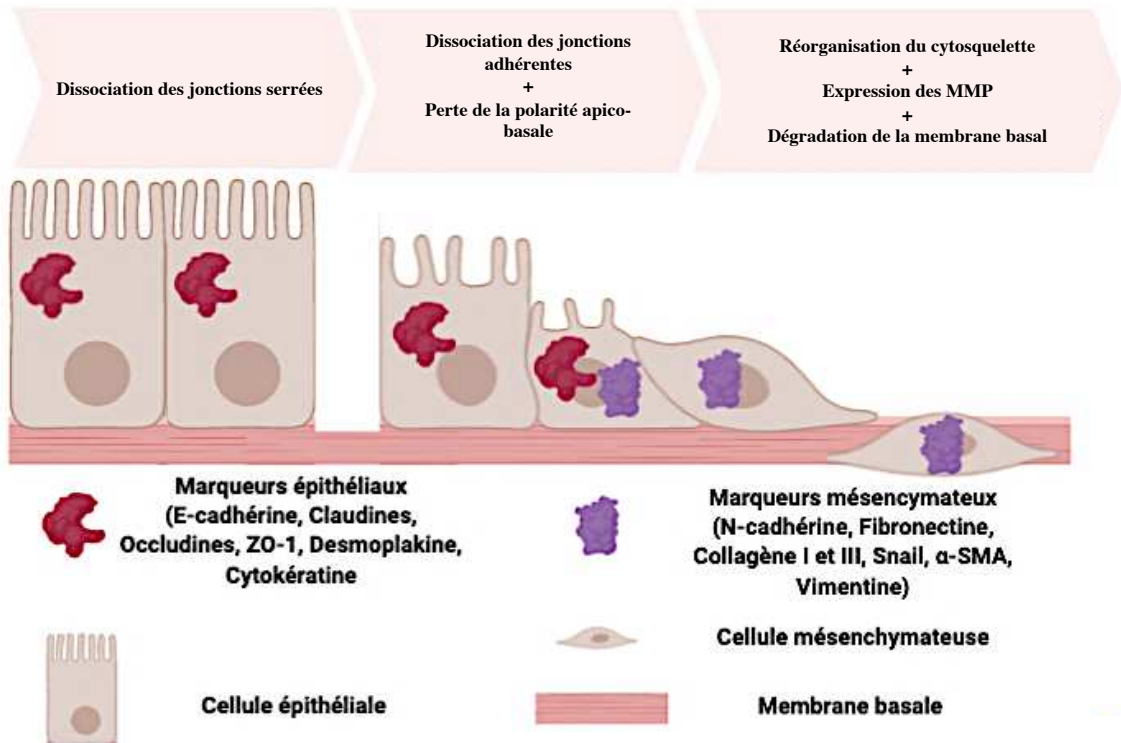


Figure 3. Schéma représentatif de la transition épithélio-mésenchymateuse. Au cours de ce processus, les cellules tumorales vont acquérir des propriétés biologiques et mécaniques les rendant migratrices et invasives. Les cellules épithéliales vont perdre leurs jonctions intercellulaires (jonctions serrées), ainsi que les jonctions les liant à la membrane basale (jonctions adhérentes). Les cellules vont également perdre leur polarité apico-basale, et leur cytosquelette sera profondément modifié pour leur conférer un phénotype mésenchymateux. L'expression des MMP (métalloprotéases matricielles), à l'origine de la dégradation de la membrane basale, rend les cellules invasives. Moléculairement, la TEM se caractérise par la perte de marqueurs épithéliaux au profit de marqueurs mésenchymateux.

leur rôle reste moins important que celui de la voie Wnt/ β -caténine. Les voies Notch, Sonic Hedgehog et PI3K/AKT/mTOR en sont des exemples (Nwabo Kamdje *et al.*, 2014).

Enfin, la dernière étape de la carcinogenèse correspond à la progression métastatique (**Figure 2**). Au cours de cette étape, les cellules formant la tumeur vont acquérir des propriétés biologiques et mécaniques les rendant migratrices et invasives. Lorsque la tumeur s'est formée à partir d'un épithélium (adénocarcinome), les cellules cancéreuses doivent subir la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permettant l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux à partir d'un phénotype épithélial. D'un point de vue phénotypique, les cellules épithéliales subissant la TEM perdent leur jonction intercellulaire, leur polarité apico-basale et leur cytosquelette est profondément changé (**Figure 3**). Au niveau moléculaire, cette transition se caractérise notamment par la perte de l'expression de la E-cadhérine (spécifique des cellules épithéliales) au profit de la N-cadhérine (spécifique des cellules mésenchymateuses), *via* l'intervention de facteurs de transcription induisant la TEM : SNAIL, TWIST, ZEB1/2, FOXC1, TCF3...(Fedele *et al.*, 2017). La TEM est souvent définie comme une dédifférenciation, puisque les cellules la subissant acquièrent des propriétés de cellules souches caractérisées par l'expression du marqueur CD44 et l'absence d'expression du marqueur CD24 (CD44+/CD24-). Ces caractéristiques de cellules souches contribuent grandement à la chimiorésistance et au mauvais pronostic des tumeurs mammaires métastatiques (Tajima and Koda, 2015). En effet, alors que les carcinomes non infiltrants répondent généralement bien à la chimiothérapie, les tumeurs mammaires devenues métastatiques sont associées à un très mauvais pronostic du fait de leur insensibilité à la chimiothérapie (Hennessy *et al.*, 2006).

La transition épithélio-mésenchymateuse correspond à une étape précoce dans l'acquisition de capacités invasives des cellules tumorales. Une autre étape correspond à l'expression d'enzymes capables de digérer la matrice extracellulaire, notamment les métalloprotéases matricielles (MMP). Les cellules tumorales devenues invasives doivent ensuite pénétrer dans la circulation sanguine par un mécanisme appelé intravasation, pour rejoindre leur(s) organe(s) cible(s) où elles pourront former des tumeurs secondaires, ou métastases. Par exemple, les tumeurs mammaires tendent à coloniser préférentiellement les poumons, le foie, les os et le cerveau (Redig and Mcallister, 2013).

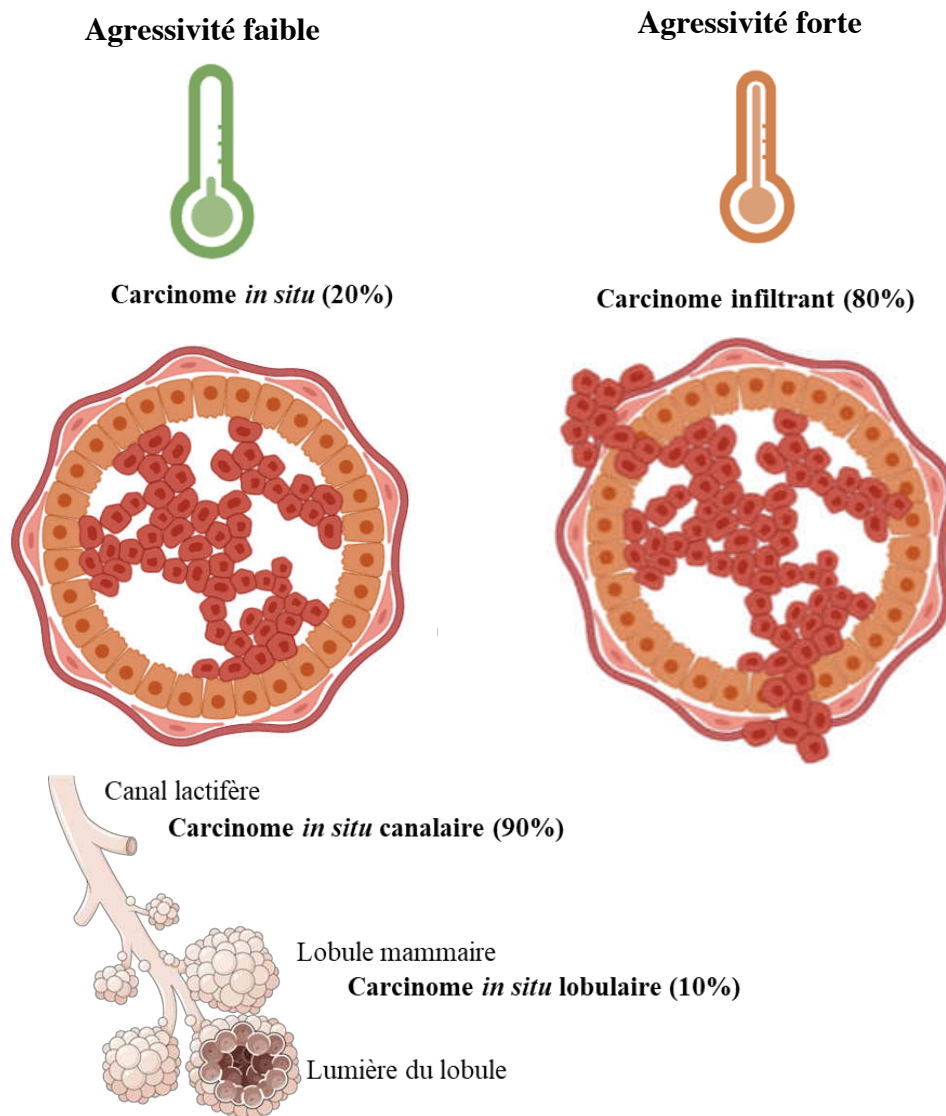


Figure 4. Représentation schématique de la classification histologique des tumeurs mammaires. 20% des tumeurs mammaires correspondent à des carcinomes *in situ*, c'est-à-dire des tumeurs confinées soit au niveau des canaux lactifères (carcinome *in situ* canalaire, représentant 90% des cancers *in situ*) soit au niveau des lobules mammaires (carcinome *in situ* lobulaire, représentant 10% des cancers *in situ*). Ces tumeurs, associées à un bon pronostic et une faible agressivité, peuvent néanmoins dégénérer en cancers infiltrants (80% des tumeurs mammaires) qui se caractérisent par une colonisation des tissus environnants par les cellules cancéreuses et une dégradation de la lame basale. Ces tumeurs sont fortement invasives, leur conférant un mauvais pronostic.

I. 3. Classifications

La classification des différents sous-types de cancer du sein est essentielle puisqu'elle va guider le diagnostic, le pronostic et le(s) traitement(s) employé(s).

I. 3. 1. Classification basée sur des critères phénotypiques

Cette classification repose sur la localisation de la tumeur au sein de la glande mammaire. On distingue les cancers *in situ* et infiltrants (**Figure 4**). Dans le cas des carcinomes mammaires *in situ*, la tumeur est confinée au sein des canaux (carcinomes canauxiaux *in situ*, représentant 90% des tumeurs *in situ*) ou des lobules (carcinomes lobulaires *in situ*, représentant 10% des tumeurs *in situ*). La tumeur ne franchit pas la membrane basale, et n'envahit pas les tissus environnants. Cette catégorie, qui représente 20% des tumeurs mammaires, correspond souvent à des formes précoces de cancer du sein associée à un bon pronostic. Néanmoins, sans traitement, ce cancer peut évoluer vers un cancer infiltrant, représentant 80% des tumeurs mammaires, et qui se caractérise par une prolifération tumorale dépassant la membrane basale, et envahissant le tissu conjonctif. Si ces cellules tumorales atteignent la circulation générale par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, elles peuvent être à l'origine de la formation de métastases.

Le grade SBR (Scarff-Bloom-Richardson) se focalise plus sur l'aspect (architecture de la tumeur, forme et taille des noyaux, et activité mitotique) des cellules tumorales, en comparaison de l'aspect des cellules saines environnantes (Rakha *et al.*, 2010). Comme cité précédemment, au cours de la carcinogenèse, les cellules tumorales ont tendance à acquérir des caractéristiques de cellules souches en se différenciant. Ainsi, au sein de cette classification, le grade I (associé au meilleur pronostic) correspond à des tumeurs bien différenciées, contenant beaucoup de structures bien formées, des noyaux petits et uniformes, et dont les cellules se divisent lentement, alors que le grade III (associé au moins bon pronostic) correspond à des tumeurs différenciées, avec peu ou aucune structure(s) bien formée(s), des noyaux de taille importante et de forme variable, et dont les cellules se divisent rapidement.

La classification TNM (Tumor, Node and Metastasis) se base sur la taille de la tumeur (T), sur l'envahissement des ganglions lymphatiques (N) et sur le développement de métastases (M) (Sobin and Gospodarowicz, 1987). Le stade 0 correspond à des carcinomes *in situ*, les

Pronostic

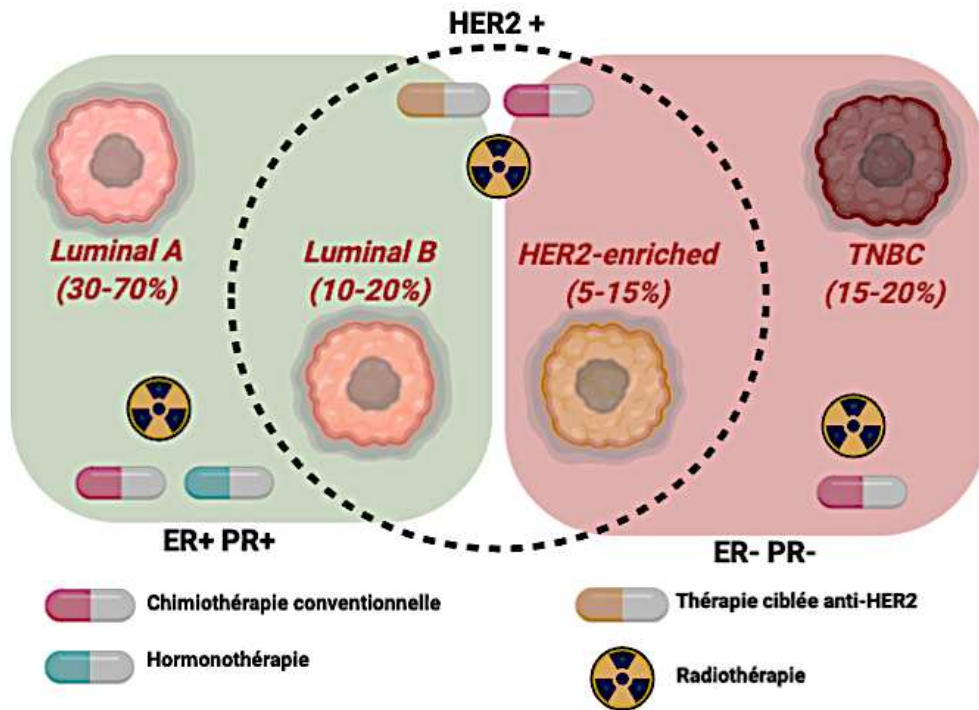


Figure 5. Représentation schématique de la classification moléculaire des tumeurs mammaires. Cette classification repose sur l'analyse du niveau d'expression de 3 marqueurs moléculaires : le récepteur aux œstrogènes (ER α), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur HER2 de la famille des récepteurs à l'EGF. La fréquence des différents sous-types moléculaires est présentée, ainsi que le pronostic et le(s) traitement(s) employé(s) pour chaque sous-type. (TNBC = Triple negative breast cancer).

stades 1 à 3 à des tumeurs se limitant au tissu mammaire ou ayant envahi les ganglions lymphatiques environnants, et le stade 4 à un cancer métastatique.

1. 3. 2. Basée sur des critères moléculaires

L'évolution des techniques de biologie cellulaire et moléculaire a permis l'émergence d'une classification se basant sur l'expression différentielle de marqueurs moléculaires au niveau des tumeurs mammaires. Historiquement, les trois premiers marqueurs moléculaires à avoir été utilisés correspondent au récepteur aux œstrogènes (ER α), au récepteur à la progestérone (PR) et au récepteur HER2 de la famille des récepteurs à l'EGF (Perou *et al.*, 2000). L'analyse de l'expression de ces trois marqueurs suffit à caractériser 4 sous-types de cancers du sein (**Figure 5**).

Les tumeurs Luminal A, qui représentent entre 30 et 70% des cancers du sein, expriment ER α et possèdent le meilleur pronostic et le plus faible taux de récurrence (Gao and Swain, 2018). Les tumeurs Luminal B (représentant de 10 à 20% des cancers du sein) se différencient des tumeurs Luminal A par l'expression d'HER2, les rendant plus prolifératives. L'expression des récepteurs hormonaux dans les tumeurs Luminal A et B permet le recours à l'hormonothérapie (**Figure 5**).

Les cancers HER2+ expriment uniquement le récepteur HER2, et correspondent à 5-15% des cancers du sein. L'expression d'HER2 dans les tumeurs Luminal B et HER-2 enriched permet l'utilisation de molécules de thérapie ciblée (**Figure 5**).

L'absence d'expression des trois marqueurs moléculaires est caractéristique des tumeurs mammaires triples-négatives, ou TNBC pour Triple Negative Breast Cancer, correspondant à 15-20% des tumeurs mammaires. Ces tumeurs arborent souvent des mutations *BRCA* au niveau de la lignée germinale, les rendant héréditaires (Dent *et al.*, 2007). Les TNBC regroupent les tumeurs Basal-Like et les tumeurs Claudin-Low. Le premier sous-groupe est caractérisé par l'expression de gènes généralement exprimés dans les cellules myoépithéliales de la glande mammaire saine. Il est à noter que seules 25% des tumeurs Basal-Like sont triples négatives, le reste étant généralement HER2+. Les tumeurs Basal-Like sont généralement identifiées par l'expression des cytokératines 5 et 6 et du récepteur au facteur de croissance épithélial (EGFR). Les tumeurs Claudin-Low, comme leur nom le précise, sont caractérisées par une faible expression des claudines 3, 4 et 7, impliquées dans les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales. Ces tumeurs sont considérées comme les moins différenciées de toutes

les tumeurs mammaires, car elles présentent des caractéristiques de cellules souches mammaires (CD44+ CD24-) (Hennessy *et al.*, 2009).

I. 4. Traitements

Le choix du traitement employé dépendra entièrement du type de cancer du sein. L'ensemble des classifications citées précédemment permet donc non seulement l'établissement du diagnostic, mais également le choix du type de traitement employé.

I. 4. 1. Chirurgie

La chirurgie, nommée mastectomie, est généralement le premier traitement envisagé lors de la découverte d'un cancer du sein. Dans le cas de tumeurs mammaires *in situ*, il s'agit même du traitement le plus efficace. Dans le cas de tumeurs infiltrantes, la chirurgie sera systématiquement combinée à d'autres traitements. Selon le type de tumeurs, la chirurgie peut être soit partielle (seul le tissu tumoral est retiré, ce geste prenant le nom de tumorectomie et correspondant à la chirurgie la plus conservatrice) soit totale (les glandes mammaires, le mamelon et la peau sont retirés, procédure appelée mastectomie et représentant l'acte chirurgical le moins conservateur). La chirurgie est toujours complétée de l'exérèse d'un ou plusieurs ganglion(s) situé(s) au niveau des aisselles et pouvant abriter des cellules cancéreuses. Pour les petites tumeurs, seul le premier ganglion de la chaîne lymphatique (appelé ganglion sentinelle) peut être retiré. Si le ganglion sentinelle est dépourvu de cellules cancéreuses, il n'est pas nécessaire de retirer toute la chaîne ganglionnaire. Au contraire, la présence de cellules tumorales dans le ganglion sentinelle va non seulement nécessiter une seconde opération pour l'exérèse de la chaîne, mais obligera également d'adapter le protocole de traitement.

I. 4. 2. Radiothérapie

Ce type de traitement repose sur l'utilisation de rayonnements ionisants pour cibler les tissus tumoraux, tout en préservant au maximum l'intégrité des tissus sains environnants. Les rayons de radiothérapie vont induire des dommages à l'ADN soit directement (cas mineur), soit indirectement (cas majeur) par la formation de radicaux libres après radiolyse de l'eau (Baskar *et al.*, 2014). Ces dommages à l'ADN, correspondant à des cassures simples et doubles brins, vont induire une inhibition de la prolifération cellulaire et/ou une entrée en apoptose. Afin de limiter les atteintes au niveau des tissus sains environnants, et donc dans le but de limiter les effets secondaires, des techniques plus récentes, comme la radiothérapie conformationnelle par

modulation d'intensité (RCMI) permettent de moduler le débit de dose délivrée au cours de la séance pour ne cibler que la tumeur (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, IRSN).

La radiothérapie est très largement employée après chirurgie pour réduire le risque de récurrence (traitement adjuvant). Après une chirurgie conservatrice (tumorectomie), une radiothérapie externe de la glande mammaire est systématiquement réalisée. Néanmoins, la radiothérapie est également employée de manière moins fréquente avant chirurgie (traitement néo-adjuvant) pour diminuer le volume tumoral et faciliter ainsi l'exérèse. La radiothérapie peut également être employée pour traiter directement la tumeur si une opération n'est pas envisageable ou pour irradier les ganglions si ceux-ci abritent des cellules tumorales.

Deux formes de radiothérapie existent : la radiothérapie externe qui utilise une source externe de rayonnements, et la curiethérapie qui utilise une source radioactive placée à l'intérieur du corps directement au contact de la zone à traiter, cette technique étant peu utilisée dans le cas du cancer du sein (INCa). Une nouvelle technique de radiothérapie encore en phase d'essai clinique consiste à délivrer une dose de rayons directement sur la tumeur au cours de la chirurgie. En théorie, cette technique permet d'éviter 5 à 6 semaines de radiothérapie après chirurgie, ce qui améliorerait grandement la qualité de vie des patientes (Dutta *et al.*, 2017).

I. 4. 3. Chimiothérapie

Contrairement à la chirurgie et à la radiothérapie qui sont des traitements locaux, la chimiothérapie utilise des molécules qui vont diffuser dans l'ensemble de l'organisme. La chimiothérapie peut être utilisée soit avant la chirurgie dans le but de réduire le volume tumoral et de permettre une opération moins intrusive (chimiothérapie néo-adjuvante), soit après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante). Dans ce cas, le but du traitement est de détruire les cellules cancéreuses qui auraient potentiellement envahi les tissus environnant la tumeur, et qui n'ont donc pas pu être excisées au cours de l'opération chirurgicale.

Les molécules employées en chimiothérapie vont généralement induire un arrêt de la prolifération et/ou une entrée en apoptose. Ces effets n'épargnent donc pas les cellules saines en division, et sont responsables des lourds effets secondaires rencontrés au cours de ce type de traitement. Il existe 4 grandes familles de molécules de chimiothérapie : les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérases, les poisons du fuseau mitotique et les antimétabolites.

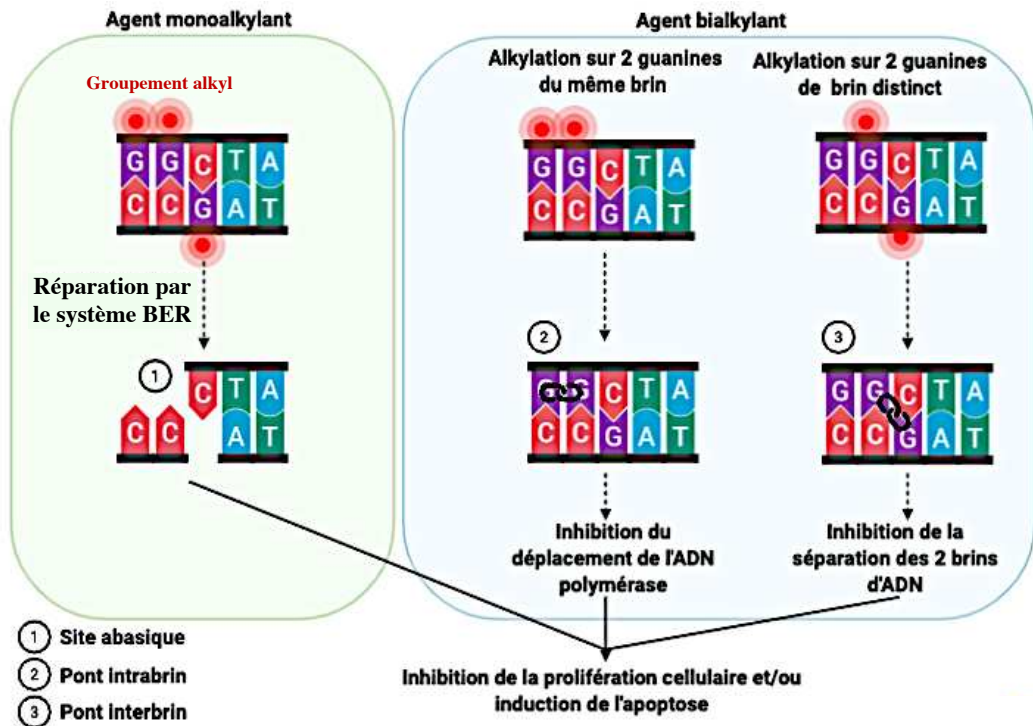


Figure 6. Représentation schématique du mode d'action des agents alkylants. Les agents alkylants peuvent être classés en agents mono-et-bialkylants. Les agents monoalkylants vont induire l'ajout d'un groupement alkyl sur une seule guanine. Cette base modifiée sera reconnue par les mécanismes de réparation BER (Base Excision Repair). Au cours de la réparation, des sites abasiques vont apparaître, à l'origine d'une fragmentation de l'ADN. Les agents bialkylants vont induire l'ajout d'un groupement alkyl sur 2 guanines soit du même brin, soit de deux brins distincts. Dans le premier cas, des ponts intrabrin vont apparaître, ce qui gênera le déplacement de l'ADN polymérase au cours de la réplication. Les ponts interbrins vont quant à eux empêcher la séparation des deux brins au cours de la réplication. L'ensemble des mécanismes des agents mono-et-bialkylants conduit à une inhibition de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose. D'après (Germanas et Pendya, 2002).

Les agents alkylants ont une action directe sur l'ADN par l'ajout d'un ou de deux groupement(s) alkyl(s) au niveau de l'azote 7 des guanines, respectivement pour les agents mono-et-bifonctionnels (Ralhan and Kaur, 2007). Dans le cas des agents monoalkylants, les guanines alkylés sont reconnues par les systèmes de réparation de type BER (Base Excision Repair), dont l'activité va induire l'apparition de sites abasiques à l'origine d'une fragmentation de l'ADN (Germanas and Pandya, 2002) (**Figure 6**). Cet effet aboutit à une inhibition de la prolifération cellulaire et/ou l'induction de l'apoptose. Les agents bialkylants peuvent se lier entre deux guanines appartenant à deux brins d'ADN distincts, ou au même brin. Le premier cas va conduire à la formation de ponts interbrins, à l'origine d'une rigidification de l'ADN : les deux brins ne pourront dès lors pas se séparer au cours de la réplication et de la transcription (Ralhan and Kaur, 2007) (**Figure 6**). La liaison covalente entre deux guanines d'un même brin va conduire à des ponts intrabrins, n'empêchant pas la séparation des brins, mais plutôt le déplacement de l'ADN polymérase au cours de la réplication (Germanas and Pandya, 2002) (**Figure 6**). Les ponts intra-et-interbrins vont tous deux induire un arrêt de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose. Le cyclophosphamide, le cisplatine et le carboplatine font partis des agents alkylants.

Les inhibiteurs de topoisomérases ciblent également l'ADN. Il existe 2 types de topoisomérases : le type I et le type II. Les enzymes de type I sont capables de modifier l'enroulement de l'ADN en hydrolysant un brin et en le reconstituant après avoir fait le tour de l'autre brin. Dès lors, les inhibiteurs de topoisomérases de type I vont inhiber la ligature des deux extrémités de l'ADN d'un même brin et donc générer des cassures simples brins, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire (Hevener *et al.*, 2018). Il existe actuellement deux molécules de ce type : l'irinotecan et le topotecan.

Les topoisomérases de type II sont responsables de la cassure double brin de l'ADN nécessaire à la décompaction de l'ADN au cours de la transcription. Les inhibiteurs de type II vont s'intercaler entre les deux brins de l'ADN, bloquant ainsi l'action des topoisomérases II. Les Anthracyclines (comme la Doxorubicine, voir **Paragraphe I. 4. 3. 1.**) l'Actinomycine D et la Bléomycine font parties de cette famille d'agents anticancéreux.

Les poisons du fuseau inhibent la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose en empêchant la formation du fuseau mitotique. Dès lors, les cellules restent bloquer en phase M et ne peuvent pas se diviser (Jiang *et al.*, 2006). Il existe 2 grandes familles de poisons du

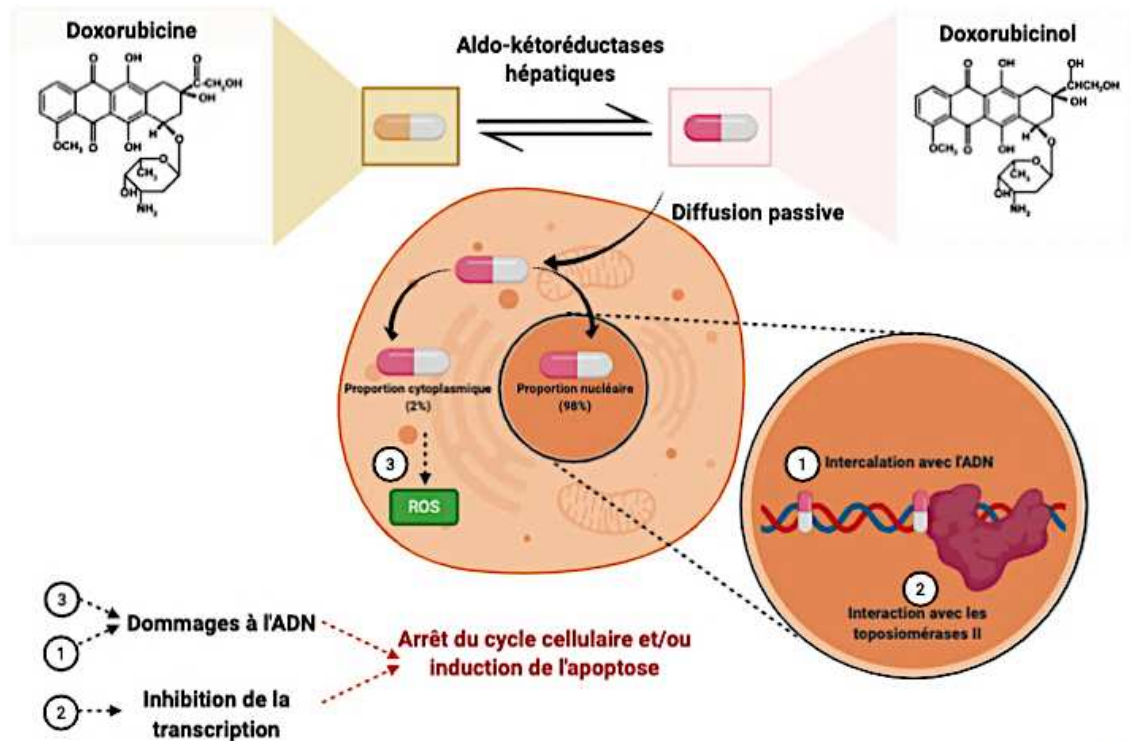


Figure 7. Représentation schématique du mode d'action de la Doxorubicine. La Doxorubicine est métabolisée par le foie en Doxorubicinol via les enzymes aldo-kétoréductases. Son entrée dans la cellule se fait par diffusion passive, et la molécule s'accumule préférentiellement dans le noyau (98% de la concentration totale). La fraction cytoplasmique (2% de la concentration totale) va principalement induire la formation de radicaux libres (ROS) via la réaction de Fenton. Ces ROS peuvent être l'origine de dommages à l'ADN. Dans le noyau, la Doxorubicine est capable d'inhiber l'action des topoisomérases de type II par interaction, conduisant à une inhibition de la transcription. Son interaction entre les paires de bases de l'ADN peut également conduire à la formation d'adduits, provoquant un arrêt du cycle et/ou une entrée en apoptose via les voies AMPK et Bcl2.

fuseau : 1) les Taxanes, comme le Paclitaxel, qui sont les molécules les plus couramment utilisées en chimiothérapie, ciblant spécifiquement les microtubules en inhibant la dépolymérisation de la tubuline ; et 2) les dérivés de la Pervenche (ou Vinca-alcaloïdes) qui inhibent, à l'inverse des Taxanes, la polymérisation de la tubuline.

Les antimétabolites sont responsables d'une inhibition de la synthèse de l'ADN. Structuralement, il s'agit d'analogues de composés indispensables à la synthèse des acides nucléiques : ils vont dès lors se substituer à eux ou inhiber les enzymes impliquées dans cette synthèse (Tiwari, 2012). Au sein de cette famille, on distingue les antifolates (comme le Méthotrexate) qui vont interférer avec le métabolisme de l'acide folique indispensable à la synthèse d'ARN et d'ADN ; et les antiprimidines (comme le 5-Fluorouracile, voir **Paragraphe I. 4. 3. 2.**) et antipuriques (comme la 6-Thioguanine) qui correspondent à des analogues des bases pyrimidiques et puriques de l'ADN.

I. 4. 3. 1. Doxorubicine

Parmi les agents de chimiothérapie, la Doxorubicine, un antibiotique extrait de la bactérie *Streptomyces*, est fréquemment utilisée pour le traitement des carcinomes mammaires, des sarcomes osseux, des lymphomes et des leucémies (Rivankar, 2014). Comme cité précédemment, la Doxorubicine (encore appelée Adriamycine ou Hydroxydaunorubicine) est un inhibiteur des enzymes topoisomérases de type II de la famille des Anthracyclines. D'un point de vue structurale, la Doxorubicine possède un groupement aglyconique (qui correspond à la partie non-glucidique d'un hétéroside) et un groupement sucré (**Figure 7**). Le groupement aglyconique comprend 4 cycles avec des groupements adjacents quinone-hydroquinone. La partie sucrée, encore appelée daunosamine, est attachée à l'un des cycles par une liaison glycosidique.

La Doxorubicine est généralement injectée en intraveineuse, car elle n'est pas absorbable par le tractus gastro-intestinal. La molécule est métabolisée principalement par le foie en 13-OH-Doxorubicinol par les aldo-kétoréductases. Une fois dans le sang, sa demi-vie est de 3 à 5 minutes, témoignant d'une prise en charge rapide par les cellules (Tacar *et al.*, 2013). La molécule, après diffusion passive au travers de la membrane plasmique, s'accumule préférentiellement dans le compartiment nucléaire, la proportion intracellulaire hors noyau (correspondant à environ 2% de la quantité totale) se distribuant de manière équitable entre tous

les organites (appareil de Golgi, lysosomes, mitochondries...) (Tacar *et al.*, 2013) (**Figure 7**). Au sein du noyau, la structure planaire caractéristique de la famille des Anthracyclines rend la Doxorubicine capable de s'intercaler entre deux paires de base, préférentiellement entre deux bases G-C après formation d'une liaison hydrogène avec la guanine (Thorn *et al.*, 2011). La rigidification de la structure de l'ADN induite par la présence de l'intercalant inhibe la topoisomérase de type II, et par conséquent la réplication de l'ADN, provoquant un arrêt du cycle cellulaire.

En plus de son action cytostatique, la Doxorubicine est capable d'induire des dommages à l'ADN *via* sa capacité à s'intercaler entre des paires de base de l'ADN, mais également *via* la formation de radicaux libres (Patel and Kaufmann, 2012) (**Figure 7**). En effet, la Doxorubicine peut interagir avec le Fer Ferrique Fe(III), qui sera alors réduit en Fer Ferreux Fe(II) (Hasinoff, 1989). Ce dernier est capable de réagir avec le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour former le radical hydroxyle (OH.), processus appelé « Réaction de Fenton ». De plus, la Doxorubicine peut subir une réduction pour former la Doxorubicine-semi quinone, réaction catalysée par l'enzyme mitochondriale NADH déshydrogénase ou par des enzymes cytoplasmiques dont la NADPH déshydrogénase (NQO1), la xanthine oxydase et la nitric oxide synthase (Finn *et al.*, 2011). La réaction inverse d'oxydation de la Doxorubicine-semi quinone vers sa forme native s'accompagne d'une génération d'espèces réactives de l'oxygène. Les ROS générés peuvent directement induire des dommages au niveau de toutes les macromolécules biologiques (protéines, lipides, glucides, ARN et ADN), ce qui mettra en péril l'intégrité de la cellule et s'opposera à son bon fonctionnement. De plus, les radicaux libres peuvent induire une entrée en apoptose indirecte en interférant avec les voies de signalisation de mort cellulaire et de survie comme la voie AMPK (AMP-Activated Protein Kinase) et la voie Bcl2/Bax. En effet, des études ont montré que la Doxorubicine est capable d'induire une activation de la voie AMPK dans des cellules de myocarde embryonnaires (Chen *et al.*, 2011). Cet effet, qui est médié par l'activation ROS-dépendante de la kinase LKB1 (Liver Kinase B1), va entraîner notamment l'activation de p53, et une entrée en apoptose. D'autres études ont exploré l'effet de la Doxorubicine sur la voie de signalisation Bcl-2/Bax. Le traitement d'une lignée de cellules tumorales mammaires (MCF-7) par la Doxorubicine entraîne ainsi une diminution temps et concentration-dépendante du niveau de Bcl-2, alors que le niveau de Bax tend à augmenter, aboutissant à une mort cellulaire par apoptose (Leung and Wang, 1999).

Bien que très efficace contre une multitude de tumeurs, la Doxorubicine présente des effets secondaires assez conséquents. Les premiers essais cliniques de phase II et III menés dans les années 1970 ont révélé que l'utilisation de la Doxorubicine s'accompagnait de nausées, de problèmes gastro-intestinaux et nerveux (Hortobágyi, 1997). Il est maintenant clairement admis que le risque le plus important lors de l'usage de la Doxorubicine concerne le cœur. En effet, l'agent est responsable d'altérations structurales des cardiomyocytes, entraînant une hypertrophie de l'organe. L'effet cardiotoxique de la Doxorubicine est clairement associé à la production de radicaux libres au niveau des cardiomyocytes (Cappetta *et al.*, 2017). De plus, l'utilisation de la Doxorubicine entraîne des troubles nerveux (troubles de la mémoire, troubles des capacités spatio-temporelles). Cette action est indirecte puisque la molécule n'est pas capable de pénétrer la barrière hémato-encéphalique : l'agent de chimiothérapie va induire la synthèse de TNF α (Tumor Necrosis Factor Alpha) dans la circulation sanguine encéphalique, qui pourra franchir la barrière hémato-encéphalique et stimuler la synthèse de cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgliales (Carvalho *et al.*, 2009). Ces cytokines vont instaurer un environnement de stress oxydant au niveau des neurones, à l'origine des troubles neuronaux observés. Enfin, 40% des patients traités avec de la Doxorubicine subissent des effets secondaires au niveau rénal (Oktem *et al.*, 2011). En effet, la molécule s'accumule principalement dans cet organe, et la métabolisation d'une grande quantité de Doxorubicine entraîne une forte production d'espèces radicaux, responsables de dommages aux cellules hépatiques.

Les effets secondaires observés en présence de la Doxorubicine, notamment au niveau cardiaque, peuvent nécessiter de remplacer cet agent par son isomère, l'Epirubicine (ou 4-épi-doxorubicine). Un essai clinique a permis de montrer que l'Epirubicine est aussi efficace que la Doxorubicine, mais induit une cardiotoxicité significativement inférieure (Cottin *et al.*, 1998).

En plus de sa toxicité, les cas de résistance à la Doxorubicine limitent fortement son utilisation clinique. Cette résistance peut être soit innée, c'est-à-dire que des altérations génétiques dans les tumeurs vont limiter leur réponse à la chimiothérapie, soit acquises au cours du traitement. Dans le cas de la Doxorubicine (et de toute la classe des Anthracyclines), la résistance provient majoritairement d'une augmentation de l'efflux de la molécule. Dans ce sens, une surexpression du transporteur d'efflux ABCB4 (ABC sub-family B member 4) est observée dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 et MDA-MB231 résistantes à la

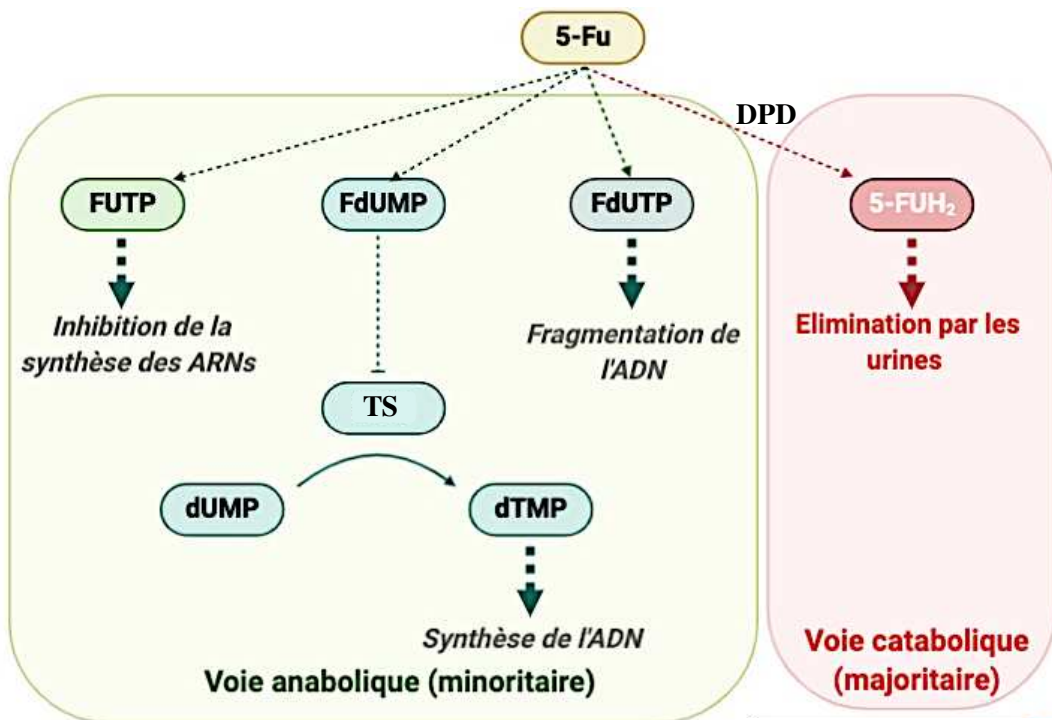


Figure 8. Représentation schématique du métabolisme de 5-Fu. Le 5-Fu peut s'engager dans deux grandes voies : l'anabolisme ou le catabolisme. La voie catabolique correspond à la voie majeure, conduisant à l'élimination de l'agent de chimiothérapie dans les urines par l'intermédiaires du 5-FUH₂ produit par l'enzyme DPD. Concernant la voie anabolique, le 5-Fu peut être transformé en FdUMP capable d'inhiber l'enzyme TS, et donc de bloquer la synthèse de dTMP à partir de dUMP, métabolite indispensable à la synthèse d'ADN. Le 5-Fu peut également être transformé en FUTP capable de s'intégrer dans les ARNs et d'inhiber leur synthèse. Enfin, le 5-Fu peut être métabolisé en FdUTP capable d'interagir avec la double hélice de l'ADN et d'induire sa fragmentation. La voie anabolique va conduire à l'inhibition de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose.

Doxorubicine, par rapport à leurs équivalents sensibles (Huang *et al.*, 2018). Par ailleurs, un autre mécanisme impliqué dans la résistance à la Doxorubicine correspond à la sous-expression de la topoisomérase II, la cible moléculaire principale de l'agent anticancéreux (Jiang *et al.*, 2018). Enfin, au vu de l'importance des radicaux libres dans la cytotoxicité de la Doxorubicine, il n'est pas étonnant d'observer un lien entre des modifications du niveau d'expression d'enzymes de détoxification des radicaux libres et les cas de résistance. Ainsi, une étude différentielle du protéome de cellules tumorales mammaires MCF-7 sensibles et résistantes à la Doxorubicine a permis d'identifier 5 composants majeurs de la voie de signalisation antioxydante GSH présentant une expression diminuée dans les cellules résistantes (Wang *et al.*, 2015).

I. 4. 3. 2. 5-Fluorouracile

Le 5-Fluorouracile (5-Fu) est le 3^{ème} agent de chimiothérapie le plus utilisé au monde, derrière les Anthracyclines et les Taxanes. Cette molécule forme, avec la Capécitabine, la famille des Fluoropyrimidines. Ces dernières ont été synthétisées dans les années 1950 en se basant sur l'observation que les hépatomes (tumeurs malignes ou bénignes du foie) de rat consommaient l'uracile de manière beaucoup plus importante que les tissus normaux, ce qui laissait suggérer que le métabolisme de l'uracile pouvait être une cible thérapeutique (Rutman *et al.*, 1954). Le 5-Fu est un analogue de l'uracile avec un atome de fluor lié au carbone 5 à la place d'un atome d'hydrogène (**Figure 8**). Le 5-Fu est rapidement incorporé dans la cellule *via* le même type de transport que l'uracile, c'est-à-dire au travers du transporteur UrA (Wohlhueter *et al.*, 1980). Une fois à l'intérieur de la cellule, le 5-Fu peut s'engager dans deux voies : l'anabolisme et le catabolisme.

L'anabolisme correspond à la voie principale par laquelle le 5-Fu exerce son activité cytotoxique. Cette voie nécessite la conversion du 5-Fu en FdUMP (FluorodésoxyUridine MonoPhosphate) (**Figure 8**). Ce métabolite est capable d'inhiber une enzyme, la thymidylate synthase (TS), qui convertit le métabolite dUMP (désoxyUridine MonoPhosphate) en dTMP (désoxyThymidineMonoPhosphate) (Grem, 2000). Cette inhibition empêche la synthèse *de novo* de thymidylate, un métabolite indispensable à la réplication et à la réparation de l'ADN. Une autre voie anabolique nécessite la conversion du 5-Fu en FUTP (FluoroUridine TriPhosphate) (Miura *et al.*, 2010) (**Figure 8**). Ce métabolite sera incorporé au cours de la synthèse des ARNs, entraînant une diminution de la quantité d'ARNs synthétisés, une

inhibition de leur maturation, une diminution de leur stabilité et des modifications de leur structure (Miura *et al.*, 2010). Ces altérations s'accompagnent d'une diminution de la qualité et de la quantité de protéines produites par les cellules exposées à l'agent de chimiothérapie. Une dernière voie, la plus marginale, fait intervenir le composé FdUTP (FluorodésoxyUridine TriPhosphate), capable de s'incorporer dans l'ADN (**Figure 8**). Cette base modifiée sera reconnue par le système BER (Base Excision Repair), et dans le cas d'une réparation infructueuse, l'apoptose sera induite (Wyatt and Wilson, 2009).

Seule une faible quantité de 5-Fu utilise la voie de l'anabolisme, car la majorité du médicament est catalysée en 5-FUH2 (5-FluoroDihydrouracile) par l'enzyme DPD (DihydroPyrimidine Déshydrogénase) (**Figure 8**). Cette enzyme est présente dans la majorité des tissus, et son activité est maximale dans les lymphocytes circulants et le foie. Le 5-FUH2 sera à l'origine de la production d'autres dérivés, qui seront éliminés dans les urines (Heggie *et al.*, 1987).

Le 5-Fu présente de lourds effets secondaires, notamment au niveau gastro-intestinal, immunitaire, dermatologique, neurologique et cardiaque (Kwon, 2005). Les effets secondaires restent néanmoins prévisibles en fonction de la dose et de la fréquence d'administration du médicament.

En plus de ses effets secondaires, l'utilisation du 5-Fu est limitée par les cas de résistance. Comme l'effet anti-cancéreux du 5-Fu est basé majoritairement sur l'enzyme TS, l'expression de cette protéine dicte directement la sensibilité des tumeurs à l'agent de chimiothérapie. Dans ce sens, une corrélation entre le niveau protéique de TS et la sensibilité des tumeurs au 5-Fu a été observée dans les cancers colorectaux et mammaires (Bai *et al.*, 2015)(Inoue *et al.*, 2005)(Yu *et al.*, 2005). Par ailleurs, comme le 5-Fu est catabolisé par l'enzyme DPD, une augmentation de son expression est associée à une résistance à l'agent de chimiothérapie dans des cellules cancéreuses mammaires (Kakimoto *et al.*, 2005). D'ailleurs, une forte expression de la protéine DPD au sein de tumeurs mammaires est un marqueur de pronostic défavorable pour la survie des patientes (Horiguchi *et al.*, 2002).

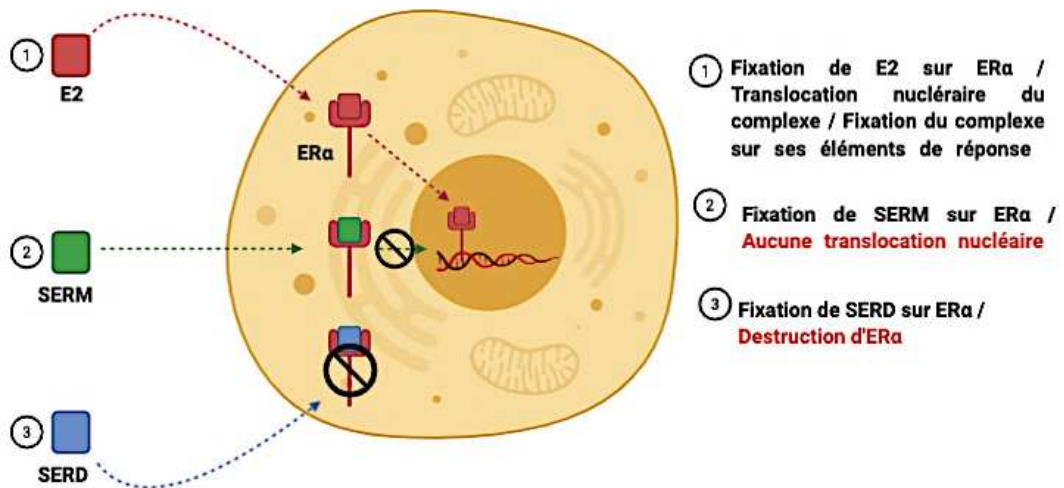


Figure 9. Représentation schématique du mode d'action des anti-oestrogènes.

Au cours de la signalisation œstrogénique classique, les œstrogènes (E2) se fixent et activent leur récepteur (ERα pour Estrogen Receptor α), induisant une translocation nucléaire du complexe qui peut jouer son rôle de facteur de transcription, et réguler l'expression de ses gènes cibles. Les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator), comme le Tamoxifène, sont des analogues structuraux des œstrogènes, et rentrent en compétition avec les hormones endogènes pour la fixation sur le récepteur. Il en découle une inhibition des voies de signalisation sous-jacentes. Les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation) induisent également une inhibition des voies œstrogènes-dépendantes, via la dégradation du récepteur par le protéasome.

I. 4. 3. 3. Protocoles de chimiothérapie dans le cancer du sein

A l'instar de bien d'autres tumeurs, le recours aux polychimiothérapies dans le traitement du cancer du sein s'est rapidement montré plus efficace que chaque agent utilisé isolément. Ces données ont été confirmées dans les années 1980 par des études randomisées comparant une monochimiothérapie à une polychimiothérapie dans la prise en charge de tumeurs mammaires métastatiques (Trishkina *et al.*, 1983).

A l'heure actuelle, de nombreux protocoles sont utilisés dans le traitement du cancer du sein, rassemblant généralement 3 agents de chimiothérapie. Ainsi, en chimiothérapie adjuvante et néo-adjuvante, le cyclophosphamide est utilisé en combinaison avec le Méthotrexate et le 5-Fluorouracile (protocole appelé CMF), ou avec du 5-Fluorouracile et de la Doxorubicine (protocole dénommé FAC), ou uniquement avec de la Doxorubicine (protocole AC) ou avec du Docétaxel (protocole TC) (INCa). Dans les cas d'une forte toxicité en présence de Doxorubicine, le recours à son isomère Epirubicine est fréquent (INCa).

I. 4. 4. Hormonothérapie & Thérapies ciblées

L'analyse de l'expression des marqueurs cités dans le **Paragraphe I. 3. 2.** a permis la caractérisation de tumeurs dites « hormono-dépendantes » pouvant être traitées à l'aide de molécules d'hormonothérapie, dont les anti-œstrogènes et les inhibiteurs d'aromatase font partie.

Les anti-estrogènes sont des molécules capables d'interagir avec le récepteur aux œstrogènes ($ER\alpha$) et d'entrer en compétition avec les hormones endogènes. Cette interaction entraîne un blocage de l'effet prolifératif des œstrogènes sur les cellules cancéreuses mammaires. Il existe deux types d'anti-estrogènes : les SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) et les SERD (Selective Estrogen Receptor Degradation) (**Figure 9**). Les SERM sont des analogues des œstrogènes endogènes, et leur interaction avec les récepteurs hormonaux va bloquer les voies de signalisation prolifératives induites normalement par les œstrogènes. Au sein de cette famille, le médicament le plus connu est le Tamoxifène, qui est un composé non stéroïdien. La chaîne latérale du Tamoxifène va empêcher l'interaction entre $ER\alpha$ et ses coactivateurs, bloquant la voie de signalisation (Kumar and Chambon, 1988). Le Tamoxifène est prescrit pour des patientes présentant des tumeurs *in situ* excisées par chirurgie pour éviter une récurrence, ou pour des patientes atteintes de tumeurs infiltrantes voire métastatiques (INCa).

Les SERD sont également capables d'interagir avec les récepteurs hormonaux, et vont induire leur dégradation (**Figure 9**). La molécule SERD commercialisée en France porte le nom de Fulvestrant, qui a une structure proche de celles des œstrogènes, à l'exception de sa chaîne latérale qui va empêcher la dimérisation d'ER α , bloquant la première étape nécessaire à l'activation de la voie de signalisation. Le Fulvestrant est généralement employé dans la prise en charge de cancers du sein chez les femmes ménopausées (Haute Autorité de Santé, HAS).

Entre la puberté et la ménopause, les œstrogènes sont principalement synthétisés par les ovaires. Après la ménopause, les ovaires cessent leur production d'œstrogènes, mais pour autant, l'organisme en produit une petite quantité en utilisant comme source les androgènes produits par les glandes surrénales, et métabolisés en œstrogènes par l'enzyme aromatasase. Ainsi, ces œstrogènes produits par le biais des aromatasases peuvent stimuler la prolifération de tumeurs mammaires hormono-sensibles même chez des femmes ménopausées. L'inhibition des aromatasases par la classe de médicaments nommés anti-aromatasases offre une autre approche thérapeutique. Les anti-aromatasases les plus utilisées en France sont le Létrozole, l'Anastrozole et l'Exémestane. L'Exémestane est un anti-aromatasase de type I, dont la structure androgénique va être reconnue par le site actif de l'aromatasase, entrant en compétition avec le substrat naturel. Les métabolites intermédiaires convertis par l'enzyme vont alors se fixer sur l'aromatasase, l'inactivant irréversiblement (Hong *et al.*, 2007). Le Létrozole et l'Anastrozole sont des anti-aromatasases de type II qui se lient de manière non covalente avec la partie hémique de l'aromatasase en occupant le site de fixation du substrat.

Si l'hormonothérapie peut être considérée comme la première thérapie ciblant les tumeurs mammaires hormono-sensibles, de nouvelles molécules actuellement employées en clinique vont cibler de manière encore plus sélective la tumeur. La principale classe de médicaments de thérapie ciblée est celle des anti-HER2. Le plus connu reste le Trastuzumab commercialisé sous le nom d'Herceptin®. Il s'agit d'un anticorps monoclonal dont la partie Fab (Fragment antigen-binding) va reconnaître spécifiquement la partie extracellulaire du récepteur transmembranaire HER2, bloquant les voies de signalisation prolifératives. D'autres mécanismes moléculaires sont susceptibles d'intervenir dans l'activité anticancéreuse du Trastuzumab. Il existe de solides preuves de l'implication du système immunitaire. En effet, lorsque le Trastuzumab est fixé sur HER2, sa partie constante va être détectée par des récepteurs présents sur la membrane de cellules immunitaires, notamment des cellules Natural Killer

(NK), conduisant à une élimination spécifique des cellules cancéreuses (Varchetta *et al.*, 2007) (Kute *et al.*, 2012) (Petricevic *et al.*, 2013) (Shi *et al.*, 2015). La protéine HER2 est également la cible d'un inhibiteur de tyrosine kinase : le Lapatinib commercialisé sous le nom de Tyverb®. Les inhibiteurs de tyrosine kinase vont permettre la régulation de l'activité de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, l'invasion, la migration et l'angiogenèse. Le Lapatinib inhibe l'activité tyrosine kinase à la fois des récepteurs Erb1 (EGFR) et Erb2 (HER2). Ce médicament est généralement prescrit dans le cas de tumeurs mammaires surexprimant HER2 ayant déjà reçu un traitement à base d'Anthracyclines et ne répondant pas ou plus au Trastuzumab (INCa). De nouveaux traitements anti-HER2 viennent d'être acceptés par l'ANSM (Agence Nationale pour le Médicament), dont le Pertuzumab (Perjeta®) qui se lie à une autre partie du récepteur HER2 que le Trastuzumab.

HER2 n'est pas la seule cible des thérapies ciblées. Ainsi, l'anticorps monoclonal Bévacicumab (Avastin®) a été conçu pour se fixer au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) impliqué dans l'angiogenèse. Cette molécule était le premier anti-angiogénique approuvé par les autorités de santé initialement pour les cancers colorectaux avancés et pulmonaires (Chen *et al.*, 2015)(Rosen *et al.*, 2017). Dans le cadre du cancer du sein, ce traitement est prescrit pour des tumeurs mammaires HER2 négatives et métastatiques (INCa). Le récepteur au VEGF est également la cible de l'inhibiteur de tyrosine kinase Sunitib (Sutent®), bien que son spectre d'action s'étende également au récepteur du facteur de croissance plaquettaire (PDGF), au récepteur de cellules souches (KIT), au récepteur Fms-like tyrosine kinase-3 (FLT3), au récepteur du facteur stimulant la formation de colonies (CSF-1R) et au récepteur du facteur neurotrophique de la lignée gliale (RET) (Kim *et al.*, 2014). Ce médicament est généralement employé dans le cas de cancers du sein métastatiques n'ayant pas répondu au Bévacicumab.

Enfin, en 2018, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé l'utilisation de l'Olaparib pour le traitement des cancers du sein métastatiques présentant des mutations des gènes codant BRCA1/2 (McCann and Hurvitz, 2018). L'Olaparib fait partie de la famille des inhibiteurs de PARP. Les protéines PARP-1 et PARP-2 sont capables de reconnaître les cassures simples brins de l'ADN. Une fois en interaction avec la zone endommagée, les protéines PARP vont utiliser du NAD⁺ comme substrat pour l'ajout de chaînes ADP-ribose sur des protéines cibles. Ce phénomène, appelé PARylation, peut notamment concerner les histones H2B et H1, ce qui entraîne un relâchement local de la chromatine pour un meilleur accès de la machinerie de réparation au niveau de la cassure simple brin (Liu *et al.*, 2017). La molécule

Olaparib est une molécule « mimique » de NAD⁺, qui va inhiber l'activité catalytique des enzymes PARP (Cook and Tinker, 2019). Ces inhibiteurs de PARP correspondent à une forme de thérapie ciblée, puisque les cellules cancéreuses, en se divisant rapidement et anarchiquement, se caractérisent par un fort taux de lésions de l'ADN (Stopper *et al.*, 2003). Dès lors, l'utilisation d'inhibiteurs de PARP, qui vont empêcher la réparation de ces lésions, va induire une entrée en apoptose plus ou moins spécifique des cellules tumorales. Les premiers essais cliniques employant l'Olaparib ont été menés sur des patientes atteintes de tumeurs mammaires ou ovariennes caractérisées par des mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*. L'idée était que ces tumeurs présentaient déjà un défaut de réparation des lésions de l'ADN, et que l'utilisation d'inhibiteurs de PARP pourrait permettre d'inhiber d'autres mécanismes de réparation. Les essais cliniques menés ont révélé une bonne efficacité qui a valu à l'Olaparib son autorisation de mise sur le marché aux USA (Robson *et al.*, 2019). Actuellement, de nombreux essais visent à élargir les indications d'utilisation des inhibiteurs de PARP, soit en monothérapie, soit en thérapie combinatoire avec de la chimiothérapie ou de la radiothérapie.

Le cancer du sein, malgré de nettes améliorations dans sa prise en charge et dans les traitements employés, reste l'une des pathologies cancéreuses les plus fréquentes et les plus mortelles dans le monde. Ceci peut s'expliquer notamment par le manque cruel de marqueurs moléculaires permettant de prédire la réponse des tumeurs mammaires aux traitements, ainsi que leur progression métastatique. De plus, les cas de résistance innée ou acquise au cours des traitements, soulignent l'importance de la caractérisation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

II. La recherche en cancérologie

Au vu des besoins actuels en cancérologie, la recherche se concentre sur 2 grands axes. Un des axes fondamentaux consiste en l'identification de marqueurs moléculaires permettant la prédiction de la progression des tumeurs, ainsi que leur réponse aux thérapies. Dans ce sens, les travaux in vitro menés précédemment par le laboratoire avaient mis en avant une potentielle utilisation de la protéine DNA-Damaged Binding 2 comme biomarqueur dans le cancer du sein. En effet, la protéine est différenciellement exprimée selon le statut métastatique des cellules cancéreuses mammaires, et son expression permet de sensibiliser les cellules à la chimiothérapie.

II. 1. La protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2)

II. 1. 1. Structure du gène et de la protéine

Chez les Mammifères, le gène codant la protéine DDB2 se trouve sur le bras court du chromosome 11 en position 11p11.2 (Rapić-Otrin *et al.*, 2003). Ce gène est formé de 1284 paires de base, répartis en 10 exons à l'origine de 5 isoformes après épissage alternatif de l'ARNm : la séquence sauvage WT (constituée de 427 acides aminés) et 4 variants plus courts appelés D1 à D4 (formés de 363 à 156 acides aminés) (Inoki *et al.*, 2004). Bien que la forme sauvage semble être exprimée de manière ubiquitaire dans la majorité des tissus, son niveau est maximal dans la cornée et minimal dans le cerveau. Au contraire, le variant D1 semble être majoritairement exprimé dans le cerveau et dans le cœur. Quant aux autres variants, ils sont très peu exprimés dans les tissus (Inoki *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, peu d'informations quant à la fonction des différents variants sont connues.

La forme protéique sauvage de DDB2 est constituée de 427 acides aminés pour un poids moléculaire de 48kDa. D'un point de vue structurale, la protéine se compose d'un motif hélice-boucle-hélice en N-terminal suivi d'un domaine WD40 et de 3 séquences NLS (Nuclear Localization Signal) rendant la protéine exclusivement nucléaire (Scrima *et al.*, 2008). Le motif hélice-boucle-hélice est impliqué dans l'interaction de DDB2 avec un partenaire protéique : DDB1 (Damaged-DNA Binding 1) (Feltz and Bonatto, 2015). Le domaine WD40 de la protéine est formé de 7 répétitions de motifs WD40, chacun formé d'environ 40 acides aminés

organisés sous la forme de 4 feuillets bêta antiparallèles et se terminant par le dipeptide tryptophane (W) – acide aspartique (D). Ce domaine WD40 est essentiel pour l'interaction de DDB2 avec l'ADN, mais permet également des interactions avec d'autres protéines (Scrima *et al.*, 2008).

II. 1. 2. Rôles de DDB2 dans le cancer

La protéine est initialement connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN lésé par les UVs. DDB2 fait ainsi partie du complexe UV-DDB avec la protéine DDB1 (p127), la Culline 4A et ROC1. Au sein du complexe, DDB2 est responsable de la reconnaissance des photolésions de type dimères de pyrimidines (notamment les dimères de cyclobutane et les photoproduits 6-4).

La présence d'un domaine WD40 au sein de la protéine DDB2, généralement impliqué dans des interactions protéine-protéine, a soulevé l'hypothèse d'un rôle de facteur de transcription joué par la protéine. C'est en 1998 qu'Hayes *et al.* ont validé cette hypothèse en mettant en évidence la capacité de DDB2 à interagir avec le facteur de transcription E2F1 *via* son domaine WD40 (Hayes *et al.*, 1998). Cette interaction permet une augmentation de l'expression des gènes cibles d'E2F1 impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. En se basant sur ces données, d'autres équipes ont prouvé l'implication de DDB2 dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans différents processus cellulaires, et ce à la fois dans les cellules saines et cancéreuses. Dans ce sens, notre équipe a mis en évidence l'implication de cette protéine dans la régulation transcriptionnelle géniques dans le cancer du sein. Les données présentées par la suite sont focalisées sur l'importance de la protéine DDB2 dans les cellules tumorales.

II. 1. 2. 1. Rôle dans la prolifération des cellules tumorales

Des auteurs ont montré que la protéine DDB2 est capable de s'opposer à la prolifération de cellules tumorales colorectales *via* sa capacité à inhiber la voie de signalisation Wnt (Huang *et al.*, 2017b). En effet, DDB2 est capable de recruter les protéines EZH2 (Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit) et β -caténine au niveau du promoteur du gène *Rnf43* (Ring Finger Protein 43). Ce recrutement induit une augmentation de l'expression du gène codant l'enzyme RNF43, dont l'action va entraîner une dégradation des récepteurs Wnt à la surface des cellules colorectales, inhibant la voie de signalisation.

*Cellule cancéreuse mammaire DDB2-
(MDA-MB231 & Hs578t)*

*Cellule cancéreuse mammaire DDB2+
(MCF-7 & T47D)*

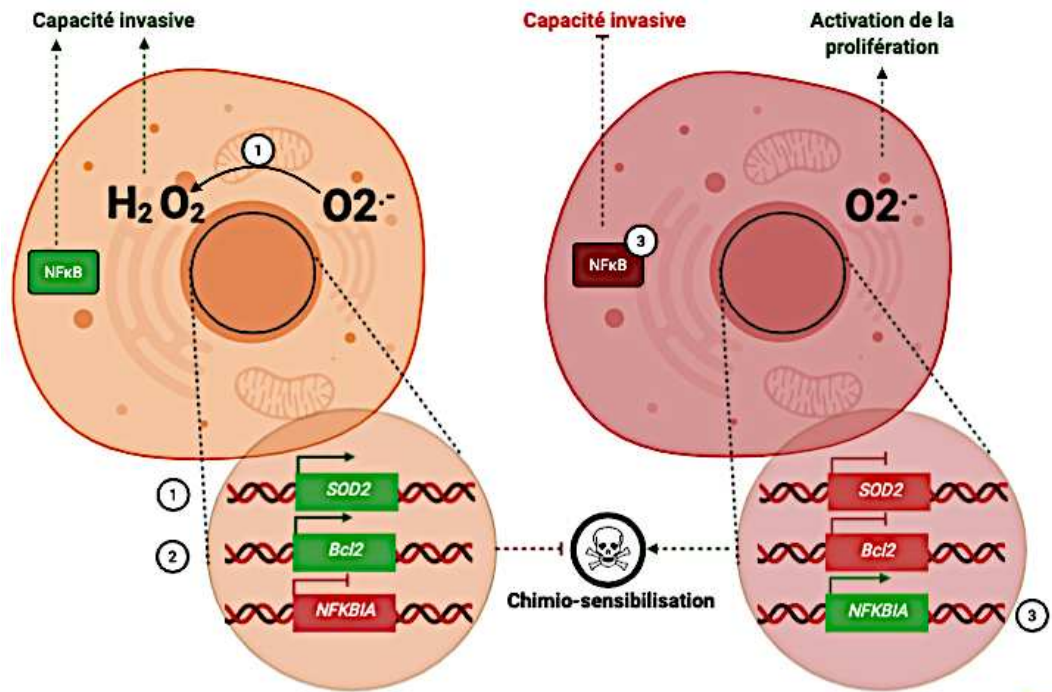


Figure 10. Représentation schématique du rôle de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires. Dans les cellules exprimant naturellement la protéine (MCF-7 et T47D), DDB2 contrôle l'expression de gènes cibles via son activité transcriptionnelle. Ainsi, en réprimant l'expression du gène SOD2 codant MnSOD, la protéine DDB2 provoque une accumulation d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, décrit comme activateur de la prolifération cellulaire, au détriment de l'ion superoxyde H_2O_2 connu pour sa capacité à réguler les capacités migratrices et invasives de cellules cancéreuses. DDB2 est également capable d'induire l'expression du gène NFKBIA codant $I\kappa B\alpha$, qui séquestre le facteur de transcription NF- κB dans le cytoplasme, à l'origine d'une répression de l'activité de la voie NF- κB impliquée dans l'invasion tumorale. Enfin, DDB2 régule négativement l'expression du gène codant Bcl2, mécanisme à l'origine d'une sensibilité des cellules à des agents de chimiothérapie.

D'autres études ont montré que la surexpression de DDB2 dans des cellules cancéreuses ovariennes entraîne une diminution de leur capacité proliférative (Zhao *et al.*, 2015). En effet dans ces cellules, l'expression de DDB2 permet de les sensibiliser à l'effet antiprolifératif du TGF β (Transforming Growth Factor Beta). Au niveau moléculaire, la protéine DDB2 est capable d'inhiber l'expression du gène *NEDD4L*. La protéine NEDD4L (NEDD4 Like E3 Ubiquitin Protein Ligase) est connue pour reconnaître les formes actives de Smad2/3, qui sont les effecteurs de la voie de signalisation du TGF β (Gao *et al.*, 2009). Ces effecteurs vont alors être polyubiquitinylés *via* l'activité E3 Ubiquitine Ligase de NEDD4L, et seront par la suite dégradés par le protéasome, aboutissant à un maintien de l'activité de la voie TGF β .

La protéine DDB2 intervient également dans le contrôle de la division de cellules cancéreuses mammaires. Notre équipe a montré que l'inhibition de son expression par ARN interférence dans des cellules tumorales mammaires qui l'expriment naturellement (MCF-7) induit une diminution de leur capacité proliférative, due à une entrée retardée dans la phase de transition G1/S, ainsi qu'un ralentissement dans la progression au cours de la phase S (Kattan *et al.*, 2008). Le rôle joué par DDB2 au cours du cycle cellulaire résulte en partie de sa capacité à interagir avec un élément de réponse au niveau du promoteur minimal du gène *SOD2* codant pour la superoxyde dismutase mitochondriale (MnSOD) (Minig *et al.*, 2009) (**Figure 10**). La fixation de DDB2 sur cet élément de réponse est associée à une modification locale du niveau d'acétylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27), entraînant une perturbation de la fixation de facteurs de transcription nécessaires à l'expression du gène. L'ensemble de ces événements se traduit par une inhibition de l'expression de la MnSOD, une enzyme participant aux défenses contre les radicaux libres en catalysant la transformation de l'anion superoxyde (O $_2^-$) en peroxyde d'hydrogène (H $_2$ O $_2$). Par conséquent, la répression de l'expression de la MnSOD induite par DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires entraîne une accumulation d'anions superoxydes (**Figure 10**), décrits comme pouvant activer de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire (López-Lázaro *et al.* 2007).

II. 1. 2. 2. Rôle dans la migration et l'invasion tumorale

Une étude a mis en évidence l'implication de DDB2 dans l'acquisition d'un pouvoir invasif de cellules tumorales colorectales. Dans ce modèle, l'expression de la protéine induit une inhibition d'une étape précoce de la dissémination métastatique : la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L'inhibition de l'expression de DDB2 par ARN interférence

entraînait l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, qui se caractérise par une expression augmentée de la vimentine et de la N-cadhérine au détriment de marqueurs épithéliaux, comme la E-cadhérine et les cytokératines 18 et 19 (Roy *et al.*, 2013). Cette régulation de la TEM dépend de l'action de DDB2 en tant qu'inhibiteur transcriptionnel de l'expression des facteurs de transcription Snail, Zeb1 (Zing finger E-Box-binding homeobox 1) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui sont des inducteurs connus de la TEM. En effet, la fixation de DDB2 sur le promoteur de ces gènes favorise le recrutement de Suv39h, une méthylase de l'histone H3K9, responsable d'une triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, réprimant l'expression des gènes concernés. Ces mêmes gènes sont réprimés par DDB2 dans les cancers de la tête et du cou aboutissant de la même manière à une inhibition de la TEM (Bommi *et al.*, 2018).

Le laboratoire a également montré que DDB2 s'oppose à l'acquisition d'un phénotype invasif et migratoire des cellules tumorales mammaires. En effet, la surexpression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231 et SKBr3 limite leur capacité invasive *in vitro*, et bloque leur capacité à coloniser les poumons *in vivo* (Ennen *et al.*, 2013). Ces données ont été confirmées par une analyse rétrospective sur plus de 200 échantillons de tumeurs mammaires qui confirme une corrélation inverse entre le niveau d'expression de la protéine DDB2 et le grade SBR des tumeurs mammaires reflétant le degré d'agressivité des tumeurs (Ennen *et al.*, 2013). Dans cette étude, la capacité de DDB2 à inhiber l'acquisition d'un pouvoir métastatique des tumeurs mammaires a été corrélée à son effet sur l'expression des gènes *NFKBIA* et *SOD2* codant IκBα et MnSOD respectivement (**Figure 10**). En effet, en maintenant une expression faible de MnSOD, la protéine DDB2 favorise l'accumulation de l'anion superoxyde (O₂⁻) au détriment du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les cellules tumorales mammaires MCF-7 et T47D. Alors que l'anion superoxyde est décrit comme activateur de la prolifération cellulaire, le peroxyde d'hydrogène est plutôt connu pour sa capacité à stimuler les voies de signalisation associées à la migration et l'invasion des cellules cancéreuses (Miar *et al.*, 2015). L'autre mécanisme par lequel DDB2 régule les capacités invasives des cellules tumorales mammaires concerne la voie de signalisation NF-κB. Plus précisément, DDB2 est capable de réguler positivement l'expression du gène *NFKBIA* codant IκBα, l'inhibiteur cytoplasmique du facteur de transcription NF-κB connu pour son implication dans la régulation de gènes impliqués dans l'invasion tumorale (**Figure 10**). En effet, DDB2 se fixe sur un élément de réponse au niveau du promoteur de *NFKBIA*, et active l'expression du gène (Ennen *et al.*, 2013). L'augmentation

de l'expression d'IkBa est associée à une baisse de l'activité de NF-κB, et par conséquent une baisse de l'expression de ses gènes cibles, dont le gène codant la métalloprotéase matricielle MMP9 à l'origine d'une dégradation de la matrice extracellulaire environnante, étape nécessaire à la migration cellulaire. L'équipe a également montré que la protéine DDB2 intervient dans une étape précoce de la transition épithélio-mésenchymateuse : les modifications des propriétés d'adhérence cellulaire. En effet, la surexpression de DDB2 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 induit une baisse de leur adhérence sur des supports neutres tels que le verre et le plastique (Barbieux *et al.*, 2016). Ces modifications d'adhérence sont associées à une diminution de l'élasticité membranaire, à un réarrangement du cytosquelette d'actine corticale ainsi qu'à une modulation de l'expression de gènes impliqués dans ces processus (notamment les gènes codant TGFβ1, CTGF pour Connective Tissue Growth Factor et ICAM-1 pour InterCellular Adhesion Molecule 1).

Pour autant, une autre étude semble indiquer que DDB2 stimule la migration et l'invasion des cellules cancéreuses gastriques AGS (Qiao *et al.*, 2015). La protéine semble exercer ce rôle *via* sa capacité à cibler la protéine PAQR3 (Progesterin and AdipoQ Receptor family member III) pour son ubiquitylation et sa dégradation par le protéasome. Or, la protéine PAQR3 s'oppose à la progression métastatique, en inhibant la migration, l'invasion et l'angiogenèse.

II. 1. 2. 3. Rôle dans l'apoptose

Le lien entre DDB2 et l'apoptose a été établi par l'observation de mutations du gène responsables d'une maladie appelée Xeroderma Pigmentosum de groupe E (XPE). Ce phénotype se caractérise par une augmentation du risque de développer un cancer de la peau par l'acquisition d'une résistance à l'apoptose induite par une exposition aux UVs des cellules de la peau. Pour confirmer le lien entre DDB2 et l'apoptose, Itoh *et al.* ont montré que des fibroblastes murins embryonnaires (ou MEF pour Murin Embryonic Fibroblasts) rendus déficients pour *ddb2* sont anormalement résistants à l'apoptose après exposition aux UVs, conduisant à la formation de tumeurs (Itoh *et al.*, 2004). Ce défaut d'entrée en apoptose a été associé à une diminution de l'expression de la protéine pro-apoptotique p53. Stoyanova *et al.* ont confirmé l'implication de DDB2 dans la sensibilité des MEFs non seulement aux UVs, mais également à des agents chimiques comme le cisplatine (Stoyanova *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs ont montré que l'absence d'entrée en apoptose des MEFs en réponse aux UVs

ou au cisplatine est due à l'accumulation de la protéine p21^{Waf1/Cip1} qui est normalement ubiquitinylée *via* l'activité E3 Ubiquitin Ligase de la protéine Cul4A du complexe UV-DDB. Ces études suggèrent donc que l'expression de DDB2 est importante pour la sensibilité des cellules aux UVs ou à des agents de chimiothérapie.

Dans ce sens, Dan *et al.* ont montré que l'expression de DDB2 corrèle positivement avec la sensibilité de 39 lignées cellulaires humaines cancéreuses face à 55 agents de chimiothérapie (Dan *et al.*, 2002). En accord avec ces résultats, la protéine DDB2 est naturellement surexprimée dans les cellules cancéreuses ovariennes A2780 sensibles au cisplatine, par rapport aux cellules cancéreuses ovariennes CP70 et MCP2 résistantes à l'agent de chimiothérapie et présentant une faible expression de DDB2 (Barakat *et al.*, 2010). De manière intéressante, la surexpression de DDB2 dans les cellules CP70 sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le cisplatine, sans que DDB2 ne soit nécessaire à la réparation des dommages à l'ADN causés par l'agent de chimiothérapie. Dans ces cellules, DDB2 induit une diminution de l'expression du gène anti-apoptotique *bcl2*. D'autres travaux ont permis d'identifier un élément de réponse de DDB2 sur la région promotrice de *bcl2*. Ainsi, la protéine DDB2, en partenariat avec DDB1, permet le recrutement de l'histone désacétylase 1 (HDAC1) dont l'action va induire une diminution de l'acétylation des lysines 9 et 14 de l'histone 3 (H3K9,14) à l'origine de la répression transcriptionnelle de *bcl2* (Zhao *et al.*, 2014).

L'implication de DDB2 dans la sensibilité de cellules cancéreuses à la chimiothérapie a également été montrée par notre équipe dans le modèle du cancer du sein (Thèse de Rémi Klotz, 2014). En effet, une surexpression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231, présentant une faible expression basale de la protéine, induit une augmentation significative de l'entrée en apoptose en réponse à deux agents de chimiothérapie : le 5-Fluorouracile et la Doxorubicine. Cet effet chimiosensibilisant repose à la fois sur la diminution de l'expression de *bcl2* et sur la diminution de l'activité de NF- κ B (**Figure 10**).

II. 1. 3. Régulation de l'expression de DDB2

La régulation de l'expression du gène *ddb2* reste à l'heure actuelle très peu connue. Dans des cellules humaines normales fibroblastiques, une augmentation d'un facteur 4 du niveau d'ARNm codant DDB2 est observée au bout de 48 heures après exposition aux UVs (Nichols *et al.*, 2000). De manière intéressante, une exposition aux UVs de ces même cellules



Figure 11. Représentation schématique de la régulation transcriptionnelle du gène codant la protéine DDB2. La région 5'UTR (UnTranslated Region) du gène est impliquée dans la régulation de son expression par l'intermédiaire de la protéine p53, dont la fixation sur ses éléments de réponse est favorisée par les protéines BRCA1 et TP63 γ . En amont du site d'initiation de la transcription (+1) se trouvent des éléments de réponse pour NF-1, E2F et 4 sites de fixation pour Sp1 (appelés Sp1(4), Sp1(3), Sp1(2) et Sp1(1)) (d'après Liu et al., 2012)(Takimoto et al. 2002)(Tan et Chu., 2002)(Nichols et al., 2003).

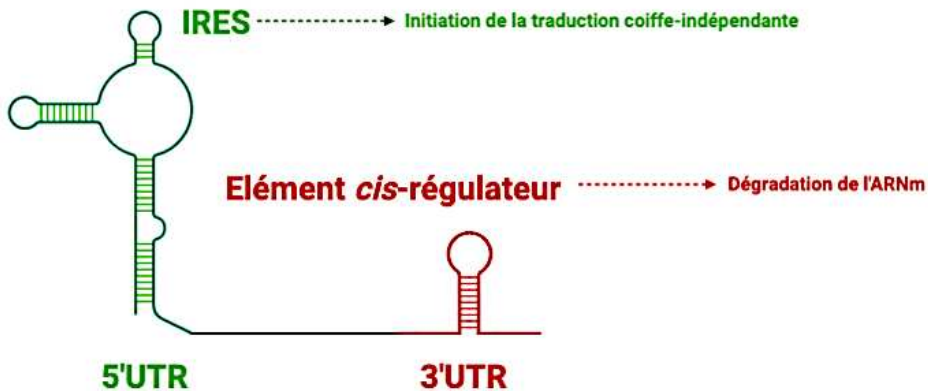


Figure 12. Représentation schématique de la régulation post-transcriptionnelle de DDB2. La région 5'UTR (UnTranslated Region) du messenger codant DDB2 contient un élément IRES (Internal Ribosome Entry Site) permettant l'initiation de la traduction indépendamment de la coiffe 7-méthylguanosine, et ce en réponse à un stress généré par sevrage en sérum ou après traitement à la Doxorubicine. Cet élément permet donc une augmentation du taux protéique de DDB2. Au contraire, la région 3'UTR du messenger contient un élément cis-régulateur favorisant la dégradation de l'ARNm, aboutissant à une diminution du taux protéique de DDB2. D'après (Melanson et al., 2013)(Dai et al., 2015).

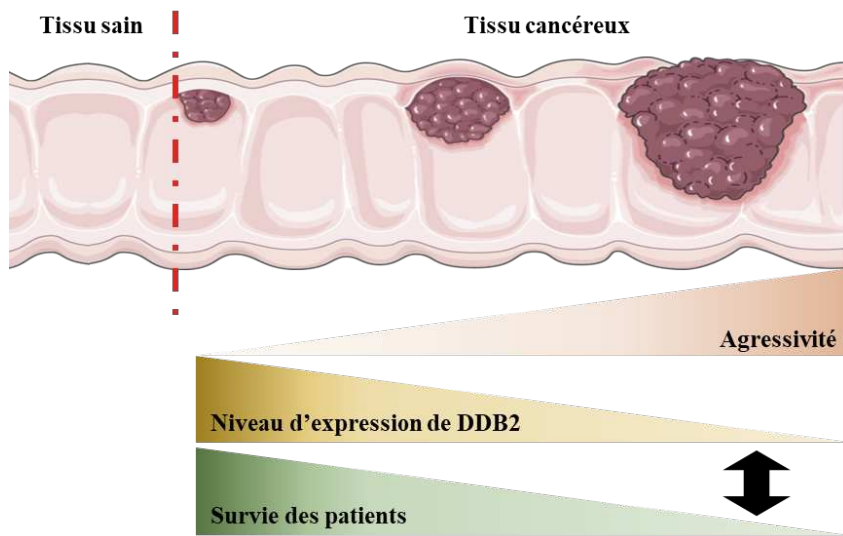
rendues déficientes pour le gène codant p53 ne permet pas d'observer d'induction de l'expression de *ddb2*, suggérant une régulation p53-dépendante du gène (Hwang *et al.*, 1999). Dans ce sens, Tan *et al.* ont identifié un élément de réponse de p53 dans la région 5'UTR (UnTranslated Region) du gène codant DDB2, et ont mis en évidence une interaction de p53 sur cet élément de réponse à l'origine de l'activation transcriptionnelle du gène (Tan and Chu, 2002) (**Figure 11**). De plus, la surexpression de BRCA1 et de Tap63 γ (une isoforme de la protéine p63 présentant des homologues de structure avec p53) est capable d'induire l'expression de *ddb2*, en favorisant l'interaction de p53 avec son élément de réponse au niveau du promoteur du gène (**Figure 11**) (Takimoto *et al.*, 2002) (Liu *et al.*, 2012).

Une étude de la région promotrice du gène *ddb2* a permis d'identifier la séquence promotrice minimale permettant une expression basale de *ddb2* dans les cellules cancéreuses utérines HeLa. Cette région minimale se situe à 220 paires de base en amont du site putatif d'initiation de la transcription (Nichols *et al.*, 2003). Par ailleurs, ce travail a également démontré la présence au niveau du promoteur proximal de *ddb2* d'éléments de réponse des facteurs de transcription NF-1 (Neurofibromin-1) et E2F, ainsi que 4 sites consensus de fixation de Sp1 (**Figure 11**).

D'autres études ont montré que l'expression de la protéine DDB2 peut être régulée par des mécanismes post-transcriptionnels en condition de stress. En effet, l'ARNm de DDB2 possède un élément cis-régulateur de 25 nucléotides dans sa région 3'UTR qui permet de réguler la demi-vie du messager, en accélérant sa dégradation (Melanson *et al.*, 2013) (**Figure 12**). Enfin, la région 5'UTR du messager de *ddb2* contient un élément IRES (Internal Ribosome Entry Site), permettant l'initiation de la traduction du messager indépendamment de la coiffe 7-méthylguanosine (Dai *et al.*, 2015) (**Figure 12**). Cet élément IRES permet une augmentation rapide du niveau protéique de DDB2 en absence de modification du taux de transcrits en réponse à un stress généré soit par sevrage en sérum soit après traitement à la Doxorubicine.

II. 1. 4. La protéine DDB2 en clinique

Au vu de son implication dans l'invasion des tumeurs du colon, le niveau d'expression de DDB2 a été évalué dans des tumeurs de différents grades histologiques. Roy *et al.* ont montré que l'expression de la protéine DDB2 est significativement plus faible dans des tissus tumoraux



Type de cancer	Expression de DDB2 dans les tissus sains	Expression de DDB2 dans les tissus cancéreux
Cancer colorectal (étude de Roy et al., 2013)	+++	+
Cancer ovarien (étude de Han et al., 2014)	+++	+
Cancer de la langue (étude de Bommi et al., 2014)	+++	+
Cancer prostatique (étude de Chen et al., 2017)	+++	+
Cancer colorectal (étude de Yang et al., 2018)	+	+++

Figure 13. Représentation schématique du rôle de DDB2 comme marqueur clinique de la progression métastatique de différents cancers. 5 études ont permis de valider la valeur prédictive de DDB2 dans la progression métastatique de tumeurs colorectales, ovariennes, prostatiques et de la langue. Dans un 1^{er} temps, les auteurs ont montré que l'expression de DDB2 est plus forte dans les tissus sains des ovaires, de la prostate et de la tête & du cou par rapport aux tissus cancéreux. Dans le tissu colorectal, les 2 études apportent des résultats contradictoires. En effet, dans l'étude de Roy et Yang, la protéine DDB2 est surexprimée respectivement dans les tissus sains et les tissus cancéreux. Pour autant, les 5 études s'accordent sur la surexpression de DDB2 dans les tumeurs ovariennes, prostatiques, colorectales et de la langue de faible agressivité (faible grade histologique) par rapport aux tumeurs métastatiques. De plus, une forte expression de DDB2 est prédictive d'une meilleure survie de patients cancéreux par rapport aux patients dont les tumeurs arborent une faible expression de la protéine. D'après (Roy et al., 2013)(Yang et al., 2018)(Han et al., 2014)(Bommi et al., 2014)(Chen et al., 2017).

du colon par rapport aux tissus sains (Roy *et al.*, 2013). Parmi les tissus cancéreux, les carcinomes moins agressifs de faible grade (grade I) présentent une expression significativement plus élevée que les carcinomes de grade II et III (plus agressifs). Enfin, les tumeurs métastatiques présentent la plus faible expression de DDB2, avec un niveau protéique diminué de moitié par rapport aux tissus sains (**Figure 13**). Dans cette étude, la diminution du niveau d'expression de DDB2 dans les tumeurs de hauts grades histologiques est corrélée à une diminution de l'expression de la E-cadhérine, un marqueur épithélial. Ces données viennent conforter les études ayant démontré l'effet inhibiteur de DDB2 sur la transition épithélio-mésenchymateuse dans le modèle du cancer colorectal.

Au contraire, une étude a montré que l'expression de DDB2 est significativement plus importante dans les carcinomes colorectaux par rapport aux adénomes colorectaux (non cancéreux) et aux tissus sains (Yang *et al.*, 2018). Pour autant, au sein des carcinomes colorectaux, DDB2 est surexprimée dans les tumeurs de faibles grades histologiques (T1 et T2) par rapport aux tumeurs de hauts grades (T3 et T4). De plus, les tumeurs colorectales métastatiques présentent une plus faible expression de DDB2 par rapport aux tumeurs non métastatiques (**Figure 13**). L'étude a également révélé qu'une forte expression de DDB2 est corrélée à une meilleure survie de patients atteints de cancer colorectal. En conclusion, cette étude confirme la corrélation négative entre le niveau d'expression de DDB2 et le grade histologique des tumeurs colorectales, mais apporte des informations contradictoires concernant les différences d'expression entre tissu colorectal sain et tumoral par rapport à l'étude précédente.

L'expression de la protéine DDB2 est également plus importante dans les tissus sains des ovaires (Han *et al.*, 2014), de la langue (Bommi *et al.*, 2018) et de la prostate (Chen *et al.*, 2017), par rapport à leurs équivalents cancéreux (**Figure 13**). Au sein des tumeurs ovariennes, prostatiques et de la tête & du cou, une forte expression du gène codant DDB2 est associée à une meilleure survie des patients par rapport aux tumeurs présentant une faible expression du gène.

Les résultats in vitro acquis par le laboratoire d'accueil indiquaient la possible utilisation de DDB2 comme biomarqueur dans le modèle du cancer du sein, comme ce qui a

été montré dans d'autres cancers. Pour autant, il est nécessaire de confronter ces données in vitro à des données issues d'échantillons de tumeurs mammaires.

En plus du besoin actuel de biomarqueurs pour la prédiction du devenir métastatique des tumeurs mammaires et leur réponse à la thérapie, les cas de résistance associés aux lourds effets secondaires observés en présence des thérapies conventionnelles soulignent la nécessité d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette démarche, la famille des complexes organométalliques attire une attention accrue de la recherche en cancérologie.

II. 2. Les complexes organométalliques dans le traitement du cancer

La plupart des traitements employés actuellement en cancérologie vise à cibler l'ADN des cellules hyper-prolifératives, dont les cellules cancéreuses, par trois grands mécanismes : 1) par la diminution du taux de nucléotides intracellulaires disponibles pour la réplication de l'ADN (antimétabolites) aboutissant à une inhibition de la prolifération cellulaire, 2) par la formation de dommages à l'ADN (agents alkylants) conduisant généralement à une entrée en apoptose, et 3) par une inhibition des enzymes ayant pour substrat l'ADN (les topoisomérases par exemple). Les mécanismes d'action de ces agents ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses puisque les cellules saines sont également impactées, conduisant à l'émergence d'effets secondaires parfois très importants. Les thérapies ciblées et l'hormonothérapie ont permis de mieux cibler les tumeurs, tout en préservant les tissus sains environnants. Pour autant, de nombreux cas de résistance en réponse à la chimiothérapie conventionnelle et aux thérapies ciblées ont été observés. De ce fait, les principales lignes de recherche se focalisent aujourd'hui sur l'élaboration de nouvelles molécules possédant une activité anticancéreuse associée à une faible cytotoxicité pour les cellules saines environnant la tumeur (Pucci *et al.*, 2019). Des composés de natures chimiques différentes, y compris de nombreux dérivés naturels, montrent des potentialités chimiothérapeutiques. Depuis la découverte des propriétés anticancéreuses du cisplatine dans les années 1960, les complexes organométalliques sont de plus en plus utilisés en chimiothérapie.

II. 2. 1. Généralités sur les complexes organométalliques

Un composé organométallique est une molécule chimique présentant au moins une interaction forte, généralement associable à une liaison covalente, entre un atome de carbone d'un ligand organique et un métal, ou un de ses ions. Les propriétés physico-chimiques des

complexes organométalliques, qui regroupent leur activité redox, leurs modes de coordination variables et leur capacité à interagir avec les molécules organiques, les rendent souvent plus intéressantes que les simples composés organiques, autant en termes de synthèse que de réactivité. Il convient de rappeler que les métaux sont des composés cellulaires essentiels qui interviennent dans de nombreuses réactions biochimiques, en conséquence la stabilité du complexe organométallique sera essentielle pour assurer son efficacité thérapeutique. Pour autant, une dérégulation de la concentration de ces métaux est associée au développement de nombreuses pathologies, dont le cancer.

La première molécule à activité biologique à avoir été catégorisée comme complexe organométallique a été la cobalamine, encore appelée vitamine B12. La structure de cette vitamine hydrosoluble indispensable au bon fonctionnement du système nerveux central a été résolue pour la première fois par Dorothy Hodgkin, ce qui lui a valu le prix Nobel de Chimie en 1964 (Scott and Molloy, 2012). La cobalamine est ainsi composée d'un ion cobalt(II) contenu au centre d'un noyau corrinoïde. Depuis, de nombreuses autres molécules biologiques contenant une liaison métal-carbone ont été découvertes (transferrine, hémoglobine...). Bien avant la rationalisation des structures des molécules biologiques de type organométallique, leur toxicité était bien connue depuis des siècles. L'exemple le plus connu reste les composés à base d'arsenic utilisés en tant que poison mortel. Un dérivé de l'arsenic synthétisé par Paul Ehrlich au XX^{ème} siècle, le Marphasen, est le premier complexe organométallique à avoir été utilisé en tant qu'agent de traitement dans le cas de la syphilis. Dans les années 90, des essais cliniques ont permis de caractériser l'efficacité d'un complexe organométallique à base d'or, l'Auranofin, dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (Itokazu *et al.*, 1995). Ce même complexe est capable de cibler spécifiquement les lymphocytes CD4⁺ infectés par le VIH (Lewis *et al.*, 2011). Mais le domaine dans lequel les complexes organométalliques sont les plus prometteurs reste la cancérologie. Historiquement, le premier complexe organométallique pour lequel une activité anticancéreuse a été montrée est le cisplatine, à base de platine.

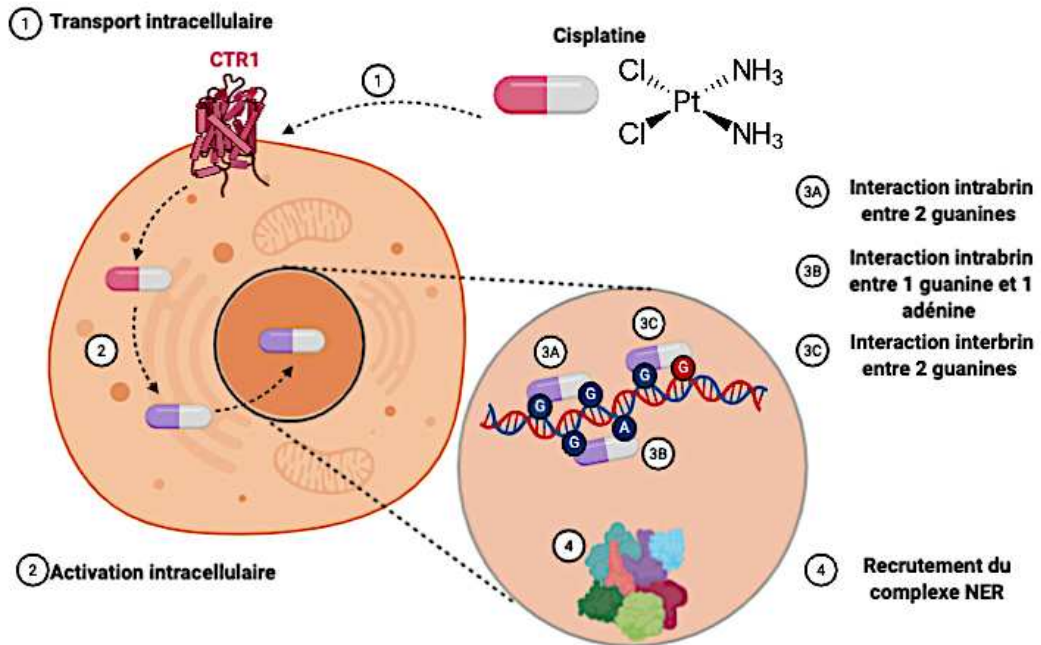


Figure 14. Représentation schématique du devenir intracellulaire du cisplatine. L'entrée du cisplatine (dont la structure moléculaire est représentée) se fait par l'intermédiaire du récepteur du cuivre CTR1. Le cisplatine intracellulaire est ensuite activé via la faible concentration en ions chlorures du milieu intracellulaire. Ensuite, le cisplatine activé va interagir avec l'ADN pour former soit des interactions intrabrin entre 2 guanines voisines (1,3-Pt-d(GpG)) ou entre 1 guanine et 1 adénine voisines (1,2-Pt-d(ApG), soit des interactions interbrins (Pt-d(GG)). Ces interactions vont générer des cassures doubles brins, qui seront reconnues par la machinerie de réparation NER (Nucleotide Excision Repair). Si ces lésions ne sont pas réparables, la cellule entrera en apoptose.

II. 2. 2. Les complexes à base de platine

II. 2. 2. 1. Le cisplatine

Le cisplatine, ou cis-diaminedichloroplatine(II) (CDDDP) est un complexe à base de platine stable à température ambiante, bien qu'une transformation en son isomère *trans* soit observée au cours du temps (Allen *et al.*, 1978). Le cisplatine a été synthétisé pour la 1^{ère} fois en 1844 par M.Peyronne, et sa structure chimique a été élucidée en 1893 par Alfred Werner (Riley, 1988). Pour autant, il a fallu attendre les années 1960 pour que ce composé attire l'attention des scientifiques. En effet, son activité anticancéreuse a été découverte de manière fortuite par Barnett Rosenberg en 1965, qui travaillait sur la division bactérienne. Rosenberg avait mis en évidence la capacité du cisplatine à interagir avec l'ADN bactérien conduisant à une inhibition de la prolifération (Muggia *et al.*, 2015). Face à ces résultats, Rosenberg commença des collaborations dans le but d'explorer les capacités antitumorales du cisplatine. Ces expériences ont prouvé l'efficacité de cette molécule sur un panel de lignées cellulaires tumorales, dont des modèles de tumeurs mammaires et leucémiques (Muggia *et al.*, 2015). Au regard de ce succès en phase préclinique, le cisplatine a été testé en essai clinique dès les années 1960, et a montré une efficacité intéressante contre de nombreux cancers (Muggia *et al.*, 2015). Pour autant, l'autorisation de mise sur le marché du cisplatine par l'agence américaine pour la sécurité des médicaments (FDA) n'a été accordée qu'en 1978. Ce délai s'explique par l'observation d'effets secondaires plus ou moins importants notamment au niveau rénal.

Le mode d'action du cisplatine peut être subdivisé en 2 étapes :

La 1^{ère} étape correspond à l'entrée du cisplatine dans la cellule, qui se fait à l'aide du transporteur de cuivre CTR1 (**Figure 14**). Cette protéine de 23kDa possède trois domaines transmembranaires, et est capable de s'oligomériser pour former un trimère fonctionnel avec un pore central pour le transport du cuivre (Oun *et al.*, 2018). L'importance de CTR1 pour le transport intracellulaire du cisplatine a été prouvée par l'invalidation du gène codant ce récepteur à la fois dans des cellules de levure (*Saccharomyces Cerevisiae*) (Oun *et al.*, 2018) et des fibroblastes embryonnaires de souris (Ishida *et al.*, 2002), se traduisant par une diminution de la quantité intracellulaire de cisplatine associée à une augmentation de la résistance face à cette molécule. Des analyses d'immunohistochimie réalisées sur des souris ont révélé une expression tissu-dépendante de CTR1, avec une distribution importante dans les canalicules hépatiques, les tubules du cortex rénal, les entérocytes de l'intestin grêle, le plexus choroïde et

les capillaires cérébraux (Kuo *et al.*, 2006). Cette expression tissu-dépendante est à l'origine des effets secondaires observés avec le cisplatine. Ainsi, il a été montré que l'expression de CTR1 au niveau des tubules du cortex rénal est à l'origine d'une accumulation du cisplatine au niveau des reins, causant une toxicité importante (Pabla *et al.*, 2009). Il semblerait que la partie NH₂-terminale de CTR1, riche en méthionines et indispensable à l'absorption de cuivre, soit également impliquée dans la prise en charge du cisplatine (Sinani *et al.*, 2007). Pour autant, les mécanismes d'internalisation du cuivre et du cisplatine semblent être différents. En effet, la fixation du cisplatine sur le trimère CTR1 n'induit pas de modification de la conformation du trimère, comme ce qui est le cas au cours de l'absorption du cuivre. Malgré la forte prévalence d'une prise en charge du cisplatine par CTR1, l'entrée du complexe à base de platine ne se fait pas uniquement par ce récepteur. En effet, l'inhibition de l'expression du transporteur OCT2 par ARN interférence induit une diminution de l'entrée du cisplatine dans des tubules rénaux, soulignant l'importance de ce récepteur dans l'internalisation de la molécule (Pabla *et al.*, 2009).

La 2^{ème} étape correspond à l'activation intracellulaire du cisplatine (**Figure 14**). Après son transport intracellulaire, la faible concentration en ions chlorures du milieu intracellulaire (3 à 20 mM) par rapport au milieu sanguin (100 mM) va favoriser la substitution des ligands chlorures du cisplatine par des molécules d'eau (Pil and Lippard, 2002). Cette réaction d'hydrolyse produit un électrophile extrêmement réactif capable d'interagir avec des nucléophiles comme les groupements sulfhydryles des protéines ou les acides nucléiques.

En effet, le cisplatine activé réagit avec l'azote en position 7 des guanines et des adénines de l'ADN pour former des adduits covalents (Fichtinger-Schepman *et al.*, 1985), correspondant aux interactions intrabrins entre deux guanines adjacentes (appelés 1,3-Pt-d(GpG)), ou entre une guanine et une adénine voisines (appelés 1,2-Pt-d(ApG)) (**Figure 14**). Des interactions interbrins de deux guanines, appelés Pt-d(GG), peuvent également apparaître (**Figure 14**). Ces adduits vont alors entraîner une importante distorsion locale qui conduit à la condensation du brin d'ADN (Hou *et al.*, 2009). L'ensemble des modifications de la structure de la chromatine interfère avec les machineries de réplication et de transcription de l'ADN, à l'origine d'une inhibition de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose (Ummat *et al.*, 2012). Les adduits cisplatine-ADN peuvent être reconnus par les machineries de réparation de l'ADN, notamment par la machinerie NER (Nucleotide Excision Repair) couplée à la transcription (**Figure 14**). En effet, lorsque les ARN polymérases vont rencontrer ces adduits, ils vont entraîner un recrutement des protéines du système TC-NER (Transcription Coupled-

NER) dans le but de réparer ces lésions. Si les lésions ne sont pas réparées, une entrée en apoptose en découle. Dans ce sens, des cellules CS-A et CS-B provenant de patients avec un déficit en protéines du système TC-NER sont hypersensibles à l'effet pro-apoptotique du cisplatine (Furuta *et al.*, 2002). Comme cité précédemment, une augmentation de la réparation des lésions induites par le cisplatine est associée à des cas de résistance.

En plus de son impact sur la double hélice de l'ADN, le cisplatine est également capable d'entraîner une surproduction de ROS (notamment par sa capacité à interagir avec l'ADN mitochondrial), une dérégulation de l'homéostasie du calcium et une dérégulation de voies de signalisation intracellulaires comme les voies MAPK (Mitogen-Activated protein kinase), JNK (Jun amino-terminal kinase), PKC (Protein Kinase C) et AKT/PI3K (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014).

Enfin, le cisplatine est également capable d'induire une entrée en sénescence. Il semblerait que l'entrée en apoptose ou l'entrée en sénescence dépende de la dose de cisplatine. Ainsi, il a été montré que de faibles doses (0,5 µg/mL) induisent une entrée en sénescence de la lignée de carcinome naso-pharyngien CNE1, alors que de fortes doses sont corrélées à l'entrée en apoptose (Wang *et al.*, 1998).

En clinique, le succès principal du cisplatine concerne le cancer testiculaire, pour lequel une diminution d'environ 90% de la mortalité a été observée (Bokemeyer *et al.*, 1999). De plus, le cisplatine correspond également au traitement de référence pour les tumeurs pulmonaires à petites cellules (Go and Adjei, 1999). Pour les tumeurs pulmonaires non à petites cellules, son utilisation après chirurgie apporte un bénéfice de survie de 5,3% par rapport à la chirurgie seule (Go and Adjei, 1999). Dans le cas du cancer du sein, un essai clinique a montré que le cisplatine est efficace dans le traitement des tumeurs mammaires triples négatives, pour lesquelles peu d'options thérapeutiques sont disponibles (Goel *et al.*, 2010).

Le cisplatine n'est pas uniquement utilisé en monothérapie, mais en association avec d'autres agents de chimiothérapie, comme le Paclitaxel, la Doxorubicine, la Gemcitabine et le 5-Fluorouracile (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014), ou en combinaison avec la radiothérapie, par exemple dans les cancers de la tête et du cou (Marcu *et al.*, 2003)(Fayette *et al.*, 2015)(Helfenstein *et al.*, 2019).

L'effet secondaire le plus limitant du cisplatine correspond à sa néphrotoxicité (Oun *et al.*, 2018). D'autres effets délétères, tels qu'une anaphylaxie, une cytopénie et une hépatotoxicité, sont également fréquemment observés. L'utilisation clinique du cisplatine ne se

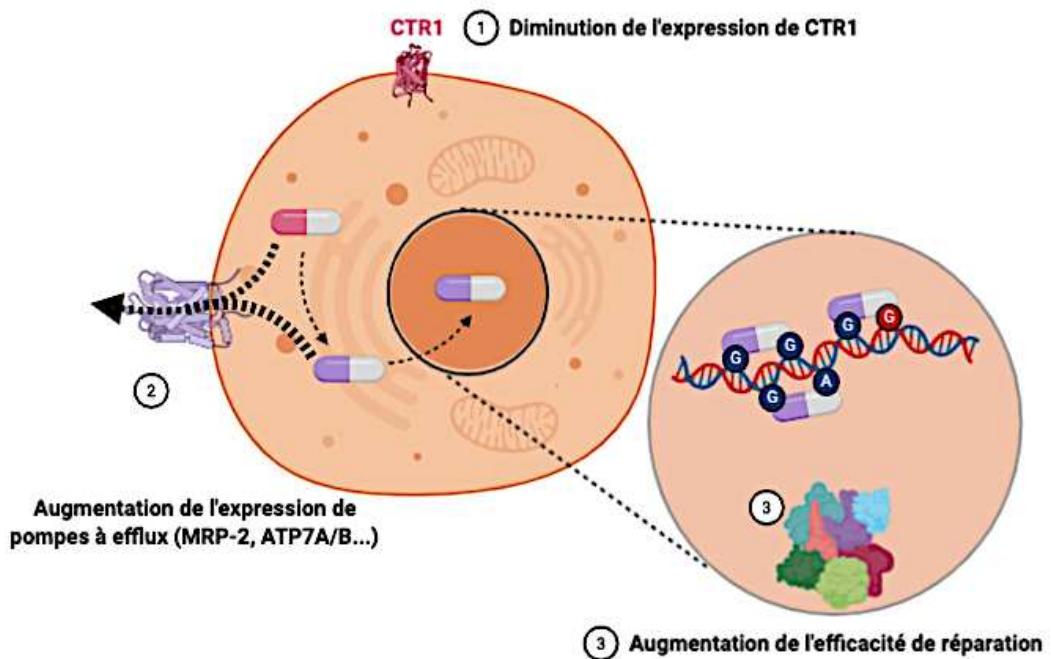


Figure 15. Représentation schématique des mécanismes moléculaires de résistance au cisplatine. Dans de nombreuses cellules tumorales, une diminution de l'expression du transporteur CTR1 est observée, conduisant à une entrée réduite de cisplatine dans la cellule. De plus, dans ces cellules, une surexpression de certaines pompes à efflux, comme MRP-2, ATP7A et ATP7B, induit une augmentation de l'efflux de cisplatine. Ces deux phénomènes conduisent à une diminution de la concentration intracellulaire en cisplatine. Un dernier mécanisme de résistance repose sur l'augmentation de la réparation des lésions, notamment via la surexpression de certains acteurs du système NER.

confronte pas uniquement aux effets secondaires observés, mais également aux cas de résistance dont les mécanismes ont été élucidés par la connaissance de son mode d'action.

II. 2. 2. 2. Mécanismes de résistance au cisplatine

Le niveau d'expression du transporteur CTR1 est essentiel pour la sensibilité au cisplatine (**Figure 15**). Dans ce sens, la lignée cancéreuse ovarienne A2780 rendue résistante au cisplatine présente une diminution du niveau d'expression de CTR1 par rapport à la même lignée non résistante (Kalayda *et al.*, 2012). De la même manière, une lignée cancéreuse pulmonaire à petites cellules sensible au cisplatine présente une surexpression naturelle de CTR1 par rapport à la même lignée cellulaire rendue résistante au cisplatine (SR2) (Song *et al.*, 2004). Une surexpression de CTR1 dans la lignée SR2 a permis d'observer une resensibilisation au cisplatine, *via* une augmentation de son entrée intracellulaire. Cette corrélation entre le niveau d'expression de CTR1 et la sensibilité au cisplatine a également été confirmée dans le modèle du cancer pulmonaire non à petites cellules. Ainsi, sur 54 patients atteints de ce type de cancer, 32 se caractérisaient par une surexpression de la protéine CTR1, associée à une meilleure réponse au cisplatine (Yang *et al.*, 2015). De manière surprenante, il a été montré que le cisplatine induit une dégradation rapide de CTR1, conduisant à une diminution de l'influx de la molécule et à l'émergence de résistances chimio-induites (Holzer *et al.*, 2006).

Un autre mécanisme de résistance des tumeurs aux agents de chimiothérapie repose sur la surexpression de molécules d'efflux (**Figure 15**). Dans le cas du cisplatine, une augmentation de l'expression des pompes à efflux MRP-2 (Multidrug-Resistance 2), ATP7A (ATPase copper Transporting α) et ATP7B (ATPase copper Transporting β) a été confirmée dans la lignée cancéreuse ovarienne A2780 résistante au cisplatine par rapport à la lignée sensible (Song *et al.*, 2004). Des délétions du gène codant ATP7A dans des fibroblastes murins embryonnaires rendus néoplasiques par surexpression de H-RAS ont conduit à une augmentation de la sensibilité de ces cellules au cisplatine par rapport aux cellules contrôles exprimant ATP7A (Song *et al.*, 2004).

Les tumeurs peuvent également devenir résistantes au cisplatine *via* une augmentation de la réparation des lésions induites (**Figure 15**). Une analyse transcriptomique de cellules tumorales testiculaires possédant une faible capacité à réparer les lésions induites par le cisplatine, et donc sensibles à l'agent anticancéreux, a permis de mettre en évidence une sous-expression de protéines de la réparation de l'ADN (XPA pour Xeroderma Pigmentosum A, ERCC1 pour Excision Repair Cross-Complementary Rodent Repair Deficiency 1 et XPF,

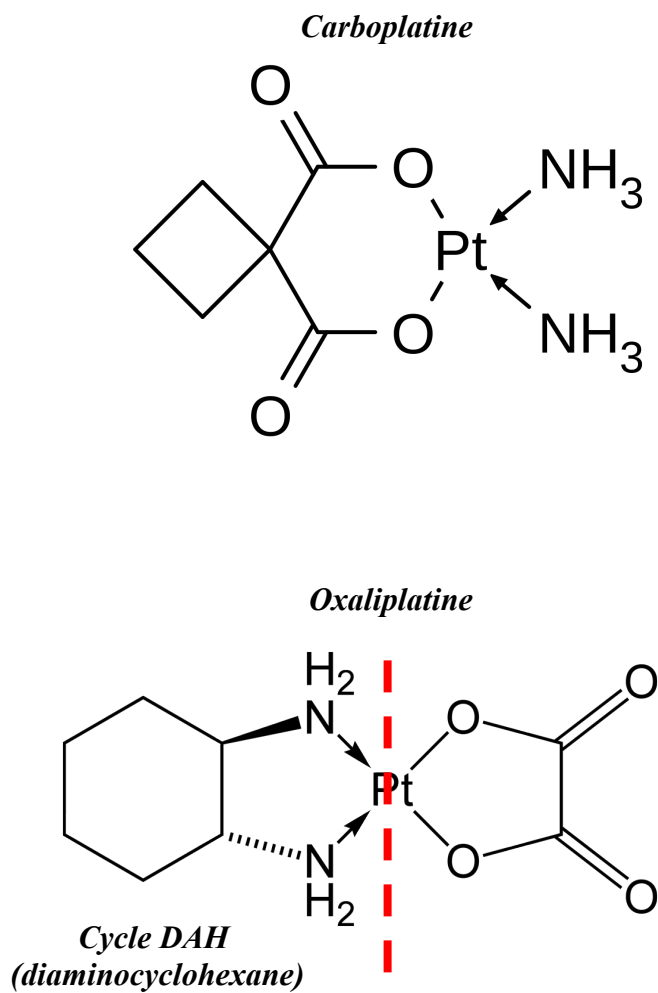


Figure 16. Structure chimique des composés à base de platine de 2^{ème} génération. La structure du carboplatine et de l'oxaliplatine, deux dérivés du cisplatine, est présentée. Le cycle DAH, ou diaminocyclohexane, de l'oxaliplatine est annoté.

encore appelée ERCC4) (Welsh *et al.*, 2004). Les tumeurs testiculaires répondant généralement très bien au cisplatine, cette étude a soulevé la possibilité que le niveau d'expression de XPF-ERCC1 pourrait être un indicateur de la réponse des tumeurs au cisplatine. Dans ce sens, une diminution de la réparation des adduits de cisplatine a été observée dans des cellules cancéreuses pulmonaires H1299 traitées au cisplatine et dont l'expression de XFP et ERCC1 a été inhibée par ARN interférence (Arora *et al.*, 2010). Cette diminution de la réparation des lésions était associée à une augmentation de la sensibilité des cellules au cisplatine. Le rôle prédictif de ERCC1 dans la réponse des tumeurs pulmonaires non à petites cellules a été validé par la mise en évidence d'une corrélation négative entre le niveau d'expression de ERCC1 et la sensibilité des tumeurs au cisplatine (Friboulet *et al.*, 2013).

Enfin, de plus en plus de données suggèrent que la variation du profil transcriptomique des tumeurs devenues résistantes au cisplatine peut s'expliquer par des modifications du niveau de méthylation de l'ADN. En effet, des études ont montré que les protéines de réparation du système NER retrouvées au niveau des lésions induites par le cisplatine peuvent recruter la méthyltransférase DNMT1 (DNA MethylTransferase 1), aboutissant à une méthylation aberrante (Ding *et al.*, 2016)(O'Hagan *et al.*, 2008). D'ailleurs, le suivi du profil de méthylation de l'ADN circulant semble permettre de prédire la réponse au cisplatine de tumeurs ovariennes (Montgomery *et al.*, 2006) (Lund *et al.*, 2017). Dans ce sens, une hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs *hMLH1* et *NES1* a été observée au sein de tumeurs ovariennes résistantes au cisplatine.

Des analogues du cisplatine ont été synthétisés afin de contrer les cas de résistance observés.

II. 2. 2. 3. 2^{ème} génération de complexes à base de platine

a. Le carboplatine

En 1985, Harrap *et al.* ont publié les résultats d'expériences menés sur 8 analogues du cisplatine présentant des effets anticancéreux face à des tumeurs transplantées sur des modèles murins (Harrap *et al.*, 1985). Parmi ces 8 molécules, le diamine(1,1-cyclobutane dicarboxylato)platinum(II) ou carboplatine, avait le meilleur effet antitumoral associé à de faibles effets secondaires. La structure du carboplatine diffère de celle du cisplatine par la présence d'un ligand bidentate cyclobutanedicarboxylate (**Figure 16**). Les interactions métal/ligand sont beaucoup plus stables que celles établies avec les chlorures dans le cisplatine,

ce qui diminue grandement la réactivité du carboplatine par rapport au cisplatine (Micetich *et al.*, 1985). Bien que les lésions induites par le carboplatine et le cisplatine soient du même type, leurs cinétiques diffèrent largement. En effet, la diminution de la réactivité du carboplatine se traduit par un retard de 6 à 12 heures dans la formation des lésions de l'ADN par rapport au cisplatine. De plus, une concentration de carboplatine de 20 à 40 fois supérieure à celle du cisplatine est nécessaire pour produire les mêmes effets biologiques (Knox *et al.*, 1986). Les lésions de l'ADN causées par le carboplatine peuvent conduire à une entrée en sénescence et/ou en apoptose. Ainsi, une étude a montré qu'une dose de 7,9 μM de carboplatine induit une très légère induction de l'apoptose de cellules cancéreuses pulmonaires non à petites cellules, et une entrée plus marquée en sénescence (Kubo *et al.*, 2015).

Des études cliniques comparant l'effet du carboplatine par rapport au cisplatine ont montré pour certains types de tumeurs, que le cisplatine était plus efficace que le carboplatine (tumeurs de la lignée germinale, cancer de la vessie, cancer du cou & de la tête), alors que pour d'autres tumeurs (cancer pulmonaire et ovarien), l'efficacité des deux molécules était comparable (Lokich and Anderson, 1998).

Le carboplatine a reçu son autorisation de mise sur le marché en France en 2003 avec comme indication les tumeurs ovariennes, bronchiques à petites cellules et des voies aérodigestives supérieures.

Le carboplatine est également utilisé en combinaison avec d'autres agents de chimiothérapie. Par exemple, la combinaison carboplatine et paclitaxel induit une réponse de 40% des carcinomes cervicaux avec une survie moyenne de 21 mois (Tinker *et al.*, 2005). 20 patients atteints de carcinomes pulmonaires à petites cellules sur 23 ont bien répondu à la combinaison carboplatine et etoposide, avec 7 rémissions complètes (Yilmaz *et al.*, 2011). Le carboplatine peut également être associé à la radiothérapie, notamment dans le cas de patientes atteintes de cancers cervicaux, permettant une amélioration notable du taux de survie par rapport aux traitements administrés séparément (Katanyoo *et al.*, 2011). L'effet radiosensibilisateur du cisplatine peut être aisément associé à sa capacité à générer des cassures doubles brins. Dans le cancer du sein, la combinaison carboplatine-Paclitaxel a prouvé son efficacité dans le cas de tumeurs mammaires métastatiques (Pentheroudakis *et al.*, 2006). Pour autant, la combinaison carboplatine-Paclitaxel est tout aussi efficace que la combinaison cisplatine-Paclitaxel dans le cas de tumeurs triples négatives (Huang *et al.*, 2017a)

Bien que l'utilisation du carboplatine soit associée à moins d'effets secondaires en comparaison au cisplatine, puisqu'il est moins néphrotoxique et provoque moins de

vomissement, sa limite majeure réside dans son absence d'effet sur des cellules résistantes au cisplatine. Les mécanismes de résistances croisés entre carboplatine et cisplatine sont dus à l'activation par le carboplatine des mêmes médiateurs intracellulaires que le cisplatine (CTR1, MRP2...) (Fonseca De Sousa *et al.*, 2014).

b. L'oxaliplatine

En 1980, Burschenal *et al.* ont montré que les complexes à base de platine contenant un cycle diaminocyclohexane (DACH) sont actifs sur des lignées cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine (Burchenal *et al.*, 1980). C'est le cas de l'oxaliplatine (dont la structure est présentée dans la **Figure 16**), utilisée en France depuis 1985. Son spectre d'action est plus large que celui du cisplatine, puisque l'efficacité de l'oxaliplatine a été prouvée dans le traitement du cancer du sein, de la tête & du cou et du cancer ovarien. Les meilleurs résultats à l'heure actuelle ont été obtenus dans le cancer colorectal (Desoize and Madoulet, 2002). Pour le traitement de ce type de tumeurs, l'oxaliplatine est utilisé soit en monothérapie soit en combinaison avec du 5-Fluorouracile, son effet secondaire le plus limitant étant sa neurotoxicité. Les autres effets secondaires peuvent être une anaphylaxie, une cytopénie (notamment une leucopénie, neutropénie, thrombocytopénie et une anémie), une hépatotoxicité, une ototoxicité et une cardiotoxicité (Oun *et al.*, 2018). Selon la sévérité des effets secondaires, la dose de traitement peut ainsi être réduite de 25%, et les patients sont monitorés de façon intensive afin de surveiller leur état général. Un essai clinique de phase II est en cours pour étudier l'efficacité de l'oxaliplatine dans le traitement de tumeurs mammaires métastatiques.

En terme de mécanismes, les formes actives du cisplatine et de l'oxaliplatine ne diffèrent que par la présence du cycle DACH (Scheeff *et al.*, 1999), l'oxaliplatine est capable de former des adduits intrabrins similaires à ceux formés par le cisplatine, qui vont conduire à une induction soit de l'apoptose soit de la sénescence. Notamment, la capacité de l'oxaliplatine à induire la sénescence a été vérifiée *in vitro* et *in vivo* sur des modèles de tumeurs colorectales (Seigneur *et al.*, 2014).

Bien que les complexes à base de platine aient prouvé leur efficacité clinique pour le traitement de divers cancers, leur utilisation est fortement limitée par les cas de résistance croisée. Les recherches se sont dès lors focalisées sur la synthèse de nouveaux complexes organométalliques, avec le remplacement du platine par d'autres métaux, dont le Fer.

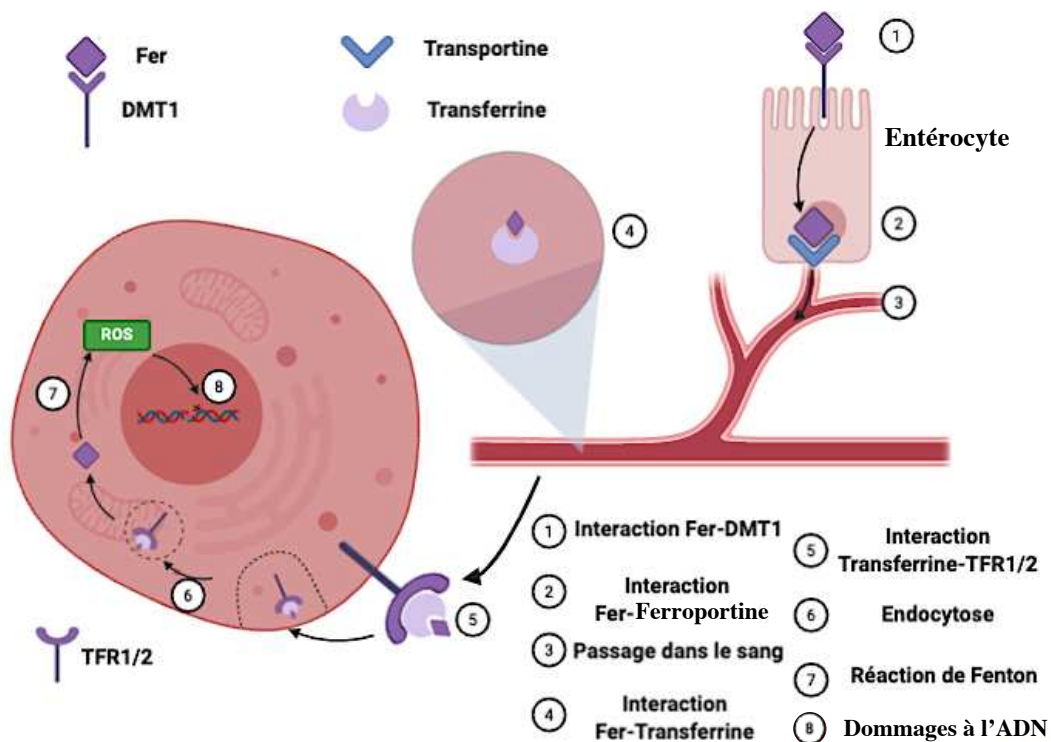


Figure 17. Représentation schématique du devenir du fer. Le fer présent dans les aliments est pris en charge par le récepteur DMT1 présent à la surface apicale des entérocytes. Le fer peut rejoindre la circulation sanguine par l'intervention du récepteur ferroportine. Dans le sang, le fer se fixe sur la transferrine. Le complexe fer-transferrine peut se fixer sur les récepteurs TFR1/2 surexprimé à la surface des cellules cancéreuses, cette fixation induisant une endocytose du complexe. Le fer intracellulaire peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) notamment au travers de la réaction de Fenton. Ces ROS peuvent causer des cassures doubles brins de l'ADN, à l'origine d'une entrée en apoptose des cellules.

II. 2. 3. Les complexes organométalliques à base de Fer

Les propriétés physico-chimiques et biologiques du Fer en font un candidat prometteur pour la synthèse de complexes organométalliques.

II. 2. 3. 1. Le Fer dans le cancer

Le Fer fait partie des oligoéléments, c'est-à-dire des nutriments retrouvés à faible dose dans le corps et nécessaires à la vie. L'alimentation représente la source principale de Fer pour l'organisme. L'absorption normale du Fer débute dans le duodénum, dans lequel le Fer pénètre sous deux formes : la forme inorganique (ou non hémique) provenant majoritairement de végétaux, et la forme organique (ou hémique) contenue dans la viande et le poisson. Cette absorption fait intervenir le transporteur DMT1 (Divalent Metal Transporter 1) exprimé majoritairement au niveau de la surface apicale des entérocytes (Miret *et al.*, 2003) (**Figure 17**). Le Fer peut être stocké dans ces cellules sous forme de Ferritine, ou être transporté dans la circulation sanguine *via* un transporteur appelé Ferroportine (Ganz and Nemeth, 2011). Une fois dans la circulation sanguine, le Fer se couple à la Transferrine permettant sa circulation sans causer de toxicité (Andrews, 2000) (**Figure 17**). La Transferrine est une glycoprotéine de 76kDa synthétisée par le foie et constituée d'une seule chaîne polypeptidique portant 3 sites de fixation du Fer, à raison de 2 sites de fixation par molécule de Transferrine. Lorsqu'une molécule de Transferrine chargée d'ions Fe(II) se fixe sur son récepteur membranaire, le complexe est internalisé par un mécanisme d'endocytose. Il existe 2 isoformes de récepteurs à la Transferrine : TFR1 exprimé de manière ubiquitaire à la surface de la plupart des cellules, et TFR2 exprimé de manière spécifique au niveau des hépatocytes. Une analyse du niveau d'expression de TFR1 a révélé une surexpression de cette protéine dans différents types de cancers, notamment dans le cancer colorectal (Prutki *et al.*, 2006), le cancer du sein (Tonik *et al.*, 1986), les lymphomes non-hodgkiniens (Habeshaw *et al.*, 1983), le cancer des poumons (Kondo *et al.*, 1990) et le cancer de la vessie (Seymour *et al.*, 1987). Cette surexpression peut s'expliquer notamment par le besoin important en Fer des cellules cancéreuses. En effet, le Fer est indispensable pour l'activité de nombreuses enzymes impliquées notamment dans la respiration mitochondriale (cytochrome c oxydase, cytochrome, Ferredoxine), dans le métabolisme de l'oxygène (peroxydase, catalase, cytochrome P450), le métabolisme énergétique (citrate synthase, aconitase, isocitrate déshydrogénase, succinate déshydrogénase),

dans la synthèse et la réparation de l'ADN (ribonucléotide réductase et hélicase) et dans les voies de signalisation (nitric oxydase synthase, hydroxylases et oxydoréductases). Cette versatilité des fonctions biologiques du Fer repose essentiellement sur sa capacité à changer, réversiblement, son état d'oxydation. Une réaction redox repose sur le transfert d'électrons entre un donneur (réducteur) et un accepteur (oxydant). En tant qu'élément de transition, le Fer possède des électrons occupant la couche orbitale *d* lui permettant de passer de l'état -2 jusqu'à l'état +6, même si la grande majorité des complexes de Fer, et typiquement les molécules biologiques, contiennent essentiellement des ions Ferreux (+2), Ferriques (+3) et l'ion Fe^{4+} . Cette même caractéristique confère au Fer sa capacité à produire des ROS, notamment au travers de la réaction de Fenton au cours de laquelle l'ion Ferreux (Fe^{2+}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagissent pour former des radicaux hydroxyles et de l'ion Ferrique (Fe^{3+}) (**Figure 17**). Les ROS produits par le Fer sont responsables de dommages aux macromolécules (ADN, ARN, protéines, lipides), pouvant conduire à une entrée en apoptose des cellules.

Le besoin important en Fer des tumeurs et sa capacité à générer spontanément des ROS ont conduit les chercheurs à synthétiser des complexes organométalliques contenant du Fer dans le but de cibler spécifiquement la tumeur.

II. 2. 3. 2. Le Ferrocène

Le Ferrocène (Fc) est un complexe organométallique de formule $Fe(C_5H_5)_2$ faisant partie de la famille des métallocènes regroupant les composés sandwich où le centre métallique est entouré de deux cycles cyclopentadiényles. Une étude de 1969 menée sur des chiens a révélé une très faible toxicité du Ferrocène. En effet, après des administrations orales quotidiennes de 300 mg/kg ou de 1000 mg/kg pendant 6 et 3 mois respectivement, seule une hémossidérose (une accumulation anormale de Fer) a été observée (Yeary, 1969). Pour autant, cette accumulation de Fer n'induisait aucun effet secondaire même 26 mois après la fin du traitement. Le Ferrocène en tant que tel n'est pas stable, puisqu'il est converti en ion Ferrocénium. Dans les conditions biologiques, cette oxydation se fait par exemple par l'intermédiaire du peroxyde d'hydrogène (Fomin and Zaitseva, 2014).

II. 2. 3. 3. Les ions Ferrocénium

A l'inverse du Ferrocène qui est relativement inerte, les ions Ferrocénium possèdent de fortes capacités oxydantes, les rendant généralement biologiquement plus actifs que leur forme réduite. Ainsi, Köpf-Maier *et al.* ont montré que le Ferrocène ne présentait pas d'activité anticancéreuse contre un modèle de tumeur murin (EAT pour Ehrlich Ascites Tumor), alors que l'ion Ferrocénium-chloroferrate (dans lequel l'ion Ferrocénium est lié au chloroferrate) permettait la survie de 83% des animaux traités (Köpf-Maier *et al.*, 1984). En conséquence, la survie globale augmentait de 78 jours par rapport aux souris non traitées. Un autre sel de Ferrocénium de formule FeCp_2BF_4 a été montré comme possédant une activité cytotoxique contre des cellules tumorales mammaires (MCF-7) plus importante que le Ferrocène (Morantes *et al.*, 2012). Une des explications possibles pour cette différence d'activité pourrait concerner les différences de solubilité existantes entre le Ferrocène, qui est très peu soluble dans l'eau, et les sels de Ferrocénium qui sont solubles. Pour tenter de prouver le lien activité-solubilité, Osella *et al.* ont synthétisé un Ferrocène rendu soluble par le greffage d'un groupement β -cyclodextrine (Osella *et al.*, 2000). Aucune inhibition de la prolifération de cellules tumorales n'a été observée en présence de la forme soluble de Ferrocène par rapport à sa forme insoluble, alors que les sels de Ferrocénium présentaient bien une activité anticancéreuse. Ces données suggèrent donc que l'activité anticancéreuse des sels de Ferrocénium ne dépend pas de leur plus grande solubilité par rapport au Ferrocène.

Concernant le mode d'action, il a été montré que les sels de Ferrocénium induisent un clivage de la molécule d'ADN, et ce *via* leur capacité à générer des ions hydroxyles (Tamura and Miwa, 1997). L'activité anticancéreuse des sels de Ferrocénium ne se base pas uniquement sur leur action sur l'ADN. En effet, deux complexes (P5 et DP1) sont capables d'inhiber la prolifération de cellules de gliomes et de mélanomes *via* une induction de la sénescence cellulaire (Bruyère *et al.*, 2014). De la même manière, trois complexes (5b, 5d et 5e) exercent leur activité anticancéreuse dans la lignée tumorale pulmonaire A549 en induisant un arrêt du cycle en phase G1 et une entrée en sénescence au travers de la voie ROS/p38 MAPK (Li *et al.*, 2013b). D'autres complexes (DP1 et P5) sont capables d'induire une entrée en sénescence de cellules de gliomes (Hs683), de glioblastomes (U373) et de mélanomes murins (B16-F10) (Bruyère *et al.*, 2014). De manière intéressante, cette induction de la sénescence ne faisait pas intervenir les mêmes mécanismes moléculaires selon les lignées. En effet, dans les cellules Hs683, l'entrée en sénescence se caractérisait par une augmentation de l'expression de p21, sans que le taux protéique de son régulateur transcriptionnel (p53) ne soit affecté par les

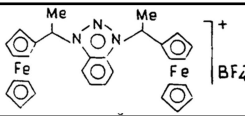
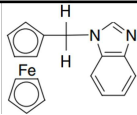
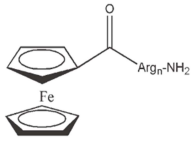
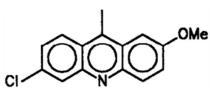
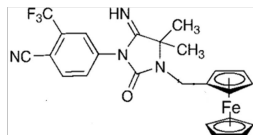
Conjugaison du ferrocène avec	Nom et structure du composé	Modèle(s) cellulaire(s)/animal(aux) sur le(s)quel(s) une activité anticancéreuse a été montrée
Azole	Bis(ferrocénylalkyl)azolium (d'après Popova et al., 1993) 	Sarcomes murins induits par le méthylcholantène
	Ferrocénylméthyl benzimidazole (d'après Snegur et al., 2004) 	Modèles tumoraux Ca755 (adénocarcinome mammaire), B16 (mélanome) et carcinome pulmonaire de Lewis
Peptide	Conjugué à base d'acide ferrocénecarboxylique et d'un oligopeptide riche en arginine (d'après Miklan et al., 2007) 	Lignées cellulaires leucémiques
Intercalant de l'ADN	1 <i>N</i> -ferrocénylméthylthymine (d'après Simenel et al., 2009) 	Modèle tumoral murin mammaire (Ca755), de mélanome (B16) et de carcinome pulmonaire de Lewis
Tamoxifène	Hydroxyferrocifène (d'après Top et al., 1996) 	Lignées cancéreuses mammaires exprimant le récepteur aux œstrogènes (MCF-7)

Tableau 1. Tableau récapitulatif de certains conjugués de ferrocène. Les composés sont classés selon la nature du ligand lié au ferrocène. La structure chimique et le nom de chaque composé est présenté, et le détail des modèles cellulaires et/ou animaux utilisés pour prouver l'efficacité anticancéreuse des molécules est également présenté.

complexes. Au contraire, dans la lignée B16-F10, l'augmentation de la quantité de p21 s'accompagnait d'une augmentation du taux protéique de p53. Enfin, dans la lignée U373, bien que le taux protéique de p53 soit augmenté en présence des deux complexes, aucun effet n'a été observé sur le taux de p21. Ces résultats suggèrent que l'effet des complexes à base de Ferrocénium dépend entièrement du type cellulaire.

Au vu de l'efficacité antitumorale du groupement Ferrocényl, les recherches se focalisent actuellement sur l'incorporation de ce groupement dans des molécules préexistantes, dans le but de potentialiser leur effets anti-cancéreux.

II. 2. 3. 4. Les conjugués à base de Ferrocène

a. Les conjugués Ferrocène-azoles

Les azoles sont une classe de composés hétérocycliques insaturés à cinq atomes possédant au moins deux atomes d'azote (comme l'imidazole et le pyrazole), ou bicycliques possédant 5 atomes d'azote comme l'adénine (Ahmad *et al.*, 2018).

En 1993, Popova *et al.* ont montré qu'un complexe Ferrocénylazole (Bis(Ferrocénylalkyl)azolium) présentait une activité anticancéreuse contre des sarcomes murins induits par le méthylcholantène (MCH-11) (Popova *et al.*, 1993) (**Tableau 1**). Une autre équipe a montré que le complexe Ferrocénylméthyl benzimidazole présentait une action anticancéreuse sur les modèles tumoraux Ca755 (adénocarcinome mammaire), B16 (mélanome) et sur le carcinome pulmonaire de Lewis (Snegur *et al.*, 2004). L'inhibition de la croissance tumorale se faisait à des doses comprises entre 5 et 50 mg/kg. D'autres complexes Ferrocénylazoles induisent une diminution du volume de tumeurs pulmonaires non à petites cellules et de tumeurs œsophagiennes greffées sur des souris irradiées au préalable (Snegur *et al.*, 2008) (**Tableau 1**). De manière intéressante, ces complexes n'induisaient pas de toxicité sur les souris. L'un des complexes (nommé 1-(Ferrocénylméthyl)benzimidazole) présentait les meilleurs résultats, avec une inhibition de la prolifération tumorale de 100%, avec une régression de 45% du volume tumoral. Le succès de ce complexe était attribué : 1) au groupement hydrophile benzotriazolyl rendant la molécule soluble dans un milieu aqueux et au groupement lipophile Ferrocényl permettant une perméabilité membranaire ; 2) l'hétérocycle planaire et le groupement Ferrocényl pouvant s'insérer entre les bases de l'ADN.

3 composés contenant de l'azole ont montré une action anticancéreuse significative sur la lignée tumorale mammaire MCF-7 (Bansode *et al.*, 2019). Un de ces composés induisait une

inhibition de la prolifération cellulaire légèrement supérieure à la Doxorubicine, le traitement de référence pour le cancer du sein (IC50 de 0.016 μ M et 0.018 μ M pour le composé à base d'azole et la Doxorubicine respectivement).

b. Les conjugués Ferrocène-acide rétinoïque

L'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A, possède des caractéristiques intéressantes pour le ciblage des cellules souches cancéreuses. En effet, il a été montré que ce composé peut induire la différenciation des cellules souches cancéreuses, réduire leur prolifération et leur invasion, et les sensibiliser à la chimiothérapie (Ginestier *et al.*, 2009)(Lim *et al.*, 2012). Son utilisation en clinique est limitée par son insolubilité en solution aqueuse et par son incapacité à provoquer directement une apoptose. Des études ont ainsi montré que le greffage d'un ion Ferrocénium sur l'acide rétinoïque permet de rendre la molécule soluble dans l'eau (Wang *et al.*, 2018). Les auteurs ont mis en évidence une cytotoxicité contre des cellules souches cancéreuses traitées à l'aide du complexe Ferrocène-acide rétinoïque, alors que l'acide seul n'avait aucun effet pro-apoptotique. Cet effet repose sur la capacité du complexe à induire une diminution de la concentration intracellulaire de l'enzyme détoxifiante GSH, induisant donc une augmentation de la quantité de ROS à l'origine de la mort cellulaire. Le complexe était également capable d'inhiber la prolifération des cellules souches cancéreuses et d'induire leur différenciation, tout comme l'acide rétinoïque seul. Ces données suggèrent que le complexe Ferrocénium-acide rétinoïque présente des caractéristiques plus intéressantes que l'acide rétinoïque seul.

c. Les conjugués Ferrocène-peptides

Dans le but d'augmenter les effets anticancéreux des complexes à base de Ferrocène, une des stratégies consiste à favoriser leur entrée dans la cellule. Dans ce but, le couplage de complexes avec des peptides a été testé.

Dans ce sens, la conjugaison d'acide Ferrocèncarboxylique avec un oligopeptide riche en arginine a permis une amélioration de la solubilité du complexe dans l'eau, mais également de son activité anticancéreuse sur des cellules leucémiques (Miklán *et al.*, 2007) (**Tableau 1**). De plus, des conjugués Ferrocène-biotine ont été testés en terme d'activité antitumorale sur différentes lignées cellulaires présentant des niveaux d'expression variables du récepteur à la biotine (SMVT pour Sodium Dependent Multivitamin Transporter) (Plazuk *et al.*, 2013). Les résultats ont montré une corrélation positive entre le niveau d'expression de SMVT et l'effet

anticancéreux du conjugué. Par ailleurs, la conjugaison de Ferrocène avec des peptides contenant la séquence RGD (Arginine-Glycine-Acide aspartate) semble théoriquement être une bonne approche, puisque les séquences RGD sont reconnues par les intégrines qui sont surexprimées au cours de l'angiogenèse. Cette hypothèse a été vérifiée par des analyses de chromatographie en phase liquide démontrant une augmentation de l'entrée du complexe Ferrocène-RGD dans des cellules de mélanomes de souris B16, associée à une meilleure cytotoxicité par rapport au Ferrocène seul (Zhou *et al.*, 2012). Un autre exemple de complexe Ferrocène-protéine correspond au composé HUNI 68, qui présente une activité cytotoxique sur un panel de lignées cancéreuses toutes résistantes à une multitude d'agents de chimiothérapie (Kater *et al.*, 2011). Cet effet cytotoxique s'accompagne d'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale et d'une activation de la caspase 9, suggérant l'intervention de la voie intrinsèque de l'apoptose.

d. Les conjugués Ferrocène-analogues nucléotidiques

Les analogues nucléotidiques présentent de base une cytotoxicité, puisqu'ils ont été les premiers agents de chimiothérapie employés. Les chercheurs ont souhaité combiner l'effet cytotoxique des analogues de nucléobases avec celui des complexes de Ferrocène.

Un conjugué Ferrocène-thymine (1*N*-Ferrocénylméthyl thymine) a été montré comme possédant une activité anticancéreuse sur les modèles de tumeurs solides Ca755 (carcinome mammaire), B16 (mélanome) et LLC (Lewis Lung Carcinoma) (Simenel *et al.*, 2009) (**Tableau 1**). Ce composé induit une inhibition de la croissance des tumeurs Ca755 de 70% par rapport au contrôle (souris non greffées).

D'autres complexes Ferrocène-nucléobases ont montré une cytotoxicité sur les lignées cancéreuses L1210 (modèle de leucémie murine), CEM (modèle de lymphoblaste T humain) et HeLa, presque aussi efficace que le 5-Fluorouracile (Nguyen *et al.*, 2014).

Un complexe à base de Ferrocène lié à une molécule de thymine présente un effet cytotoxique contre une lignée d'ostéosarcome humain, bien que cet effet soit inférieur à celui observé en présence de cisplatine (Kedge *et al.*, 2017).

e. Les conjugués Ferrocène-Tamoxifène

Comme cité précédemment, le Tamoxifène est un anti-œstrogénique non stéroïdien utilisé systématiquement dans le traitement des cancers du sein œstrogéno-dépendants. Il fait partie de la famille des SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator), c'est-à-dire des

analogues des œstrogènes endogènes, dont l'action entraîne un blocage des voies de signalisation par interaction avec les récepteurs hormonaux. Comme son action est de ralentir la progression de la maladie plutôt que de l'éradiquer, le Tamoxifène est utilisé en traitement à long terme. Cette utilisation sur une longue période peut néanmoins engendrer l'émergence de tumeurs mammaires résistantes au Tamoxifène. Dès lors, la recherche de nouvelles molécules anti-œstrogéniques est d'un intérêt majeur.

L'idée de combiner les effets anti-œstrogéniques du Tamoxifène aux propriétés cytotoxiques du Ferrocène a été appliquée en 1996 par une équipe française. Le nouveau composé, appelé « Hydroxyferrocifène », se caractérise par le remplacement du groupement phényl du 4-hydroxytamoxifène (le métabolite actif du Tamoxifène) par le Ferrocène (Top *et al.*, 1996) (**Tableau 1**). Des mesures de l'affinité relative de liaison ont montré que l'Hydroxyferrocifène présente une bonne affinité d'interaction avec le récepteur aux œstrogènes, bien qu'inférieure à celle du Tamoxifène (valeur d'affinité relative de liaison de 11,5% et de 38,5% respectivement pour l'Hydroxyferrocifène et le Tamoxifène) (Jaouen *et al.*, 2000). Cette différence peut s'expliquer par l'effet stérique du groupement Ferrocényl qui est légèrement plus encombrant que le groupement phényl du Tamoxifène.

L'effet cellulaire du composé Hydroxyferrocifène a été testé sur une lignée de cellules cancéreuses mammaires présentant une forte expression des récepteurs aux œstrogènes (les cellules MCF-7), dans lesquelles le composé induit une inhibition de la prolifération/viabilité du même ordre que le Tamoxifène (Top *et al.*, 2003). Cet effet de l'Hydroxyferrocifène sur la prolifération/viabilité des cellules MCF-7 a été associé à un effet pro-apoptotique *via* la capacité du complexe à induire une surproduction de ROS alors que le Tamoxifène et le Ferrocène n'induisait pas et peu de ROS respectivement (Wlassoff *et al.*, 2007).

Une autre étude a confirmé la présence d'une production significative de ROS dans les lignées cancéreuses mammaires MCF-7 traitées à l'Hydroxyferrocifène, tout comme dans des lignées cancéreuses mammaires ER α - (MDA-MB231, Hs578T et SKBr3) (Vessières *et al.*, 2010). Cette production de ROS induisait un blocage du cycle cellulaire et une entrée en sénescence, plutôt qu'une entrée en apoptose. Une entrée en sénescence a également été observée dans des cellules de gliomes et de mélanomes traitées avec deux dérivés d'Hydroxyferrocifène (P5 et DP1) (Bruyère *et al.*, 2014). Cette induction de la sénescence se traduisait par une augmentation du marquage SA- β -galactosidase et l'acquisition d'un SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) avec sécrétion d'IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α .

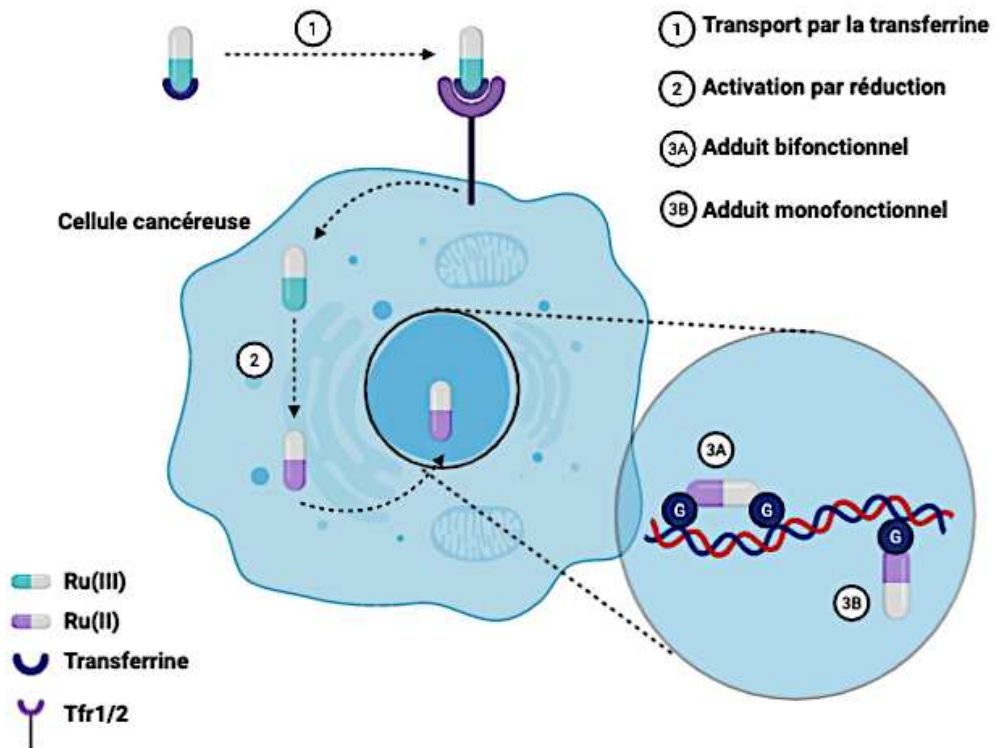


Figure 18. Représentation schématique du devenir du Ruthénium. Le Ruthénium est capable d'interagir avec la transferrine sanguine. La surexpression des récepteurs à la transferrine (Tfr1/2) à la surface des cellules cancéreuses permet une accumulation spécifique du Ruthénium au niveau des cellules tumorales. Une fois à l'intérieur de la cellule, le Ruthénium subit une réduction de sa forme Ru(III) vers sa forme Ru(II). Les composés à base de Ruthénium peuvent interagir avec la double hélice de l'ADN soit en formant des adduits bifonctionnels, comme le cisplatine, induisant une distorsion de l'ADN, soit par des adduits monofonctionnels. Ces deux types d'adduits vont être à l'origine d'une inhibition de la prolifération et/ou l'induction de l'apoptose. D'après (Pongratz et al., 2004)(Schluga et al., 2006)(Sava et al., 1999).

En plus du Fer, les composés à base de Ruthénium présentent des activités anticancéreuses prometteuses.

II. 2. 4. Les complexes à base de Ruthénium

II. 2. 4. 1. Généralités

Le Ruthénium existe sous trois états d'oxydation, qui sont les plus communs également pour le Fer : Ru(II), Ru(III) et Ru(IV). La forme Ru(IV) correspond à une forme très instable de par son haut degré d'oxydation, ce qui limite fortement son utilisation (Duan *et al.*, 2009). Concernant les deux autres formes, les complexes contenant du Ru(II) sont généralement plus réactifs que les composés contenant du Ru(III), qui correspondent fréquemment à des pro-drugs nécessitant une activation par réduction. Le Ruthénium présente de nombreuses caractéristiques le qualifiant de bon candidat comme composant de molécules anticancéreuses. En effet, les molécules à base de Ruthénium 1) sont transportées vers les cellules cancéreuses de manière sélective au travers de leur interaction avec la Transferrine ; 2) sont activées par un mécanisme de réduction sélectivement au niveau de la tumeur (dans le cas de complexes contenant du Ru(III)) ; et 3) sont capables de se fixer à l'ADN par des modes d'action différents de ceux observés en présence de molécules à base de platine.

a. Transport par la Transferrine

Une comparaison de la localisation *in vivo* du Ruthénium entre des tissus sains et des tissus tumoraux a révélé que cet élément est préférentiellement retrouvé au niveau des tumeurs, comme ce qui est décrit pour le Fer (Sava and Bergamo, 2000). Comme décrit précédemment, la forte concentration en Fer dans les tumeurs est due à une surexpression des récepteurs à la Transferrine. Il a ainsi été émis l'hypothèse que le Ruthénium était également capable d'interagir avec cette protéine plasmatique, expliquant sa location sélective dans les tumeurs (**Figure 18**). Dans ce sens, Kratz *et al.* ont montré qu'un complexe Ru(III) lié à la Transferrine présente une activité antiproliférative sur la lignée de cancer colorectal SW707 plus importante que le complexe Ru(III) seul (Kratz *et al.*, 1996).

b. Activation par réduction

Schluga *et al.* ont montré que la réduction du Ru(III) en Ru(II) se faisait préférentiellement dans un environnement hypoxique et acide (Schluga *et al.*, 2006), caractéristique des tumeurs (**Figure 18**). Par conséquent, les complexes contenant du Ru(III), relativement inactifs, peuvent être employés comme pro-drug, qui seront activés par réduction spécifiquement au niveau de la tumeur.

c. Interaction avec l'ADN

Les complexes à base de Ruthénium présentent un intérêt avantageux comparé au cisplatine, *via* leur capacité à former des interactions de natures différentes, et notamment des interactions non covalentes, avec l'ADN. Ces différences d'interaction peuvent expliquer les effets secondaires amoindris des complexes à base de Ruthénium par rapport à ceux à base de platine.

Par exemple, deux complexes à base de Ruthénium contenant un groupement diméthyl sulfoxyde (cis- et trans-[Ru(II)((CH₃)₂SO)₄C₁₂]) présentent une activité antiproliférative *in vivo* comparable à celle du cisplatine à des doses équimolaires, mais avec moins d'effets secondaires et associée à une meilleure survie des animaux (Sava *et al.*, 1999). Dans cette étude, l'analyse du spectre de dichroïsme circulaire de l'ADN a montré que l'interaction du composé *cis* n'induit aucune modification de la conformation de l'ADN. Le composé *trans* induit, quant à lui, une distorsion de la double hélice. Cette différence repose sur le mode d'interaction des deux composés. En effet, alors que le composé *cis* crée uniquement des adduits monofonctionnels, le composé *trans* forme majoritairement des liaisons entre différents résidus purines voisins. En conclusion, le composé *trans* présente le même mode d'interaction avec l'ADN que le cisplatine formant des liaisons interbrins plus toxiques, alors que le composé *cis* produit uniquement des adduits monocovalents (**Figure 18**). Ces différences d'interaction soulignent particulièrement bien le lien entre le mode d'interaction avec l'ADN et l'effet anticancéreux des composés.

Parmi tous les composés à base de ruthénium, NAMI-A et KP1019 correspondent aux molécules les mieux décrites et les plus prometteuses.

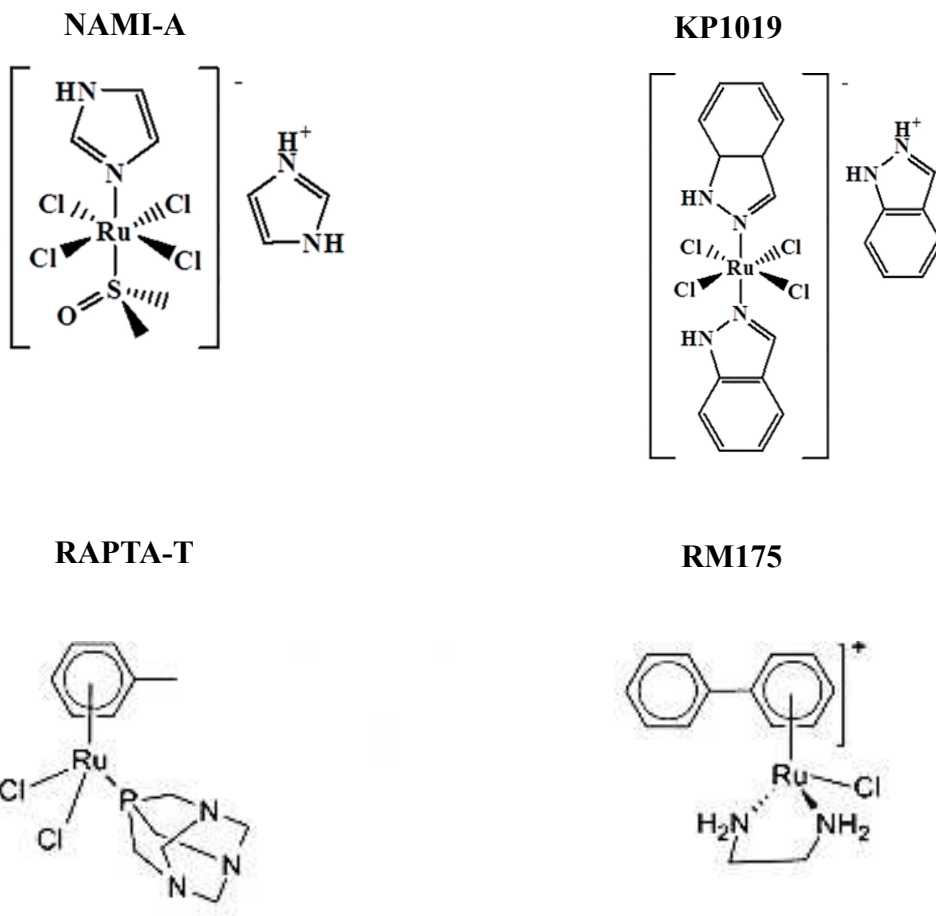


Figure 19. Structure chimique de certains composés à base de Ruthénium. La structure de NAMI-A, KP1019, RAPTA-T et RM175 est présentée. D'après (Vacca et al., 2002)(Alessio and Messori, 2018)(Kapitza et al., 2005a et b).

II. 2. 4. 2. NAMI-A

NAMI-A (imidazolium *trans*-imidazoledimethylsulfoxidetetrachlorourthenate) (**Figure 19**) est un composé contenant du ruthénium sous forme Ru(III) sur lequel est greffé une molécule de DMSO (dimethylsulfoxyde) et une molécule d'imidazole. NAMI-A est un dérivé de NAMI qui, malgré son activité anticancéreuse prometteuse, n'était pas assez stable dans l'eau (Sava *et al.*, 1999).

La molécule NAMI-A est principalement décrite pour son activité antimétastatique. La comparaison de l'action cytotoxique *in vitro* et l'effet antimétastatique *in vivo* a révélé que NAMI-A réduit la formation de métastases par un mécanisme indépendant d'une cytotoxicité directe sur la tumeur (Sava *et al.*, 1995). D'un point de vue moléculaire, des expériences réalisées sur la membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet suggèrent que NAMI-A est capable d'inhiber la prolifération de cellules endothéliales, la chimiotaxie et la sécrétion de la métalloprotéase matricielle 2 (MMP2), conférant en partie à cette molécule son effet antimétastatique (Vacca *et al.*, 2002). Ces effets étaient associés à une absence de phénotypes cellulaires de type apoptotique ou nécrotique, confirmant l'effet antimétastatique plutôt que cytotoxique. Dans le modèle de cancer colorectal, NAMI-A semble inhiber l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire, ainsi que leur migration (Pelillo *et al.*, 2016). Au niveau moléculaire, NAMI-A induit une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules cancéreuses colorectales HCT-116, conduisant à une diminution de l'activation des voies de signalisation sous-jacentes.

Bergamo *et al.* ont comparé les effets de NAMI-A par rapport au cisplatine sur des cellules tumorales cultivées *in vitro*, ainsi que sur des métastases *in vivo*. Les résultats montrent que NAMI-A est tout aussi efficace que le cisplatine sur les carcinomes de type MCa (Mouse Mammary Carcinoma) et sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome métastatique de souris TS/A, mais plus efficace que le cisplatine sur le carcinome pulmonaire de Lewis (Bergamo *et al.*, 1999). Pour autant, le cisplatine est nettement plus efficace que NAMI-A sur les carcinomes du foie et des tubules rénaux. D'un point de vue cellulaire, le traitement par NAMI-A induisait un arrêt de la prolifération des cellules tumorales au niveau du point de restriction G2/M, alors que le cisplatine induisait un arrêt progressif dans toutes les phases de manière dose-dépendante. Cette différence en terme d'effet cytotoxique entre NAMI-A et le cisplatine a été vérifiée dans 4 lignées cancéreuses humaines (Igrov-1, 2008, MCF-7 et T47D), l'analyse ayant montré que NAMI-A est 1 000 fois moins cytotoxique sur le cisplatine (Pluim *et al.*, 2004).

L'activité anticancéreuse de NAMI-A a été vérifiée dans des essais cliniques. Dans un premier temps, la dose maximale tolérée a été déterminée dans un essai de phase I au Pays-Bas. Dans cette étude, 24 adultes présentant différents types de tumeurs solides ont été traitées à des doses allant de 2,4 à 500 mg/m²/jour. NAMI-A a été injectée en intraveineuse pendant 5 jours consécutifs et ce pendant 3 semaines. A 400 mg/m²/jour, des cloques douloureuses sont apparues sur les doigts des patients, c'est pourquoi la dose utilisée pour la suite des études a été fixée à 300 mg/m²/jour (Alessio and Messori, 2018). Au regard de son excellente action antimétastatique *in vivo* sur le modèle du cancer pulmonaire métastatique, le cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC) a été choisi pour une étude de phase II (Rademaker-Lakhai *et al.*, 2004). Le traitement classique des NSCLC repose déjà sur l'utilisation d'une molécule organométallique (le cisplatine) en association avec la Gemcitabine. Ainsi, la combinaison NAMI-A et Gemcitabine a été testée. L'étude a initialement compris 32 patients atteints de NSCLC sur un cycle de 28 jours, qui a été réduit à 21 jours pour cause de neutropénie au cours de la 3^{ème} semaine de traitement. La Gemcitabine était administrée tous les jours après les injections de NAMI-A. La combinaison NAMI-A et Gemcitabine a été décrite comme modérément tolérable par les patients qui souffraient majoritairement de nausées sévères, de vomissements et de diarrhées. Le traitement a donc été déclaré comme « insuffisamment efficace pour une utilisation future ».

II. 2. 4. 3. KP1019

Cette molécule est un complexe stable de ruthénium sous forme Ru(III) contenant deux hétérocycles d'indazole mono-complexés à l'ion central de Ruthénium avec quatre ions chlorures ancillaires (**Figure 19**). Historiquement, l'activité anticancéreuse de ce composé a pour la première fois été montrée sur des carcinomes colorectaux de rats insensibles au cisplatine (Seelig *et al.*, 1992). KP1019 présentait une forte action à toutes les doses (7,5 mg/kg, 5,3 mg/kg et 3,8 mg/kg), se caractérisant par une diminution du volume tumoral de 30%, 19% et 9% pour chaque dose respective. Néanmoins, l'efficacité de la plus forte dose (7,5 mg/kg) était associée à une forte mortalité due à une toxicité importante.

De nombreux mécanismes moléculaires semblent être responsables de l'effet anticancéreux de KP1019. Kaptiza *et al.* ont montré que la molécule est responsable d'une production accrue de H₂O₂ dans des cellules tumorales colorectales, et ce de manière dose

dépendante (Kapitza *et al.*, 2005). Cet effet était bloqué par l'utilisation de l'agent antioxydant NAC (N-AcétylCystéine), qui induit également une réduction de l'IC50 (55 μ M et 30 μ M en présence et en absence de NAC respectivement). Cette même étude a permis d'établir un lien entre la production de ROS et une entrée en apoptose, caractérisée par une perte du potentiel de membrane mitochondriale et un clivage caspase-dépendant de PARP.

En 2008, une étude de phase I a été réalisée dans le but d'établir la dose maximale tolérée de KP1019 (Hartinger *et al.*, 2008). 8 patients présentant différents types de tumeurs solides ont été sélectionnés, et ont été traités à des doses croissantes de KP1019 allant de 25 à 600 mg deux fois par semaine pendant 3 semaines. Sur les 6 patients (2 ayant abandonné l'essai), 5 ont montré une stabilisation de la maladie pendant 8 à 10 semaines post-traitement. De manière intéressante, la durée de stabilisation de la maladie après traitement n'était pas corrélée à la dose utilisée. Enfin, uniquement une toxicité moyenne a été observée. La dose de 400 mg a été sélectionnée pour une étude de phase II, dont les résultats ne sont pas encore disponibles.

II. 2. 4. 4. Autres complexes

En plus de NAMI-A et KP1019, un nombre conséquent de complexes à base de Ruthénium sont en cours d'étude. Par exemple, le composé RM175 (**Figure 19**) a été testé sur la lignée cancéreuse colorectale HCT116 (Hayward *et al.*, 2005). Les résultats ont montré une accumulation des protéines p53, Bax et p21 dès 48h de traitement, associée à un arrêt de la prolifération en phase G1 et G2, ainsi qu'à une induction de l'apoptose. De manière intéressante, cet arrêt du cycle cellulaire n'est pas observable dans des cellules HT116 rendues déficientes pour *p53* et *p21*, suggérant un rôle prépondérant de ces protéines.

RAPTA-T est un autre exemple de composé prometteur (**Figure 19**). Des expériences *in vitro* ont démontré son action cytotoxique sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome murin TS/A, alors qu'aucune cytotoxicité n'a été observée sur une lignée de cellules mammaires saines (HBL-100), même à des fortes doses (Scolaro *et al.*, 2005). Par ailleurs, RAPTA-T semble inhiber certaines étapes du processus métastatique comme la migration, l'invasion et la ré-adhésion de la tumeur murine à son nouveau substrat (Bergamo *et al.*, 2010).

II. 2. 5. Conclusion sur les complexes organométalliques

L'efficacité de cisplatine contre de nombreux cancers, dont celui du sein, a ouvert la voie à l'étude d'une nouvelle famille de molécules : les complexes organométalliques. Les complexes à base de platine, dont fait partie le cisplatine, ont été les plus étudiés. En plus du cisplatine, deux autres complexes contenant du platine (le carboplatine et l'oxaliplatine), sont prescrits en monothérapie ou en thérapie combinatoire dans un grand nombre de cancers. Pour autant, leur utilisation clinique est confrontée aux cas de résistance et/ou aux effets secondaires parfois lourds. Dès lors, les recherches se sont tournées vers des complexes organométalliques contenant d'autres métaux. Les complexes à base de Fer et de Ruthénium notamment, ont montré une activité anticancéreuse prometteuse dans des tests *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux. Pour autant, une recherche rapide sur la base de données des essais cliniques en cours dans le monde (ClinicalTrials, accessible à l'adresse <https://clinicaltrials.gov/>) révèle un très faible nombre d'essais cliniques de phase III évaluant l'efficacité anticancéreuse des complexes organométalliques. Ces résultats peuvent notamment s'expliquer par la toxicité et/ou le manque d'efficacité des complexes révélés pendant des essais de phases I et II. Parmi les complexes en test sur de larges panels d'échantillons de patients se trouvent les composés à base de Ruthénium NAMI-A et KP1019. L'ensemble de ces données souligne donc le besoin actuel d'identifier et de caractériser l'effet anticancéreux de nouveaux complexes organométalliques.

La plupart des traitements employés actuellement dans la prise en charge des cancers visent à induire l'apoptose des cellules cancéreuses. Pour se faire, de fortes doses de chimiothérapie et/ou de radiothérapie sont employées, sans pour autant être spécifiques des cellules cancéreuses. Les doses importantes et le manque de spécificité des traitements employés conduisent à l'émergence de nombreux effets secondaires lourds pour les patients. Ainsi, un effet cytostatique, obtenu à des doses sub-toxiques de chimiothérapie ou de radiothérapie, est de plus en plus considéré comme une alternative thérapeutique aux agents cytotoxiques conventionnels. Dans ce sens, une attention considérable est tournée vers la sénescence cellulaire, un arrêt prolongé de la prolifération cellulaire, qui pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour inhiber la prolifération de cellules cancéreuses.

III. La sénescence cellulaire

III. 1. Introduction

La sénescence cellulaire se définit comme un arrêt du cycle cellulaire, accompagné par de profondes modifications morphologiques et moléculaires. Ce processus a été observé pour la 1^{ère} fois par L.Hayflick qui a remarqué que les cellules somatiques cessent de proliférer après un nombre précis de divisions cellulaires, dénommé limite d'Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961).

III. 1. 1. Sénescence répllicative

Il a fallu attendre 1990 pour que Harley *et al.* corrélaient l'induction de la sénescence avec le raccourcissement progressif des télomères au cours des divisions cellulaires (Harley *et al.*, 1990).

Les télomères correspondent à des répétitions de la séquence TTAGGG sur lesquelles sont fixées des protéines spécifiques, assurant la stabilité des extrémités des chromosomes. Les télomères adoptent une conformation particulière, la T-loop, qui protège physiquement l'extrémité 3' simple brin terminale du télomère de la dégradation par les exonucléases. Au cours des divisions cellulaires, des motifs TTAGGG sont perdus de par l'incapacité de l'ADN polymérase à répliquer les télomères. Cette perte d'ADN télomérique est compensée par l'action de la transcriptase inverse Télomérase, qui assure la synthèse *de novo* des répétitions télomériques sur les télomères préexistants, maintenant ainsi leur longueur. La télomérase est active dans les cellules germinales (qui ne subissent pas la sénescence). A l'inverse, la majorité des cellules somatiques ne présentent pas une activité télomérase suffisante pour combler le raccourcissement des télomères à chaque division cellulaire.

Le raccourcissement des télomères dans les cellules somatiques s'accompagne d'une perte progressive de la conformation de la T-Loop (Griffith *et al.*, 1999). Dès lors, les extrémités télomériques seront exposées, et reconnues comme des cassures doubles brins par les systèmes de réparation de l'ADN de type NER et BER (Nucleotide/Base Excision Repair), ce qui conduit à l'apparition de foci de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ -H2AX) et l'activation des protéines de réparation TP53BP1 (Tumor Protein P53 Binding Protein 1), NBS1 (encore appelé NBN pour Nibrine) et MDC1 (Mediator of DNA Damage Checkpoint 1) (Jia *et al.*, 2015). De plus, les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and RAD3-

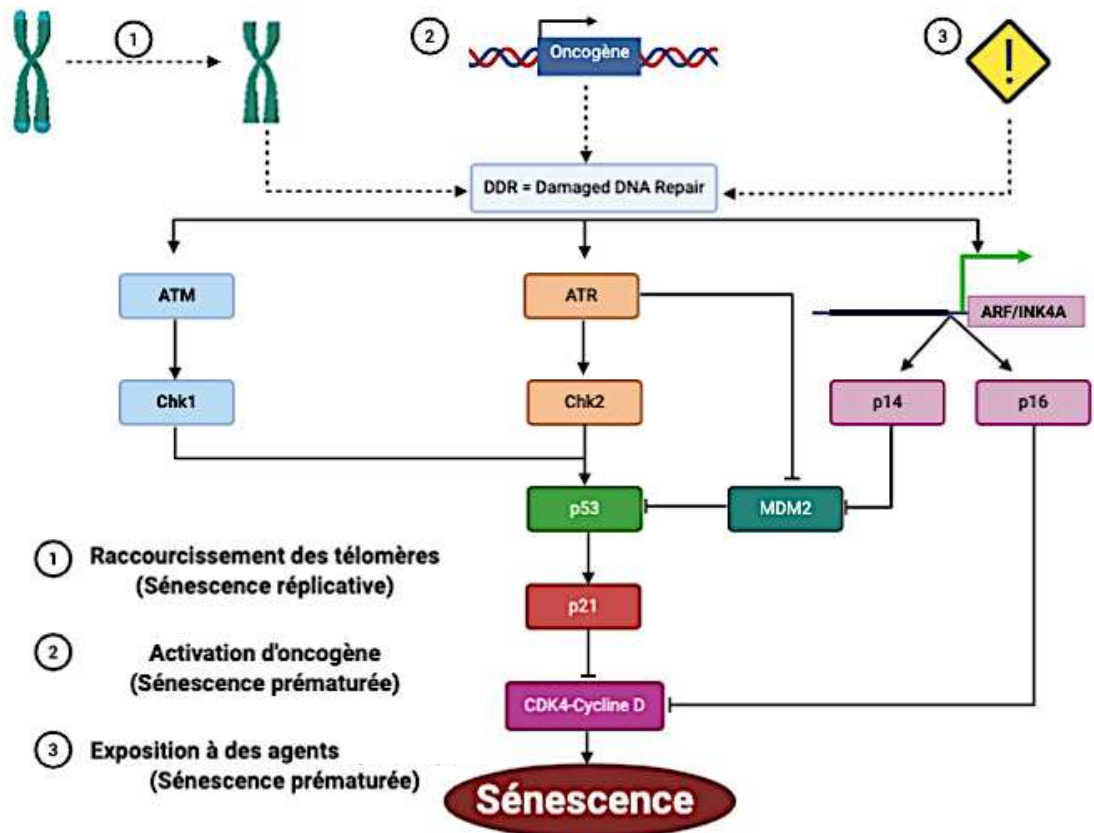


Figure 20. Représentation schématique des mécanismes de sénescence répliquative et prématurée. La sénescence peut être la conséquence d'un raccourcissement progressif des extrémités télomériques des chromosomes (sénescence répliquative), ou d'une multitude de stress, comme un stress oxydatif ou une exposition à des agents cytotoxiques/cytostatiques (sénescence prématurée). L'ensemble de ces stress vont conduire à la formation de lésions, dont la réparation va activer la voie ATM/ATR/Chk1/2 et le locus ARF/INK4A codant p14 et p16, aboutissant à une activation de p53 par Chk1/2 et une stabilisation de son taux protéique par inhibition de MDM2 par p14. L'induction de l'expression du gène codant p21 par la protéine p53 aboutira à une inhibition du complexe CDK4-Cycline D, qui peut être également inhibé par la protéine p16. Cette inhibition aboutira à l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence.

Related) sont recrutées au niveau des télomères, et vont activer respectivement les kinases Chk1 et Chk2, conduisant à une activation de p53 par phosphorylation de sa partie C-terminale (Ou *et al.*, 2005) (**Figure 20**). En plus d'être activé par phosphorylation, le taux protéique de p53 est stabilisé par l'inactivation de l'E3 Ubiquitin Ligase MDM2, qui participe à la dégradation de p53. Cette inactivation fait intervenir la protéine ATM, qui phosphoryle MDM2 entraînant une inhibition de son activité E3 Ubiquitine Ligase (Niculescu *et al.*, 1998), et la protéine p14 (codée par le locus INK4/ARF) dont l'interaction avec MDM2 inhibe sa capacité à ubiquitinyler p53 (Sherr, 2006) (**Figure 20**). L'ensemble de ces mécanismes en réponse au raccourcissement des télomères aboutit à une augmentation de la phosphorylation de p53 sans que son taux d'ARNm et son taux protéique ne soient affectés (Herbig *et al.*, 2004) (Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007) (Atadja *et al.*, 1995). De manière intéressante, ces phosphorylations, qui ont lieu sur la sérine 15, la thréonine 18 et la sérine 376, diffèrent des phosphorylations en réponse à des dommages à l'ADN (Webley *et al.*, 2000). Ces phosphorylations s'accompagnent d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Vaziri *et al.*, 1997), aboutissant notamment à l'induction du gène codant p21 (**Figure 20**). Cette protéine est un inhibiteur du cycle cellulaire, qui va cibler le complexe CDK4-Cycline D qui normalement est responsable de la phosphorylation de Rb et de la libération du facteur de transcription prolifératif E2F.

La protéine p16, un autre inhibiteur de CDK, intervient également dans la sénescence. Cette protéine est codée par le locus INK4/ARF, codant également p14. Ces deux protéines sont des variants d'épissage : ils ont en commun les exons 2 et 3, mais diffèrent par la nature de l'exon 1 (exon 1 α et exon 1 β respectivement pour p16 et p14) (Park and Vogelstein, 2003) (**Figure 20**). La régulation de ce locus est complexe, et fait intervenir différentes voies de signalisation, dont la voie MAPK (Mirzayans *et al.*, 2012). L'implication de p16 dans l'arrêt du cycle cellulaire fait intervenir sa capacité à inhiber les CDK 4 et 6, à l'origine d'une diminution de la phosphorylation de Rb, et une absence de libération du facteur de transcription E2F (**Figure 20**). Une augmentation du taux de transcrits codant p16 a été observée dans des fibroblastes humains déjà en sénescence (Alcorta *et al.*, 1996). Dans ces cellules, les auteurs ont montré que le niveau d'expression de p21 diminue une fois les cellules en sénescence. Ces résultats suggèrent que p21 est impliqué dans l'induction de la sénescence *via* l'arrêt du cycle qu'elle induit (Alcorta *et al.*, 1996), alors que p16 maintient l'arrêt du cycle au cours du temps (Stein *et al.*, 1999).

III. 1. 2. Sénescence prématurée

Une induction de la sénescence peut également avoir lieu en absence de raccourcissement des télomères. Ce type de sénescence a été nommé « prématurée » puisqu'elle a lieu avant que les cellules n'atteignent leur limite de réplication. Cette sénescence est une réponse adaptative à différents types de stress, qui peuvent être d'origine génétique (activation d'oncogènes comme *Ras* dont la surexpression par mutation dans des cellules épithéliales mammaires induit une entrée en sénescence (Sarkisian *et al.*, 2007)), métabolique (stress oxydant, notamment au travers du peroxyde d'hydrogène capable d'induire, à faibles doses, une entrée en sénescence prématurée de fibroblastes humains (Chen *et al.*, 1998)) ou environnementale (molécules cytotoxiques, comme la Doxorubicine capable d'induire, à faibles doses, une entrée en sénescence des cellules tumorales mammaires MCF-7 (Srdic-Rajic *et al.*, 2017)). D'un point de vue moléculaire, les voies p53/p21 et p16 sont également impliquées dans l'induction de la sénescence, suggérant des ressemblances entre la sénescence répllicative et la sénescence prématurée. Dans ce sens, une étude protéomique n'a révélé que peu de différences au niveau protéique entre des cellules rendues sénescents par raccourcissement de leurs télomères ou par exposition à des doses sub-cytotoxiques de Doxorubicine de différentes lignées cellulaires (Aan *et al.*, 2013). Les différences observées concernaient des constituants du cytosquelette (comme la Vimentine), des enzymes métaboliques (comme l'Enolase A, ou ENOA), des protéines impliquées dans la dégradation protéique (comme la protéine Proteasome 20S Subunit Beta 1 ou PSMB1), et des protéines impliquées dans la régulation calcique (comme la protéine Annexin 2 ou ANXA2).

Tout comme la sénescence répllicative, les dommages à l'ADN sont la cause principale d'une entrée en sénescence prématurée. En effet, les stress cités précédemment vont induire des lésions dont la réparation va activer les voies de signalisation aboutissant à la sénescence. Par exemple, dans le cas d'une sénescence d'origine génétique, la surexpression d'oncogènes induit une hyper-réplication de l'ADN, conduisant à une instabilité génomique, et l'apparition de dommages à l'ADN (Graziano and Gonzalo, 2017) (**Figure 20**). Dans ce sens, une phase d'hyper-prolifération de cellules humaines surexprimant l'oncogène *H-Rasv12* a été observée juste avant leur entrée en sénescence (Coppé *et al.*, 2010). Quant aux espèces réactives de l'oxygène et aux molécules cytotoxiques, elles sont capables d'induire la sénescence par leur capacité à générer directement ou indirectement des lésions de l'ADN (Di Micco *et al.*, 2006) (Guillon *et al.*, 2019) (**Figure 20**).

Néanmoins, il est à noter que les systèmes de réparation de l'ADN peuvent être activés en absence de lésions. En effet, une étude a montré qu'un agent ne causant pas de dommages à l'ADN, le butyrate de sodium, est capable d'induire une entrée en sénescence se caractérisant par une augmentation de l'expression de p21 et p16 (Pospelova *et al.*, 2009). De manière surprenante, alors qu'un test de comète a prouvé l'absence de dommages, les noyaux des cellules présentaient des foci de γ -H2AX. Pour autant, dans cette étude, les foci γ -H2AX ne contenaient pas de marquage TP53BP1, une protéine de la réparation de l'ADN.

Enfin, une entrée en sénescence prématurée peut se faire en absence de lésions de l'ADN et sans activation des systèmes de réparation de l'ADN. En effet, des modifications de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ou d'oncogènes peuvent favoriser l'entrée en sénescence. Ainsi, la perte d'expression du gène suppresseur de tumeur *PTEN* est responsable d'une entrée en sénescence de cellules épithéliales prostatiques sans qu'aucune lésion de l'ADN ni d'activation des systèmes de réparation de l'ADN n'aient été identifiées (Chen *et al.*, 2005). De plus, les ROS, en plus de leur capacité à induire des lésions de l'ADN, sont capables d'induire des modifications épigénétiques de l'expression de certains gènes impliqués dans la sénescence cellulaire. Par exemple, le peroxyde d'hydrogène est capable d'induire une déméthylation du promoteur du gène codant p16, *via* sa capacité à diminuer le taux protéique de l'enzyme DNA-méthyltransférase DNMT1, conduisant à une entrée en sénescence de kératinocytes humains (Sasaki *et al.*, 2014)

III. 1. 3. Sénescence vs quiescence

Les termes sénescence et quiescence sont souvent utilisés à tort comme synonymes. En effet, tous deux décrivent un arrêt du cycle cellulaire impliquant les mêmes effecteurs cellulaires (p21, p53, p16...). Historiquement, la différence résidait dans la réversibilité du processus. En effet, la sénescence cellulaire était considérée comme une perte irréversible du potentiel prolifératif, alors que la quiescence se définit comme un état réversible de non-prolifération. Pour autant, il existe actuellement des preuves suggérant que des cellules sénescents peuvent retrouver leur potentiel prolifératif. Ainsi, des cellules cancéreuses pulmonaires rendues sénescents par exposition à des agents de chimiothérapie sont capables de retrouver leur capacité proliférative lorsque l'agent est retiré du milieu de culture (Roberson *et al.*, 2005). Au niveau moléculaire, il semblerait que l'inactivation artificielle par ARN

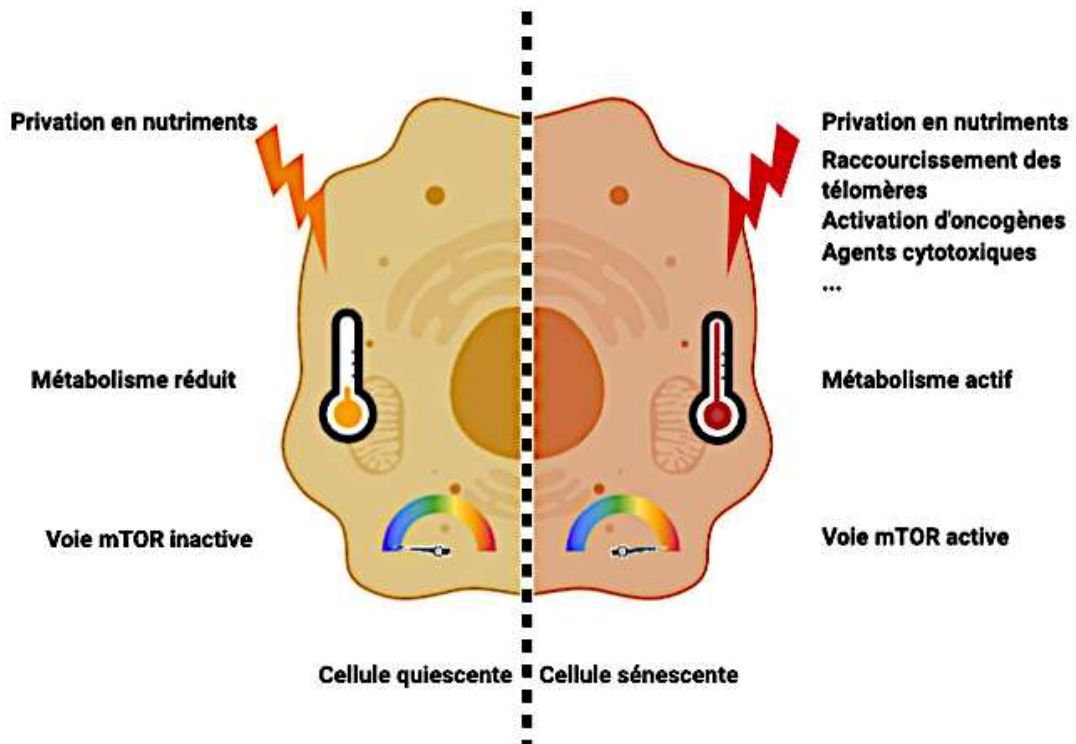


Figure 21. Représentation schématique des différences entre cellule quiescente et cellule sénescence. La première différence réside dans la nature du stimulus à l'origine de l'arrêt de prolifération caractéristique de la quiescence et de la sénescence. La sénescence est une réponse à différents stimuli (comme le raccourcissement des télomères, l'activation d'oncogènes ou des agents cytotoxiques). Les différences entre quiescence et sénescence se complexifie par l'observation d'une induction de la sénescence en réponse à une privation en nutriments, tout comme dans le cas de la quiescence. Ensuite, l'état métabolique est un élément discriminatoire entre sénescence et quiescence, puisque seules les cellules sénescences sont métaboliquement actives. Enfin, l'état d'activation de la voie mTOR permet de différencier les cellules sénescences, dans lesquelles la voie est active, et les cellules quiescentes, dans lesquelles la voie est inhibée.

interférence de p53 ou de RB à des stades précoces de la sénescence cellulaire puisse être capable d'induire une sortie de cet état de sénescence (Chakradeo *et al.*, 2015).

A l'heure actuelle, la différence entre sénescence et quiescence repose sur trois données : la nature des stimuli à l'origine de cet arrêt de prolifération, l'état métabolique des cellules et l'activité de la voie mTOR.

Une privation en nutriments et en facteurs de croissance est à l'origine d'une entrée en quiescence, alors que la sénescence a lieu en réponse au vieillissement cellulaire (sénescence répllicative) ou à différents stress (sénescence prématurée) (**Figure 21**). La différence entre sénescence et quiescence se complexifie encore plus par l'observation qu'une privation en nutriments peut induire une entrée en sénescence (Carroll and Korolchuk, 2018). Pour autant, alors que l'ajout de nutriments et de facteurs de croissance induit un retour vers un état prolifératif des cellules quiescentes, les cellules sénescents restent bloquées dans leur prolifération (Blagosklonny, 2011). Ainsi, l'absence de prolifération des cellules en sénescence même en présence de stimuli prolifératifs pourrait être à l'origine de l'hypertrophie cellulaire et du phénotype hyper-sécrétoire caractéristiques de la sénescence (Blagosklonny, 2003) (**Figure 21**).

En plus des stimuli à l'origine d'une entrée en sénescence ou en quiescence, le statut métabolique est un élément discriminatoire. En effet, les cellules en quiescence sont caractérisées par un métabolisme réduit se traduisant par une diminution de la glycolyse, une diminution du taux de traduction protéique et une activation de l'autophagie comme source de nutriments (Valcourt *et al.*, 2012). Au contraire, une forte activité métabolique est observée dans les cellules sénescents (Kwon *et al.*, 2019).

Enfin, une dernière différence existe entre sénescence et quiescence : l'activité de la voie mTOR, majoritairement impliquée dans la prolifération cellulaire. En effet, les cellules quiescentes sont caractérisées par une inhibition de la voie mTOR (Cho and Hwang, 2012). Par conséquent, le blocage du cycle observé dans les cellules quiescentes résulte à la fois de l'inhibition de la voie mTOR et de l'activation des voies antiprolifératives p53/p21/p16. Au contraire, les cellules sénescents présentent une forte activité de la voie mTOR. Autrement dit, l'inhibition de la prolifération des cellules sénescents induite par p53/p21/p16 prédomine sur

l'effet prolifératif de mTOR (**Figure 21**). Pour autant, l'activation de la voie mTOR est essentielle au maintien du phénotype de sénescence. En effet, des études *in vitro* ont révélé que l'inhibition de la voie mTOR par la Rapamycine dans des cellules sénescents induit une disparition des marqueurs de la sénescence (notamment une disparition du marquage SA- β -Galactosidase), sans qu'une reprise de la prolifération cellulaire n'ait été observée, suggérant une entrée en quiescence (Serrano, 2010). En effet, il semblerait que mTOR soit capable de phosphoryler p53 pour stabiliser la protéine (Jung *et al.*, 2019).

En conclusion, la quiescence se définit par un arrêt transitoire de la prolifération cellulaire en réponse à une privation provoquant à la fois une inhibition de la voie mTOR et une activation des voies antiprolifératives p53/p21/p16. La sénescence est également définie comme un blocage du cycle cellulaire, mais en réponse à d'autres stress qui vont induire une activation des voies p53/p21/p16. Ces voies activées vont conduire à l'inhibition de la prolifération, même en présence de mTOR actif.

III. 2. Marqueurs de la sénescence

Actuellement, il n'existe aucun marqueur universel permettant de caractériser les cellules sénescents. En effet, les modifications morphologiques et moléculaires prises individuellement et qui accompagnent une entrée en sénescence peuvent se retrouver dans des cellules non sénescents. L'identification de la sénescence se base donc sur la combinaison de différents marqueurs.

III. 2. 1. Modifications phénotypiques

La sénescence *in vitro* est associée à d'importants changements morphologiques, dont une augmentation de la taille cellulaire et du noyau, et l'acquisition d'un phénotype étendu de type fibroblastique (Serrano, 2010). Comme cité précédemment, l'acquisition du phénotype de sénescence est majoritairement dictée par la voie mTOR (Bent *et al.*, 2016). Ces modifications phénotypiques s'accompagnent d'un remodelage du cytosquelette, notamment des filaments intermédiaires de vimentine. Il semblerait que la voie ATF6 α intervienne dans ces modifications du cytosquelette (Druelle *et al.*, 2016). En effet, l'augmentation de l'expression du gène codant ATF6 α accompagne l'entrée en sénescence, et va induire une augmentation de l'expression de *COX2* et une surproduction de prostaglandine.

III. 2. 2. Activation du DDR (DNA-Damage Response)

Comme cité au préalable, la majorité des stress induisant une entrée en sénescence provoquent la formation de lésions de l'ADN. Dès lors, le marquage de l'histone γ -H2AX et des protéines de la réparation de l'ADN (TP53BP1, p53 phosphorylé) est généralement employé pour identifier la sénescence cellulaire.

III. 2. 3. Augmentation du contenu lysosomal

La sénescence s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'enzymes lysosomales, et de la masse lysosomale totale (Cho and Hwang, 2012). Dans ce sens, l'activité de l'enzyme lysosomale Senescence-Associated β -Galactosidase (SA- β -Gal) est utilisée comme marqueur. Cette enzyme est codée par le gène *GLB1*, pour lequel une surexpression est observée au cours de la sénescence répliquative et prématurée (Wagner *et al.*, 2015).

L'augmentation de la masse lysosomale accompagnant la sénescence pourrait être le résultat d'une biogenèse lysosomale accrue. En effet, la biogenèse des lysosomes est majoritairement contrôlée par le facteur de transcription EB (TFEB), un effecteur de la voie mTOR (Napolitano and Ballabio, 2016).

III. 2. 4. Modifications nucléaires

La sénescence s'accompagne très souvent de la perte de la lamine B1, une protéine structurale de la lamine nucléaire (Hernandez-Segura *et al.*, 2017). Il semblerait que cette perte de la lamine B1 soit due à une diminution de son taux d'ARN messager. De plus, la visualisation de la conformation chromatinienne révèle la présence de foci nucléaires intenses enrichis en marques épigénétiques répressives (Chandra *et al.*, 2012). Ces foci, nommés SAHF pour Senescence-Associated Heterochromatin Foci, sont généralement visualisés par marquage au DAPI, accompagné d'un marquage du variant de l'histone H2 macroH2A, de l'hétéroprotéine 1 (HP1) et des formes di-et-triméthylées de H3K9 (Aird and Zhang, 2013). Il semblerait que ces SAHF soient impliqués dans la répression transcriptionnelle des gènes prolifératifs, comme le gène codant la cycline A (Zhang *et al.*, 2007).

III. 2. 5. Acquisition d'un phénotype sécrétoire

Les cellules sénescents sont capables de sécréter des cytokines (notamment les interleukines pro-inflammatoires IL-6 et IL-8), des chémokines (dont CXCL et CCL), des

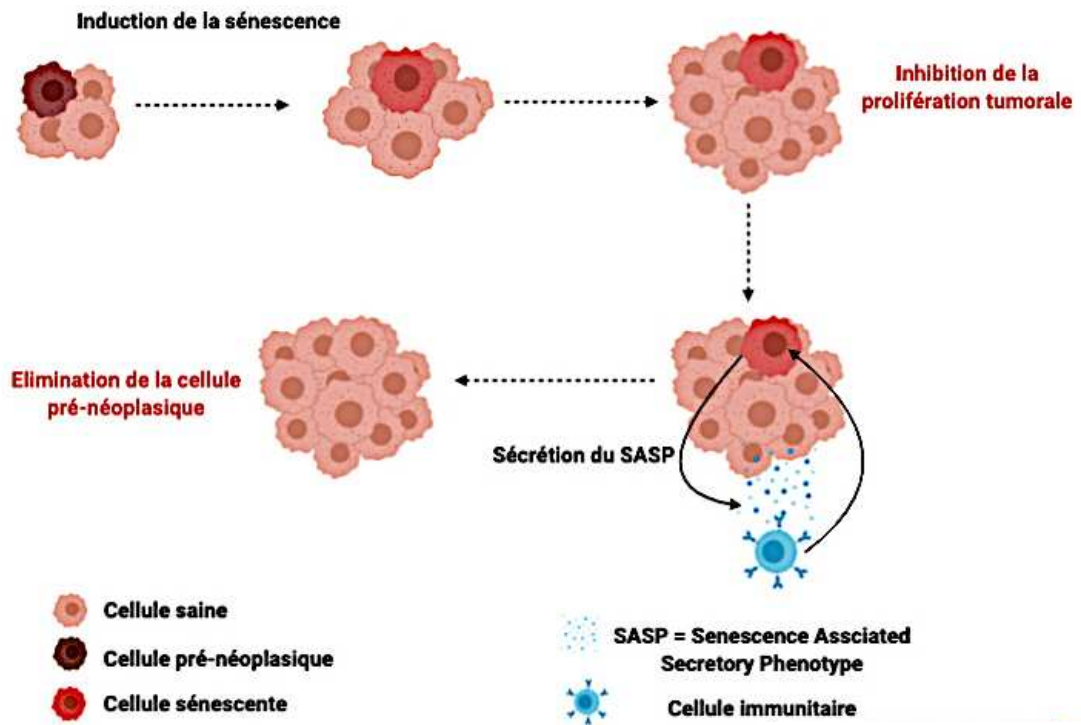


Figure 22. Représentation schématique de l'effet antitumoral de la sénescence cellulaire. Les mutations qui apparaissent au sein d'une cellule saine, et qui la rendent pré-néoplasique, peuvent induire le processus de sénescence au sein de cette cellule. Dès lors, la prolifération de cette cellule « dangereuse » sera bloquée, limitant le risque de tumorigenèse. De plus, la cellule sénescente est capable de sécréter un ensemble de facteurs solubles, prenant le nom de SASP (pour Senescence-Associated Secretory Phenotype). Un certain nombre de ces facteurs vont recruter les cellules immunitaires (dont les cellules Natural Killer), qui se chargeront de l'élimination spécifique de la cellule sénescente pré-néoplasique, réduisant encore plus le risque de tumorigenèse à partir de cette cellule.

protéases (dont certains membres de la famille des métalloprotéases) et des facteurs de croissance (dont le facteur Insulin-Like Growth Factor, IGF) (Coppé *et al.*, 2010). Ce profil sécrétoire, nommé SASP pour Senescence-Associated Secretory Phenotype, semble être très hétérogène, ce qui complique fortement son étude dans le cas de la sénescence (Hernandez-Segura *et al.*, 2017). Le SASP est un programme transcriptionnel médié notamment par les facteurs de transcription pro-inflammatoire NF- κ B (Koo *et al.*, 2015) et C/EBP β (Salotti and Johnson, 2019).

III. 3. Rôles de la sénescence

La sénescence cellulaire est impliquée dans de nombreux processus biologiques normaux ou pathologiques. Dans ces processus, la sénescence est à la fois bénéfique et délétère pour l'organisme. En effet, la sénescence présente un effet bénéfique par exemple dans le processus de cicatrisation en limitant le dépôt de matrice extracellulaire par les fibroblastes, permettant ainsi de limiter le développement de fibrose (Jun and Lau, 2010). Pour autant, la sénescence est impliquée dans l'établissement de maladies dégénératives associées à l'âge comme l'athérosclérose (Minamino *et al.*, 2002), l'ostéoarthritis (Price *et al.*, 2002), la maladie d'Alzheimer (Bhat *et al.*, 2012) et la maladie de Parkinson (Chinta *et al.*, 2013). De plus, un lien a été établi entre la sénescence et l'obésité (Gregor and Hotamisligil, 2011) et le diabète (Sone and Kagawa, 2005).

Ce double rôle, à la fois avantageux et délétère, de la sénescence cellulaire se retrouve également dans le cas du cancer. En effet, la sénescence peut jouer un rôle anti-ou-protumoral, et peut réguler de manière positive ou négative la réponse des tumeurs aux traitements.

III. 3. 1. Rôle antitumoral

L'une des premières preuves de l'effet antitumoral de la sénescence a été obtenue par l'observation d'une entrée en sénescence médiée par p53 et p16 après surexpression de l'oncogène *RAS* dans des lignées primaires saines (Serrano *et al.*, 1997). Ces résultats introduisaient le concept d'une sénescence induite par la surexpression d'un oncogène comme mécanisme antiprolifératif pour limiter la division de cellules pré-néoplasiques. Depuis, de nombreuses preuves tendent à affirmer que la sénescence s'oppose à la transformation maligne de cellules pré-cancéreuses en empêchant la division de cellules présentant des anomalies génétiques (**Figure 22**). Ainsi, des cellules sénescents, identifiées par un fort marquage de la SA- β -galactosidase et une forte expression de p16, ont été observées *in vivo* dans différentes

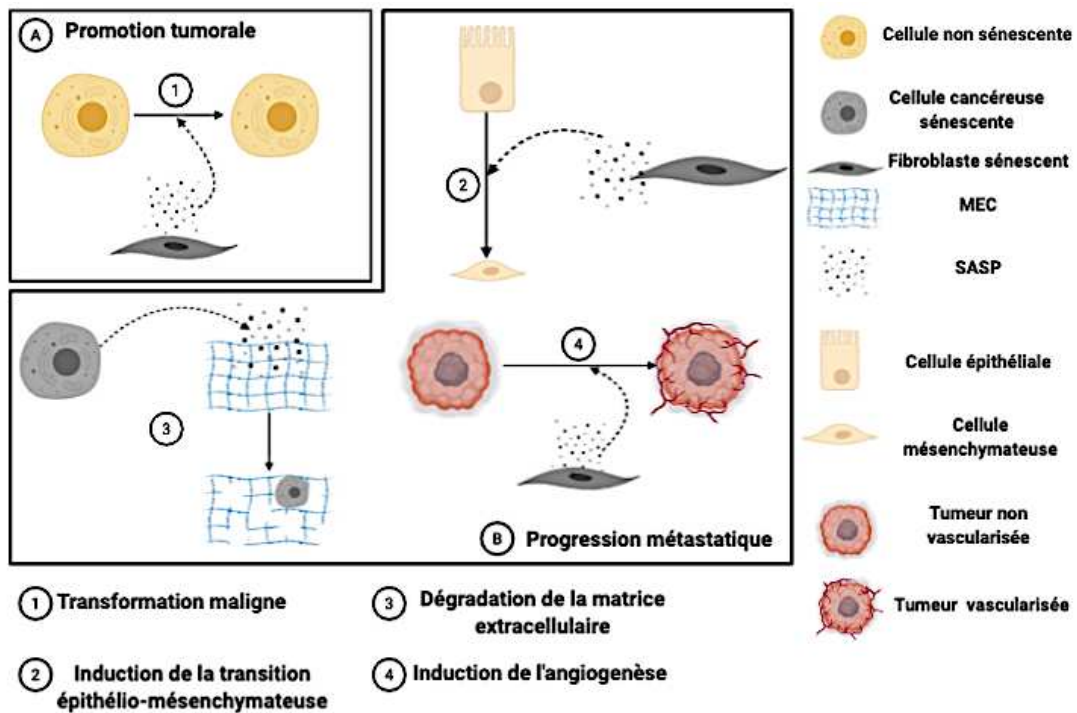


Figure 23. Représentation schématique de l'effet protumoral de la sénescence cellulaire. La sénescence cellulaire peut faciliter la promotion tumorale (A) et/ou la progression métastatique (B). (A) Dans le cas de la promotion tumorale, il est connu que les facteurs sécrétés (SASP pour Senescence-Associated Secretory Phenotype) par des fibroblastes peuvent induire la transformation maligne de cellules environnantes saines. (B) La sénescence cellulaire peut faciliter la progression métastatique de plusieurs manières. Dans un premier temps, les cellules cancéreuses sénescences peuvent sécréter différents facteurs, dont des métalloprotéases (MMP) à l'origine d'une dégradation de la matrice extracellulaire (MEC), processus connu pour faciliter l'invasion et la migration cellulaire. De plus, les facteurs sécrétés par les fibroblastes sénescents peuvent induire la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules épithéliales cancéreuses, étape importante pour l'acquisition d'un pouvoir invasif. Enfin, les facteurs sécrétés par les fibroblastes sénescents peuvent stimuler la formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse), augmentant le risque que des cellules tumorales se retrouvent dans la circulation sanguine.

tumeurs pré-néoplasiques (Yamakoshi *et al.*, 2009). Par exemple, des lésions pré-néoplasiques pulmonaires, qui se développent lorsque le gène *K-RASV12* est muté, contiennent une forte abondance de cellules sénescents, alors que des adénocarcinomes ne contiennent presque aucune cellule positive pour les marqueurs de la sénescence (Collado *et al.*, 2010). De la même manière, la présence de cellules sénescents a été observée dans des tumeurs prostatiques de stades précoces, alors que des échantillons tumoraux de stades plus avancés ne contiennent plus de cellules en sénescence (Chen *et al.*, 2005).

La sénescence, en plus de limiter la tumorigénèse, peut également favoriser l'élimination des cellules pré-néoplasiques. En effet, les cellules tumorales sénescents peuvent, au travers de leur sécrétome, recruter les cellules du système immunitaire à l'origine de leur élimination (**Figure 22**). Par exemple, l'induction de la sénescence de cellules tumorales murines hépatiques par activation constitutive de p53 s'accompagne d'une réponse inflammatoire progressive médiée par les leucocytes polynucléaires, à l'origine de l'élimination des cellules tumorales sénescents, et d'une diminution du volume tumoral (Xue *et al.*, 2007). Cet effet est médié par la sécrétion de facteurs chimio-attractants spécifiques des neutrophiles (dont le facteur Neutrophilic Cytosolic Factor 2, ou Ncf2), des macrophages (dont le facteur Macrophage galactose N-acetyl-galactosamin 2, ou Mgl2) et des Natural Killer (dont le facteur Killer Cell Lectin Like Receptor B1, ou Klrb1).

III. 3. 2. Rôle protumoral

Les effets bénéfiques de la sénescence doivent cependant être nuancés par ses effets délétères. En effet, bien que la sénescence s'oppose à la transformation maligne, les facteurs sécrétés par les cellules stromales sénescents (cytokines pro-inflammatoires, facteurs de croissance, MMP...) peuvent faciliter la progression de cellules tumorales environnantes et accélérer la formation de métastases (**Figure 23A**). Par exemple, la co-injection de fibroblastes sénescents avec des cellules épithéliales cancéreuses dans des souris immunodéprimées stimule de manière significative la tumorigénèse par rapport aux souris injectées uniquement avec les cellules cancéreuses (Coppe *et al.*, 2006)(Krtolica *et al.*, 2001)(Liu and Hornsby, 2007).

En plus de promouvoir la tumorigénèse, la sénescence est impliquée dans la progression métastatique des tumeurs. Par exemple, des cellules mammaires murines rendues sénescents par la surexpression de *Ras* sont capables de sécréter la métalloprotéase 3 (MMP3), à l'origine

d'une dégradation de la matrice extracellulaire, favorisant la dissémination métastatique (Sarkisian *et al.*, 2007) (**Figure 23B**). De plus, les facteurs sécrétés par les cellules sénescents peuvent faciliter la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules épithéliales cancéreuses, et ainsi augmenter leur potentiel métastatique (Laberge *et al.*, 2012) (**Figure 23B**). Dans ce sens, il a été montré que des fibroblastes du stroma mammaire en sénescence sécrètent de l'interleukine IL-8, qui, au travers de la voie STAT3, est capable d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules cancéreuses mammaires environnantes (Al-Khalaf *et al.*, 2018).

Enfin, le sécrétome, notamment au travers du facteur VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) des cellules sénescents peut favoriser l'angiogenèse (Strieter *et al.*, 2006) (**Figure 23B**). Dans ce sens, la co-injection de cellules épithéliales tumorales avec des fibroblastes sénescents induit la formation de tumeurs significativement plus vascularisées que dans le cas d'une injection de cellules tumorales seules (Coppe *et al.*, 2006). De plus, le facteur IL-1, faisant parti du sécrétome des cellules sénescents, est connu pour stimuler l'endothélium, et augmenter le potentiel adhésif des cellules cancéreuses aux vaisseaux sanguins (Orr and Wang, 2001). Ce processus favorise donc le passage des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins (appelé intravasation) ou en dehors des vaisseaux (appelé extravasation), étapes indispensables à la formation de métastases.

III. 3. 3. *Sénescence et réponse aux traitements*

Bien que les cellules tumorales aient fréquemment perdu leur sensibilité à l'apoptose et à la sénescence, ces réponses peuvent être réactivées en présence de molécules de chimiothérapie ou en réponse à la radiothérapie. En effet, la plupart des thérapies anticancéreuses visent, ou ont pour conséquence indirecte, la formation de dommages à l'ADN induisant une entrée en apoptose ou en sénescence, dans le cas d'une réparation inefficace. Cette sénescence induite par les traitements est généralement observée en présence de faibles doses de chimiothérapie, alors que de fortes doses induisent généralement l'apoptose de cellule tumorales. Dans ce sens, un traitement avec 250 nM de Doxorubicine d'une lignée cancéreuse prostatique induit une entrée en apoptose, alors qu'une dose 10 fois moins concentrée entraîne la sénescence des cellules (Schwarze *et al.*, 2005). La Doxorubicine, à faible dose, est également capable d'induire une entrée en sénescence de la lignée tumorale mammaire triple négative MDA-MB231 (Inao *et al.*, 2019). Un autre agent de chimiothérapie conventionnel, le

5-Fluorouracile, est capable d'induire une entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, accompagnée d'une augmentation de la quantité intracellulaire en ROS (Milczarek *et al.*, 2018). Un autre agent ciblant l'ADN, le cisplatine, est également capable d'induire la sénescence de la lignée de fibrosarcome HT-1080 (Chang *et al.*, 1999). Les agents d'hormonothérapie sont aussi responsables d'une induction de la sénescence. Dans ce sens, des doses sub-cytotoxiques de Tamoxifène induisent une entrée en sénescence des cellules tumorales mammaires MCF-7, T47D et MDA-MB435, *via* sa capacité à former des espèces réactives de l'oxygène (Lee *et al.*, 2014). Enfin, la radiothérapie est également un inducteur de sénescence. Par exemple, une exposition à des doses de 10 Greys de cellules tumorales mammaires MCF-7 induit leur entrée en sénescence (Razmik Mirzayans, 2013).

La sénescence cellulaire est de plus en plus considérée comme une réponse aux traitements à part entière, de par son effet cytostatique. La sénescence pourrait même être préférée par rapport à l'effet pro-apoptotique des thérapies. En effet, la sénescence est induite à des doses sub-cytotoxiques, ce qui limite les effets secondaires des traitements. De plus, une grande partie des tumeurs humaines présentent des défauts des systèmes pro-apoptotiques (dont des modifications de l'expression des membres de la famille Bcl2), et sont donc résistantes à l'effet cytotoxique des thérapies anticancéreuses (Qin *et al.*, 2018). La sénescence pourrait donc consister en une alternative efficace à la place des thérapies cytotoxiques conventionnelles. Dans ce sens, une étude a montré qu'un modèle murin de lymphomes, déficient de manière naturelle pour les voies pro-apoptotiques, répond de manière positive à des agents induisant la sénescence cellulaire, conduisant à une survie améliorée après traitement (Schmitt *et al.*, 2002). Par conséquent, une partie des recherches en cancérologie vise à synthétiser des composés capables d'induire la sénescence, et prenant le nom de sénostatiques. Par exemple, le Palbociclib, un inhibiteur de CDK4/6, est capable d'induire la sénescence de nombreux modèles cellulaires (Leontieva and Blagosklonny, 2013)(Michaud *et al.*, 2010). Des essais cliniques ont apporté des résultats positifs dans le modèle du cancer du sein, et le Palbociclib a reçu son Autorisation de Mise sur le Marché par la FDA en combinaison avec le Létrozole dans le traitement des tumeurs mammaires ER α positives/HER2 négatives (Beaver *et al.*, 2015).

Pour autant, les preuves actuelles de la réversibilité de la sénescence soulèvent la question de possibles cas de résistance. Par exemple, des travaux ont montré qu'une petite portion de cellules tumorales mammaires MCF-7 rendues sénescents par exposition à des

doses sub-cytotoxiques de Doxorubicine sont capables de sortir de cet état de sénescence, et réacquérir une capacité proliférative (Elmore *et al.*, 2005). De la même manière, Roberson *et al.* ont montré que la lignée cancéreuse pulmonaire H1299 est capable d'échapper à la sénescence induite par l'agent camptothecin, et de retourner vers un état prolifératif (Roberson *et al.*, 2005). Ces deux travaux mettent en lien l'échappement à la sénescence avec un risque de récurrence de la tumeur après traitement. Pour autant, l'équipe de Wang *et al.* a montré que la fréquence d'échappement à la sénescence ne concernait qu'une cellule sur 10^6 suggérant 1) que l'arrêt de la prolifération associé à l'induction de la sénescence correspond au phénotype prédominant des cellules traitées, et 2) que l'échappement à la sénescence est un phénomène rare (Wang *et al.*, 2013). Différentes caractéristiques ont été associées aux cellules capables d'échapper à la sénescence, dont la polyploïdie et le caractère souche des cellules. Ainsi, l'agent camptothecin induit la sénescence de cellules H1299, parmi lesquelles 20% ont été caractérisées comme polyploïdes (Wang *et al.*, 2013). Les auteurs ont ensuite séparé les cellules sénescents non diploïdes et les cellules sénescents polyploïdes, et ont réalisé des tests de colonies. Les résultats ont mis en évidence une capacité plus importante des cellules sénescents polyploïdes à former des colonies par rapport aux cellules diploïdes. De plus, une étude a montré qu'environ 1% des cellules rendues sénescents par exposition à des agents de chimiothérapie sont caractérisées par l'expression de marqueurs souches (CD34 et CD117) (Sabisz and Skladanowski, 2009). De la même manière, il a été montré que l'échappement de différentes lignées mammaires (MCF-7, MDA-MB231 et T47D) à la sénescence induite par différents agents de chimiothérapie pourrait être dû à l'émergence d'une population de cellules souches (Saleh *et al.*, 2019).

III. 3. 4. Ciblage de la sénescence

Différentes stratégies ont été proposées pour limiter les effets délétères de la sénescence tout en gardant son intérêt thérapeutique. Ces stratégies visent à spécifiquement détruire les cellules sénescents et à empêcher l'acquisition du profil sécrétoire des cellules sénescents. Comme cité précédemment, l'élimination des cellules sénescents peut avoir lieu de manière naturelle par l'intervention du système immunitaire, mais peut être également induite par des composés prenant le nom de sénolytiques. Par exemple, un nouveau composé, appelé navitoclax, un inhibiteur de Bcl2 et Bcl-Xl est capable d'induire spécifiquement une entrée en apoptose caspase-dépendante de cellules sénescents (Chang *et al.*, 2016). D'autres inhibiteurs de Bcl2, dont les composés ABT-737, A1331852 et A1155463 sont également des composés

sénolytiques prometteurs (Zhu *et al.*, 2017). La famille Bcl2 n'est pas la seule cible des composés sénolytiques. En effet, un inhibiteur du récepteur Ephrin type-B Receptor 1, ou EPHB1 (appelé dasatinib) a montré son efficacité dans l'élimination de cellules sénescents humaines dans un essai clinique de phase I (Hickson *et al.*, 2019). Un inhibiteur de la voie PI3K, le Quercetin, semble être également efficace dans l'élimination des cellules sénescents (Malavolta *et al.*, 2016).

En plus de l'élimination des cellules sénescents, la modulation du profil sécrétoire a montré un succès dans des cellules cancéreuses prostatiques, où l'inhibition de *STAT3* a permis une réduction de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Toso *et al.*, 2014).

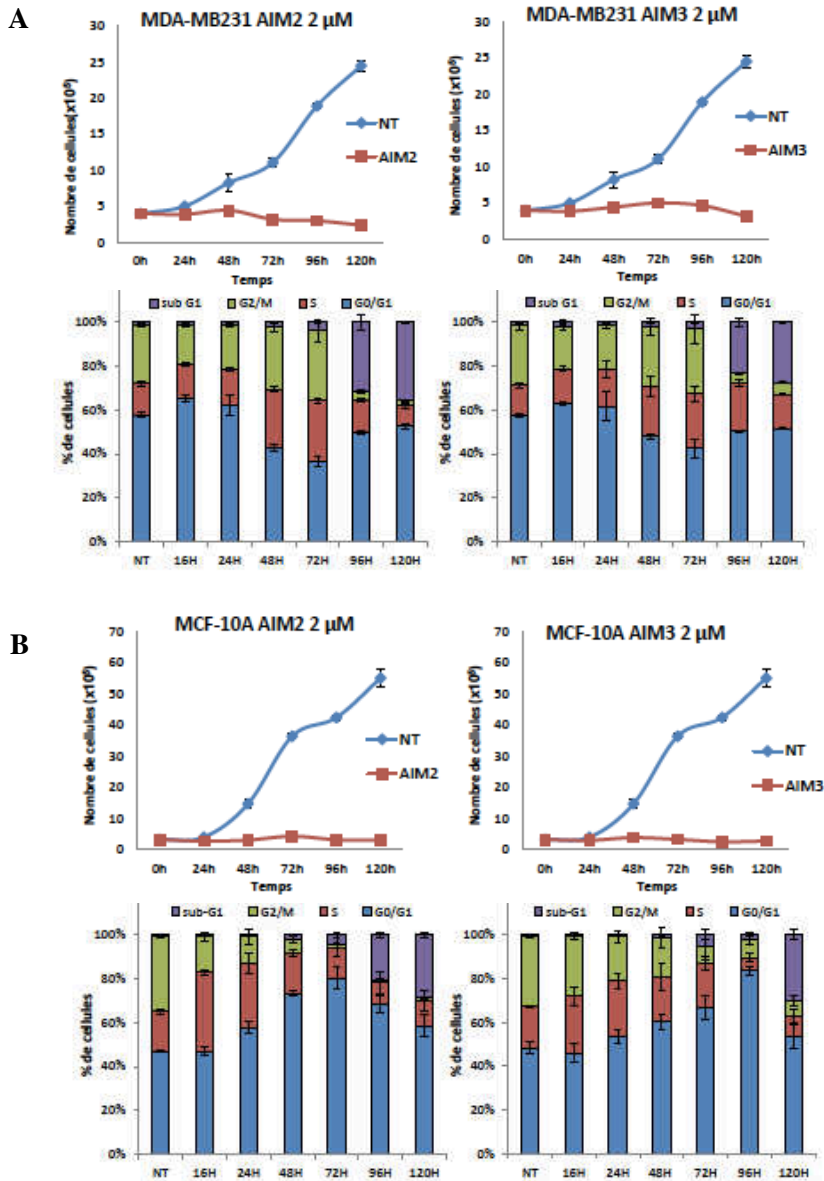


Figure 24. Mise en évidence de l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 sur une lignée cancéreuse mammaire (MDA-MB231) (A) et une lignée mammaire saine (MCF1-10A) (B). Après un traitement de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h et 120h avec 2 μ M d'AIM2 ou AIM3, le nombre de cellules a été comptabilisé. Parallèlement, 5x10⁵ cellules ont été récupérées, lavées et perméabilisées. La répartition des cellules dans le cycle cellulaire a été évaluée par mesure de la fluorescence émise par l'iodure de propidium. Les résultats présentés correspondent à la moyenne issue de 3 expériences indépendantes. D'après (Thèse de Jie Li, 2018)

Hypothèses & Objectifs

A l'heure actuelle, le cancer du sein correspond à la 2^{ème} pathologie cancéreuse la plus fréquente. Le taux d'incidence du cancer du sein a fortement augmenté depuis 50 ans, alors que sa mortalité a légèrement chuté (INCa). Ce décalage entre les courbes d'incidence et de mortalité s'explique par le diagnostic de plus en plus précoce et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Néanmoins, le cancer du sein reste la 1^{ère} cause de décès par cancer chez les femmes. Cette forte mortalité s'explique notamment par l'agressivité de certaines tumeurs mammaires, en particulier les tumeurs triples négatives, et/ou par l'absence de réponses aux thérapies, voire à l'acquisition de résistance. Une partie des recherches actuellement menées en cancérologie repose donc sur 2 axes.

Le 1^{er} axe correspond à la caractérisation de marqueurs moléculaires capables de prédire le devenir métastatique des tumeurs mammaires, mais également leur réponse aux différentes thérapies. Dans ce contexte, le laboratoire d'accueil a identifié le gène codant la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) comme nouveau potentiel biomarqueur. En plus de son rôle initial dans la réparation des lésions induites par les rayons ultraviolets (Stoyanova *et al.*, 2009), la protéine DDB2 a été montrée comme impliquée dans la prolifération des cellules tumorales mammaires (Kattan *et al.*, 2008), ainsi que leur progression métastatique (Ennen *et al.*, 2013) (Barbieux *et al.*, 2016) et leur réponse à des agents de chimiothérapie (Thèse de Rémi Klotz, 2014). Afin de valider l'expression du gène *ddb2* comme biomarqueur dans le cancer du sein, une étude *in silico* de différentes bases de données transcriptomiques a été réalisée dont les résultats présentés dans ce manuscrit ont permis la rédaction d'un article scientifique.

Le 2^{ème} axe majeur en recherche consiste en l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes. Dans cette recherche de nouveaux agents anticancéreux, de plus en plus d'attention se tourne vers la famille des complexes organométalliques. En effet, l'efficacité antitumorale de nombreux composés appartenant à cette famille, dont le cisplatine, a permis leur intégration dans des protocoles de traitements de divers cancers, dont celui du sein. Néanmoins, l'utilisation clinique de ces composés est confrontée aux cas de résistance et/ou aux effets secondaires assez lourds. Ainsi, une recherche de nouveaux complexes organométalliques avec une action anticancéreuse offre l'espoir de surmonter les limites

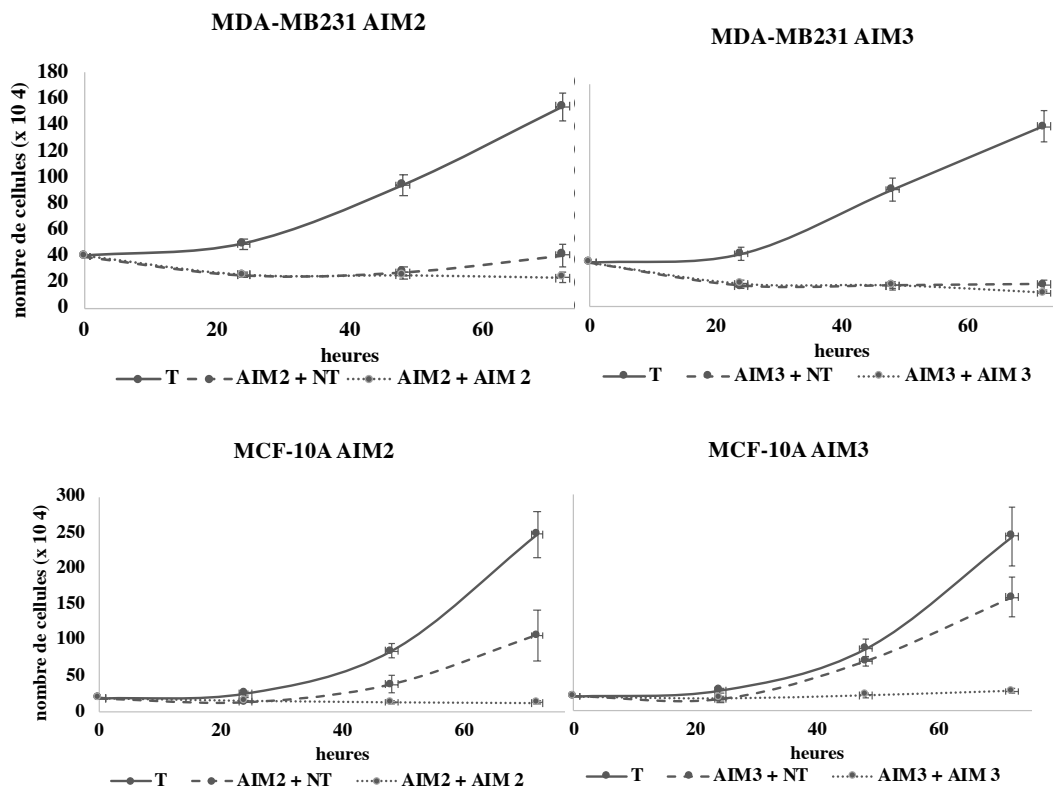


Figure 25. Analyse de la réversibilité d'un traitement de 72h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 et des cellules mammaires saines MCF-10A. 6h après ensemencement (0h), les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, puis comptées après 24h, 48h et 72h. Les résultats présentés correspondent à la moyenne issue d'au moins 3 expériences indépendantes.

cliniques de cette famille de molécules. C'est dans ce cadre que s'inscrivent une partie des travaux du laboratoire qui s'intéresse aux effets cellulaires de complexes organométalliques dans des modèles de cancers du sein pour lesquels le laboratoire possède une expertise. Ce projet rassemble un consortium, composé d'une équipe de chimistes de synthèse, dirigée par le Dr. GROS (L2CM UMR7053, Nancy), une équipe de chimistes de modélisation, dirigée par le Dr. MONARI (LPCT, UMR7019, Nancy), et deux équipes de biologistes, dirigée par le Dr. GRANDEMANGE (CRAN, UMR7039, Nancy) et le Dr. CARTRON (CRCNA, INSERM U892). Le travail de modélisation moléculaire conduit par l'équipe du Dr. MONARI a permis de mettre en évidence une interaction de complexes organométalliques à base de Fer appelés AIM avec l'ADN, qui a été vérifiée expérimentalement (Gattuso *et al.*, 2015). L'interaction des molécules avec l'ADN pouvant interférer avec la division cellulaire, une étude de la prolifération de lignées cellulaires traitées avec deux complexes, AIM2 et AIM3, a été réalisée. Les résultats ont montré une inhibition complète de la prolifération de cellules mammaires cancéreuses (MDA-MB231) (**Figure 24A**) et saines (MCF-10A) (**Figure 24B**), associée à un blocage du cycle cellulaire (Thèse de Jie Li, 2018). Une analyse du pourcentage de cellules en phase sub-G1 a révélée que seules 30% des cellules traitées pendant 120h entrent en apoptose (**Figures 24A & B**). Ces résultats ont donc permis de démontrer l'effet cytostatique de ces nouveaux composés. D'autres expériences ont été réalisées pour étudier la possible réversibilité de l'inhibition de la prolifération induite par les complexes AIM2 et AIM3. Pour cela, les cellules ont été traitées pendant 72h avec AIM2 ou AIM3, puis le milieu de culture a été remplacé par un milieu ne contenant plus de molécules pendant 120h supplémentaires. Les résultats ont mis en évidence un maintien de l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB231, même lorsque les molécules sont retirées du milieu de culture (**Figure 25**). De manière intéressante, une reprise de la prolifération des cellules MCF-10A prétraitées avec les molécules AIM2 et AIM3 a été observée une fois le traitement arrêté (**Figure 25**). Ces résultats préliminaires indiquent donc que l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 est réversible uniquement dans la lignée mammaire saine MCF-10A, mais pas dans la lignée cancéreuse MDA-MB231.

Par ailleurs, les travaux antérieurs ont mis en évidence la capacité de ces composés (AIM2 et AIM3) à induire une déméthylation directe de l'ADN. En effet, un test acellulaire réalisé avec la molécule AIM2 ou AIM3 en présence d'ADN hyperméthylé seulement, a permis de mettre en évidence une diminution du taux de 5-méthylcytosines au bout d'1h de traitement. Cette diminution est comparable à celle observée en présence du site actif de l'enzyme

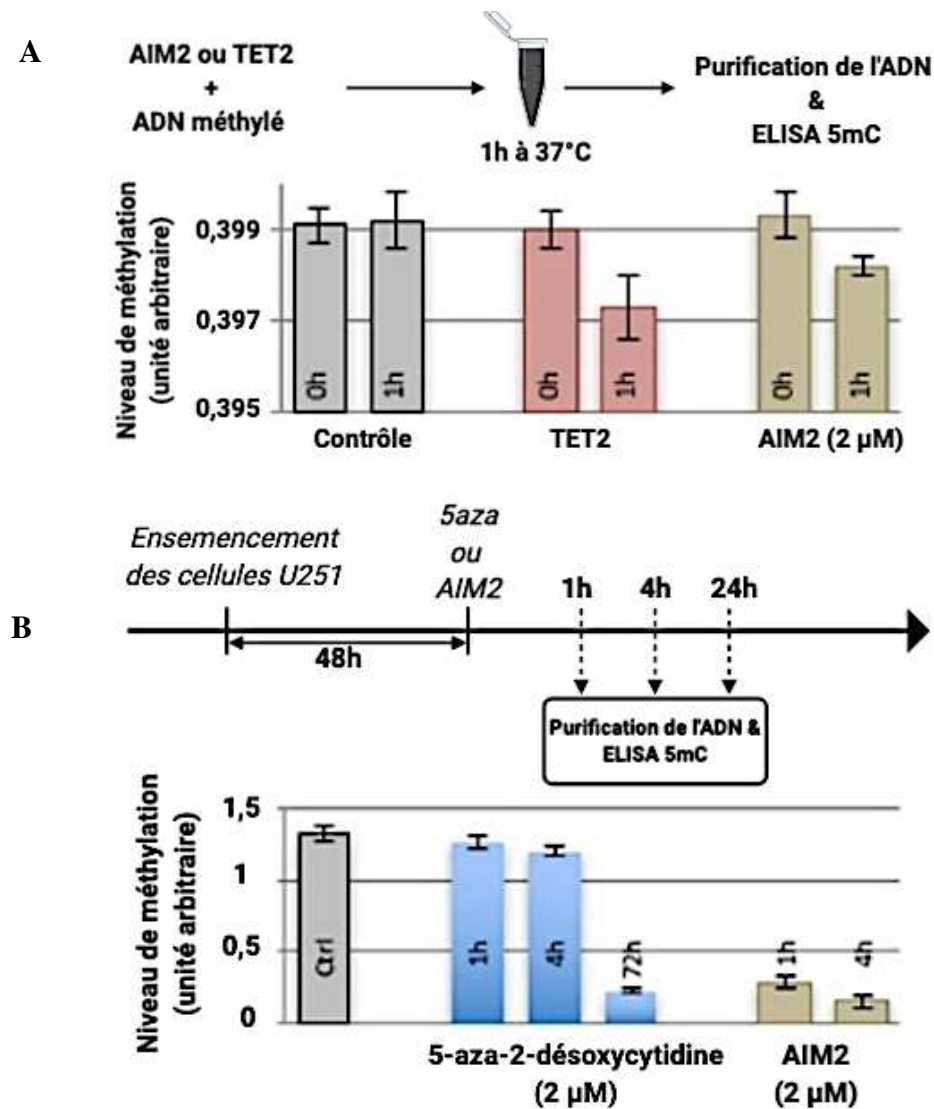


Figure 26. Mise en évidence de la capacité de la molécule AIM2 à induire une diminution du taux de 5-méthylcytosines. (A) L'ADN méthylé a été incubé pendant 1h à 37°C avec de l'eau (Contrôle), AIM2 (2 µM) ou avec le domaine catalytique de la protéine TET2 (10 µg). Après purification, 100 ng d'ADN ont été utilisés pour mesurer le taux de 5-méthylcytosines par ELISA. (B) Après un traitement d'1h ou 4h avec AIM2 (2 µM) des cellules de glioblastome (U251), le niveau de 5-méthylcytosines a été déterminé par ELISA. Des cellules traitées avec de la 5azadésoxycytidine (2 µM) pendant 1h, 4h ou 24h ont été utilisées comme contrôle positif.

déméthylante TET2, utilisé comme contrôle positif (**Figure 26A**). Ces données *in vitro* ont été complétées par des données *in cellulo*, confirmant la diminution du taux de 5-méthylcytosines de l'ADN de cellules de glioblastome U251 après 1h de traitement avec la molécule AIM2 et AIM3, alors que cet effet n'est observé qu'après 72h de traitement avec l'agent déméthylant, 5-azadésoxycytidine (**Figure 26B**). Ces données, qui ont été confirmées par différentes techniques, démontre donc le potentiel déméthylant des complexes organométalliques à base de Fer.

Ces résultats particulièrement novateurs ont conduit le consortium a déposé un brevet (numéro de publication 3 088 200, le 15 mai 2020). Mon projet de thèse s'inscrit directement dans la suite de ce travail et vise à comprendre et caractériser l'effet cytostatique des complexes organométalliques à base de Fer : d'une part en analysant les conséquences d'un arrêt prolongé de la prolifération cellulaire (entrée des cellules en sénescence) mais également à démontrer l'intérêt thérapeutique de l'utilisation de combinaisons thérapeutiques *in vitro* incluant ces composés (associés avec le Tamoxifène, la Doxorubicine, le 5-Fluorouracile ou encore la radiothérapie).

Lignées cellulaires	Fournisseur	Statut ER α	Statut PR	Statut HER2	Statut p53	Origine	Sous-types
MDA-MB231	ATCC	-	-	-	Muté	Adénocarcinome mammaire	Triple négatif, Basal-Like
MCF-7	ATCC	+	+	-	Sauvage	Adénocarcinome mammaire	Luminal A
T47D	ATCC	+	+	-	Muté	Carcinome ductal mammaire	Luminal A
MCF-10A	ATCC	-	+	-	Sauvage	Tissu mammaire normal	

Tableau 2. Caractéristiques des lignées cellulaires mammaires utilisées au cours de ce travail. Les cellules MCF-7 et T47D appartiennent au sous-type Luminal A et se caractérisent par l'expression d'ER α et de PR. Au contraire, les cellules MDA-MB231 et Hs578T portent le nom de triple négatives, car elles n'expriment ni ER α , ni PR, ni HER2. Ces deux types cellulaires appartiennent au sous-groupe des tumeurs mammaires Basal-like. Enfin, les cellules MCF-10A proviennent de tissu mammaire non cancéreux. Le statut p53 (muté ou wild type) est également présenté pour chaque lignée cellulaire.

Matériel & Méthodes

Partie 1 : Étude *in vitro*

I. Culture cellulaire

I. 1. Lignées cellulaires

Au cours de ce travail, différentes lignées cellulaires, dont les caractéristiques sont présentées dans le **Tableau 2**, ont été utilisées. Les cellules MDA-MB231 sont dites triples négatives de par l'absence d'expression des récepteurs ER α , PR et HER2, et ont subi la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) les rendant hautement invasives et migratrices. Au contraire, les cellules MCF-7 et T47D, qui expriment ER α , n'ont pas subi la TEM et ont ainsi gardé leur phénotype épithélial les rendant faiblement invasives. Enfin, les cellules MCF-10A ont été utilisées comme modèle de cellules mammaires épithéliales saines.

I. 2. Conditions de culture

Les lignées cellulaires mammaires cancéreuses MDA-MB231, MCF-7 et T47D sont cultivées en monocouche dans un milieu RPMI 1640 sans rouge phénol (Gibco, Invitrogen, UK) supplémenté par 2 mM de L-Glutamine, 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma) préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes, ainsi que d'antibiotiques utilisés en alternance (soit 0,1 mg/mL de gentamicine soit un mélange de 100 U/mL de pénicilline et de 0,1 mg/mL de streptomycine). Les lignées MCF-7 et T47D étant hormono-sensibles, la culture se fait en présence de 100 nM d'œstradiol.

La lignée cellulaire MCF-10A est cultivée en monocouche dans un milieu DMEM/F12 sans rouge phénol (Gibco, Invitrogen) contenant 10 μ g/mL d'insuline bovine (Sigma), 20 ng/mL de hEGF (human Epithelial Growth Factor) (Sigma), 100 ng/mL de toxine cholérique (Sigma) et 5% de sérum de cheval (Gibco, Invitrogen) préalablement décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 minutes.

Les différentes lignées cellulaires sont maintenues en culture dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂. Lorsque les tapis cellulaires atteignent la confluence, généralement au bout de 3 à 4 jours, les cellules sont récoltées par trypsination à l'aide d'une solution contenant 0,05% de trypsine et 0,02% d'EDTA (Sigma) diluées dans du D-PBS (Sigma). L'absence de

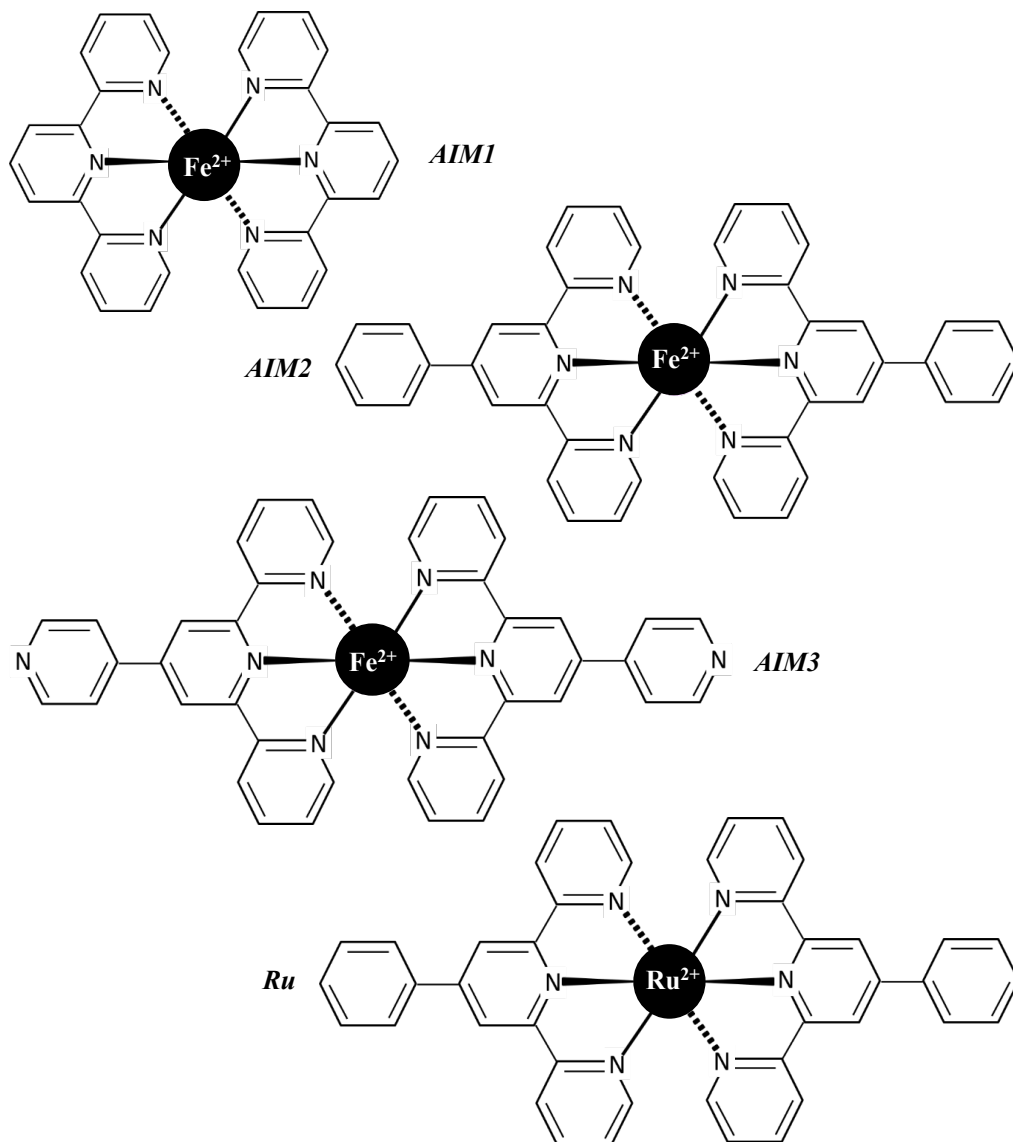


Figure 27. Représentation de la structure chimique des différents complexes à base de Fer (AIM1, AIM2 et AIM3) et à base de Ruthénium (Ru). Les 4 molécules présentées ont été synthétisées par l'équipe du Pr. Philippe GROS. AIM1, AIM2 et AIM3 se caractérisent par la présence d'un ion Fe²⁺ au centre de la molécule, et la molécule Ru par un ion Ru²⁺.

mycoplasmes est vérifiée toutes les 3 semaines par un marquage au Hoescht 33342 (Invitrogen). Toutes les expériences présentées ont été réalisées en absence de mycoplasmes et sur des cellules n'excédant pas 80% de confluence.

I. 3. Traitements

I. 3. 1. Traitements avec les molécules AIMs

Les complexes organométalliques utilisées lors de ces travaux ont été synthétisés par l'équipe du Pr Philippe GROS. Parmi ces complexes, les molécules AIM1, AIM2 et AIM3 se caractérisent par la présence d'un ion Fe_{2+} au centre de la molécule, et la molécule Ru par le remplacement de l'ion Fe_{2+} par un ion Ru_{2+} . La structure des 4 molécules est présentée sur la **Figure 27**.

Toutes les molécules nous ont été fournies sous forme de poudre. Les molécules AIM1, AIM2 et AIM3 sont reprises dans une solution contenant 20% d'éthanol et 80% de D-PBS afin d'obtenir des solutions mères à 1 mM, 5 mM et 5 mM respectivement. La molécule Ru est reprise dans de l'eau stérile pour obtenir une solution mère à 0,63 mM. Toutes ces solutions mères sont ensuite placées à 37°C sous agitation sur la nuit pour une solubilisation optimale. Les solutions filles d'AIM1, AIM2 et AIM3 sont obtenues par dilution des solutions mères dans du D-PBS. Quant à la molécule Ru, la dilution de la solution mère se fait dans de l'eau stérile. Les solutions mères et filles sont par la suite conservées 4°C à l'abri de la lumière.

Avant utilisation, les molécules AIM2 et AIM3 sont préchauffées à 37°C pendant 10 minutes pour les resolubiliser.

I. 3. 2. Traitements avec des agents de chimiothérapie

Concernant le Tamoxifène, la solution de 4-hydroxy-tamoxifène (Sigma) est reprise dans de l'éthanol 95% pour obtenir une solution mère à 5 mg/mL, stockée à -20°C à l'abri de la lumière. Les cellules non traitées sont cultivées dans un milieu contenant 0,2% d'éthanol.

La solution mère de Doxorubicine a été reprise à 2 mg/mL dans de l'eau stérile et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

Enfin, la solution mère de 5-Fluorouracile a été reprise à 250 μ M dans du DMSO et conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

I. 3. 3. Exposition aux Ultra-Violets

Les cellules ont été exposées à des irradiations de types Ultraviolets grâce au four UV CrossLinker (Cleaver Scientific). L'exposition des boîtes de culture, dont le couvercle a été retiré le temps de l'exposition, s'est faite à 0,2 Joules pendant 30 secondes. Les cellules ont ensuite été remises en culture pendant 4 ou 8h selon les expériences.

I. 3. 4. Exposition à des rayons ionisants utilisés en radiothérapie

L'irradiation a été réalisée en partenariat avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine située au CHRU de Nancy (Brabois). Pour cela, un accélérateur linéaire du service de radiothérapie a été utilisé. Les cellules ont ainsi été exposées à 2 Greys (photons de 6 MV, débit de 200 Unité Moniteur/minute) pendant 1 minute.

Dans le cadre des marquages γ -H2AX et TP53BP1, les cellules ont été remises en culture pendant 15 minutes, 3 heures ou 5 heures avant fixation. Pour les expériences de radiosensibilisation, ces délais étaient de 3 et 5h.

II. Étude de la prolifération

II. 1. Par comptage cellulaire

Les cellules sontensemencées à 10^5 cellules/mL pour les MDA-MB231 et 0.8×10^5 cellules/mL pour les MCF-10A dans des boîtes de 60 mm. 6h après leur ensemencement, les cellules sont traitées avec 2 μ M des molécules AIM1 et Ru. Après différents temps d'incubation (24h, 48h, 72h et 96h), les cellules traitées et non traitées sont récupérées par trypsination. Une quantification manuelle du nombre de cellules est réalisée à l'aide d'une cellule de Malassez (Marienfeld-Superior) observée à un grossissement de 40 fois sous un microscope à contraste de phase.

II. 2. Par analyse du cycle cellulaire

Les cellules MCF-10A sontensemencées à raison de 0.8×10^5 cellules dans des boîtes de 60 mm. 3 conditions de traitement ont été réalisées : des cellules ont été prétraitées pendant 24h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, puis ont été laissées en culture dans un milieu sans molécule pendant 48h (condition « AIM »). D'autres cellules ont été laissées en culture pendant

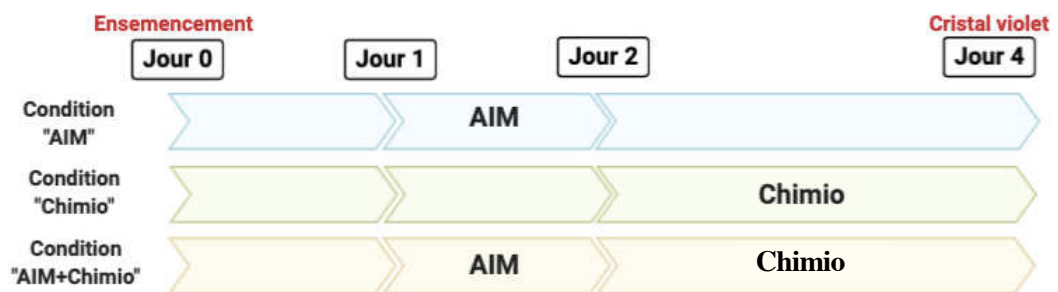


Figure 28. Représentation schématique du protocole d'étude de la synergie d'action entre les molécules AIMs et des agents de chimiothérapie. Les cellules sont ensemencées au jour J0. 24h après l'ensemencement, au jour J1, les cellules des conditions « AIM » et « AIM + Chimiothérapie » sont traitées avec les molécules AIMs pendant 24h, alors que les cellules de la condition « Chimiothérapie » sont laissées dans un milieu de culture sans molécule. Au jour J2, le milieu est remplacé par un milieu contenant les agents de chimiothérapie pour les conditions « Chimiothérapie » et « AIM + Chimiothérapie », et par un milieu sans molécule pour les cellules de la condition « AIM ». 48h après, au jour J4, un marquage des cellules adhérentes a été réalisé par cristal violet.

24h sans traitement, avant d'être mises en présence de 50 ng/mL de Doxorubicine ou 50 μ M de 5-Fluorouracile pendant 48h (condition « Chimiothérapie »). Enfin, des cellules ont été prétraitées pendant 24h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, puis pendant 48h avec 50 ng/mL de Doxorubicine ou 50 μ M de 5-Fluorouracile (condition « AIM + Chimiothérapie »). Le plan expérimental est présenté sur la **Figure 28**.

A la fin des traitements, les cellules flottantes sont récupérées, ainsi que les cellules adhérentes par l'action de la trypsine. Ensuite, l'ensemble des cellules est centrifugé et resuspendu avant comptage à l'aide d'un compteur de cellules automatique (TC20, BioRad). 10^6 cellules sont ensuite prélevées et centrifugées à 500g pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans une solution contenant 30% de D-PBS froid et 70% d'éthanol froid afin de les perméabiliser et de les fixer. Les cellules sont ensuite conservées à -20°C.

Avant analyse, 5×10^5 cellules sont prélevées, lavées et resuspendues dans 500 μ L de DNA staining solution contenant 10 μ L de RNase A et 2 μ L d'iodure de propidium (IP, 50 μ g/mL). Les cellules non marquées sont seulement resuspendues dans 500 μ L de D-PBS et permettent de réaliser les réglages du cytomètre. L'analyse de l'intensité de fluorescence s'effectue à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest. Pour chaque condition, 20 000 cellules sont analysées.

II. 3. Par mesure de l'incorporation de l'EdU

Les cellules MDA-MB231 sontensemencées à raison de 10^5 cellules/mL, et les cellules MCF-10A à raison de 0.4×10^5 cellules/mL dans des plaques 6 puits. 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec 2 μ M d'AIM2/3 pendant 96h. 24h avant la fin des traitements, 10 μ M d'EdU (Click-iT Plus Edu Imaging Kits, MolecularProbes) est ajouté dans chaque puits. Le lendemain, les cellules sont fixées et perméabilisées respectivement par une solution de formaldéhyde 3.7% pendant 15 minutes et une solution de Triton® X-100 pendant 20 minutes. Un cocktail réactionnel est ensuite ajouté dans chaque puits pendant 30 minutes selon les instructions du fabricant. Les noyaux sont visualisés après marquage au Hoescht. La visualisation se fait au microscope à fluorescence (Nikon) équipé d'une caméra pour l'acquisition des images à l'objectif x40. Pour chaque expérience, 100 cellules ont été comptées. Le pourcentage de cellules en prolifération est déterminé par le rapport du nombre de noyaux EdU positifs sur le nombre de noyaux totaux.

III. Étude de la synergie d'action

Les cellules MDA-MB231 et T47D sontensemencées à raison de 10 000 cellules/puits, et les cellules MCF10A à raison de 1 500 cellules/puits dans une plaque 96 puits.

Le même plan expérimental que celui présenté sur la **Figure 28** a été suivi. Ainsi, les cellules des conditions « AIM » ont été traitées 24h avec des doses croissantes des molécules AIMS (0,5/1/2/3/4 μM) puis laissées 48h en absence de traitement. Les cellules des conditions « Chimiothérapie » ont été laissées sans traitement pendant 24h, puis mises en présence de doses croissantes de Doxorubicine (12,5/25/50/75/100 ng/mL), de 5-Fluorouracile (12,5/25/50/75/100 μM) ou de Tamoxifène (1,25/2,5/5/7,5/10 μM). Enfin, les cellules des conditions « AIM + Chimiothérapie » ont été prétraitées pendant 24h avec des doses croissantes d'AIMs avant d'être mises en présence de doses croissantes de Doxorubicine, de 5-Fluorouracile ou de Tamoxifène. A la fin des traitements, les cellules sont lavées avec du D-PBS, avant d'être mises en présence de 0,1% de cristal violet pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les cellules colorées sont lavées 3 fois avec de l'eau distillée et 10% d'acide acétique est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont mises sous agitation jusqu'à la solubilisation totale du cristal violet. La quantité de cellules adhérentes est estimée par une mesure de l'absorbance à 595 nm à l'aide du lecteur de plaque VictorX (PerkinElmer).

Les moyennes des triplicats d'absorbance de chaque dose dans chaque condition (AIM, Chimiothérapie et AIM + Chimiothérapie) ont été normalisées par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules non traitées. Ensuite, les valeurs normalisées ont été rentrées dans le logiciel CompuSyn (<http://www.combosyn.com>) qui se base sur la méthode de Chou-Talalay dérivant de l'équation de l'effet médian (Chou, 2010). Le logiciel fournit des indices de combinaison (ou CI pour Combination Index) reflétant le niveau de synergie entre les molécules AIMS et les agents de chimiothérapie. Ainsi, des $\text{CI} < 1$, $\text{CI} = 1$ et $\text{CI} > 1$ témoignent respectivement d'une synergie d'action entre les différents composés, d'un effet additif et d'un effet antagoniste.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Température d'hybridation	Taille
RT-PCR semi-quantitative				
ERα	5'-CAGGCTACCATTATGGAGT-3'	5'-CCAGGCTGTTCTTCTTAGAG-3'	54°C	342pb
GAPDH	5'-GGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'	5'-GGGATCTCGCTCCTGGAAGA-3'	47°C	245pb
RT-PCR en temps réel				
ERα	5'-CCAGGCTGTTCTTCTTAGAG-3'	5'-CCAGGCTGTTCTTCTTAGAG-3'	54°C	342pb
p21	5'-GCCCCAACGCACCGAATAGTTA-3'	5'-CACGGGTCGGGTGAGAGTG-3'	60°C	136pb
UBB	5'-GCTTTGTTGGGTGAGCTTGT-3'	5'-CGAAGATCTGCATTTTGACCT-3'	60°C	98pb
RPLPO	5'-GAAGGCTGTGGTCTGATGG-3'	5'-CCGGATATGAGGCAGCAGTT-3'	62°C	103pb

Tableau 3. Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR semi-quantitative et en temps réel. Les séquences des amorces sens et anti-sens, ainsi que la température d'hybridation et la taille du produit de PCR sont présentées.

IV. Étude de l'expression génique

IV. 1. Au niveau transcriptionnel

IV. 1. 1. Extraction des ARNs totaux

Après un lavage avec du D-PBS, le culot cellulaire est resuspendu dans un tampon de lyse fourni par le kit (ReliaPrep™ RNA Cell MiniPrep System, Promega) contenant du thioglycérol. Après ajout de 25% d'isopropanol, les lysats de cellules sont transférés sur colonne, et mis en présence de DNaseI pendant 15 minutes à température ambiante. La colonne est ensuite lavée à plusieurs reprises, puis séchée et les ARNs sont finalement élués dans de l'eau ultrapure. Les ARNs sont dosés par spectrophotométrie au Nanodrop à 260 nm. La qualité de l'extraction est appréciée par la mesure de l'absorbance à 280 nm et 230 nm, témoignant respectivement d'une contamination en protéines et en sels. Seuls les extraits présentant des rapports $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ et $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ respectivement supérieurs à 1,8 et 1,7 sont utilisés pour la transcription inverse.

IV. 1. 2. Transcription inverse des ARNs (RT)

La transcription inverse est réalisée à partir d'1 µg d'ARNs à l'aide du kit iScript cDNA Synthetis (Promega). La synthèse des ADN complémentaires (ADNc) se fait dans un thermocycleur et débute par une incubation de 5 minutes à 25°C afin d'activer l'enzyme transcriptase inverse, suivie de 30 minutes à 42°C permettant la synthèse des ADNc, et enfin de 5 minutes à 82°C afin d'inactiver l'enzyme.

IV. 1. 3. Réaction de polymérisation (PCR)

La PCR semi-quantitative se fait dans un volume réactionnel de 25 µL contenant du tampon 10X, 50 mM de MgCl₂, 10 µM d'amorces sens et anti-sens, 10 mM de dNTP, 1 µL d'ADNc et 1,25 unités de polymérase. L'amplification se fait dans un thermocycleur, et débute par une étape de dénaturation de 3 minutes à 95°C, suivi de 28 à 38 cycles (selon le gène à amplifier), chacun constitué d'une première étape de dénaturation de 45 secondes à 95°C, puis d'une étape d'hybridation des amorces de 30 secondes aux températures indiqués dans le **Tableau 3**, et enfin d'une étape d'élongation de 1 minute 30 secondes à 72°C. Après les 28 à 38 cycles, une dernière étape de 10 minutes à 72°C est réalisée. 10 µL de produits de PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 2% dans une solution de TBE contenant 500 ng/mL de bromure

d'éthidium, et subissent une électrophorèse à 100 V pendant 45 minutes. L'intensité des bandes a été évaluée par le logiciel QuantityOne (BioRad). Les valeurs de chaque gène sont rapportées aux valeurs du gène invariant (*GAPDH*).

La PCR en temps réel est réalisée à partir des ADNc dilués au 1 000^{ème} dans 15 µL de mix réactionnel contenant de l'iQTM Green Supermix 2X (Biorad), 300 nM d'amorces sens et anti-sens. Pour chaque couple d'amorces, une gamme standard est réalisée à partir d'ADNc dilués du 1/10^{ème} au 1/10 000^{ème}, et permettant ainsi la détermination de l'efficacité de la réaction de PCR. Les conditions de PCR, et notamment la température d'hybridation pour chaque couple d'amorces (**Tableau 3**) ont été optimisées au préalable de manière à obtenir une efficacité comprise entre 1,9 et 2,1. L'amplification est réalisée selon un protocole débutant par une étape à 95°C pendant 3 minutes, permettant la dénaturation des structures secondaires des ADNc. Cette étape est suivie par 40 cycles, chacun composé d'une première étape de dénaturation de 20 secondes à 95°C, puis d'une étape d'hybridation des amorces pendant 15 secondes à la température optimale préalablement définie, et enfin d'une étape d'élongation à 72°C de 15 secondes. L'amplification est réalisée au sein d'un thermocycleur CFX-96 Touch (Biorad) permettant la mesure de la fluorescence émise par le SYBER Green à la fin de chaque cycle. La spécificité de l'amplification est vérifiée au cours d'une dernière étape permettant d'établir une courbe de fusion. Au cours de cette dernière étape, la température augmente progressivement de 50°C à 95°C et la fluorescence émise est mesurée tous les degrés. L'analyse des données grâce au logiciel CFX Manager (Biorad) est basée sur les Ct (Cycle Threshold) qui correspondent au nombre de cycle à partir duquel la fluorescence dépasse le seuil de détection. Les Ct des gènes d'intérêt sont normalisés par ceux des gènes de référence codant UBB (Ubiquitin B) et RPLPO (Ribosomal Protein Large P0). Brièvement, une des conditions est définie comme calibratrice, et les ΔCt sont calculés en soustrayant le Ct du calibrateur du Ct de l'échantillon. Pour chaque PCR, l'efficacité (E) est élevée à la puissance ΔCt . Les valeurs ainsi obtenues pour les gènes de référence sont moyennées, et permettant de normaliser le $E_{\Delta Ct}$ du gène d'intérêt. Le rapport obtenu pour les cellules définies en tant que calibrateur est fixé à 1, et permet la détermination du niveau d'expression des gènes d'intérêt en fonction de la condition calibratrice.

IV. 2. Au niveau traductionnel

IV. 2. 1. Extraction des protéines totales

Les cellules décollées par l'action de la trypsine sont centrifugées à 200g pendant 5 minutes, puis lavées dans du D-PBS. Elles sont ensuite lysées dans un tampon Tris/HCl 10 mM pH 7,4 contenant 5 mM d'EDTA, 1% de Triton X-100 ainsi qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), pendant 30 minutes sur glace. Après une centrifugation de 5 minutes à 17 000g et à 4°C, le surnageant contenant les protéines totales est récupéré.

Pour les cellules MCF-10A, après comptage, 10^7 cellules/mL sont lysées dans un tampon Laemmli 1X contenant 62,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10% de glycérol, 100 mM de dithiothréitol (DTT) et du bleu de bromophénol pendant 30 minutes sur glace. Le surnageant est ensuite soumis à une sonification à l'aide d'un dispositif de sonde à ultrasons (Branson Sonifier, USA). Les échantillons protéiques sont ensuite conservés à -80°C.

IV. 2. 2. Dosage des protéines

La concentration protéique est déterminée par spectrophotométrie à 595nm selon la méthode de Bradford, à partir d'une gamme étalon correspondant à différentes concentrations de BSA et grâce à une solution commerciale de dosage (Bradford Protein Assay™ BioRad).

IV. 2. 3. Électrophorèse et transfert sur membrane

Les protéines (50 µg) sont dénaturées à 99°C pendant 5 minutes dans un tampon TrisHCl pH 6,8 à 62,5 mM contenant 2% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 0,1 M de dithiothréitol (DTT), 20% de saccharose et du bleu de bromophénol, d'après la méthode de Laemmli. Après dénaturation, les protéines sont déposées sur un gel de concentration contenant 5% de polyacrylamide préparé dans un tampon Tris/HCl 0,25 M pH 6,8 contenant 0,1% de SDS. Les protéines sont ensuite séparées dans un gel de migration contenant 10% de polyacrylamide préparé dans un tampon Tris/HCl 0,375 mM pH 8,8 contenant 0,1% de SDS. La migration est réalisée pendant 1h30 à 110 V. Les protéines séparées par leur poids moléculaire sont ensuite transférées sur une membrane de Nylon PolyvinylDiFluoride (PVDF) en milieu liquide entre deux piles d'éponges et de papiers Whatman imbibés de tampon de transfert (Tris 0,05 M, Glycine 0,348 M, SDS 0,1% et éthanol 20%) pendant 16h à 12 V. Le

Nom	Fournisseur	Référence	Origine animale	Dilution	Taille (kDa)
PARP clivé	BD Biosciences	552596	Souris	1 / 2 000	89
Tubuline	Abcam	ab52866	Lapin	1 / 1 000	50
p21	Cell signaling	8865	Lapin	1 / 1 000	21
Anti-Rabbit IgG Peroxydase	Sigma	A9169	Chèvre	1 / 10 000	/
Anti-Mouse IgG Peroxydase	Sigma	A9044	Lapin	1 / 10 000	/

Tableau 4. Liste des anticorps utilisés au cours des expériences de Western Blot. Le fournisseur, la référence, l'origine animale, la dilution utilisée ainsi que le poids moléculaire des protéines mises en évidence sont également précisés.

dépôt d'un marqueur de poids moléculaire connu et pré-coloré (ThermoFischer) permet la calibration de la membrane.

IV. 2. 4. Détection immunologique

Après transfert des protéines, la membrane est saturée à l'aide d'un tampon de blocage TBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5 contenant 150 mM de NaCl) contenant 5% (poids/volume) de lait écrémé en poudre, pendant 30 minutes à température ambiante et sous agitation. La membrane est ensuite incubée en présence d'anticorps primaires dirigés contre la protéine d'intérêt, et dilués dans un tampon TBS à 2,5% de lait écrémé en poudre. Après 3 lavages de 5 minutes avec une solution de TBS + 0,1% de Tween X-100, la membrane est incubée en présence des anticorps secondaires couplées à la peroxydase durant 45 minutes sous agitation, et dilués au 1/10 000^{ème} dans du TBS contenant 2,5% de lait écrémé en poudre. Cette étape est suivie de 3 lavages de 10 minutes avec du TBS Tween. La liste des anticorps primaires et secondaires, ainsi que leurs dilutions optimales d'utilisation, sont référencées dans le **Tableau 4**. Après les derniers lavages, l'activité peroxydase est révélée par l'ajout d'un substrat chimioluminescent Clarity™ ECL Substrate (Biorad). La révélation est faite à l'aide d'une caméra équipant le ChemiDoc (Biorad). Dans le cas de la détection de protéines avec un poids moléculaire proche, les anticorps sont décrochés après révélation à l'aide d'une solution de « stripping » (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific) durant 15 minutes à température ambiante et sous agitation.

V. Étude de la concentration intracellulaire en Espèces Réactives de l'Oxygène

V. 1. Par la sonde DHE

Les cellules MDA-MB231 sontensemencées à raison de 10⁵ cellules/mL dans des boîtes 100 mm. 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec les molécules AIM1, AIM2, AIM3 et Ru à 2 µM pendant 24h. Des cellules traitées avec 50 ng/mL de Doxorubicine pendant 24h servent de contrôle positif. A la fin des traitements, les cellules sont collectées par trypsination et comptées, avant d'être resuspendues dans du milieu à raison de 1x10⁶ cellules/mL. Une fraction de 500 µL (5x10⁵ cellules) de cette suspension est incubée avec 10 µM de la sonde dihydroéthidium pendant une heure à 37°C dans le noir. Avant analyse, les

cellules sont lavées et resuspendues dans 500 μ L de milieu. L'analyse de l'intensité de fluorescence s'effectue à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest sur 10 000 cellules.

V. 2. Par la sonde MitoSox

Les cellules MDA-MB231 sontensemencées à raison de 10^5 cellules/mL dans des boîtes 100 mm. 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec 2 μ M des molécules AIM1, AIM2, AIM3 et Ru pendant 24h. Le contrôle positif interne de l'expérience correspond à des cellules traitées pendant 24h avec 50 ng/mL de Doxorubicine. A la fin des traitement, 5 μ M de MitoSox (MitoSox™ Red mitochondrial superoxyde indicator, Invitrogen) sont ajoutés au milieu de culture pendant 30 minutes, à 37°C et protégés de la lumière. Après 2 lavages au D-PBS, les cellules sont trypsinées puis comptées pour préparer des solutions de 500 μ L à 10^6 cellules/mL. L'analyse de l'intensité de fluorescence s'effectue à l'aide d'un cytomètre FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest sur 10 000 cellules.

VI. Marquages des cassures doubles brins de l'ADN

Les cellules MDA-MB231 sontensemencées à raison de 2×10^5 cellules/mL pour les conditions non traitées et traitées pendant 24h et 48h, et 4×10^5 cellules/mL pour les conditions traitées pendant 72h, 96h et 120h dans des boîtes 35 mm contenant des lamelles en verre. Les cellules sont ensuite traitées avec 2 μ M d'AIM2 et AIM3, et laisser en culture le temps souhaité (24h, 48h, 72h, 96h, 120h). En guise de contrôle positif, des cellules non traitées ont été irradiées par une dose unique de 2 Greys (photons de 6 MV, débit de 200 UM/min) délivrée au moyen de l'accélérateur linéaire de l'ICL. Les cellules irradiées ont été remises en culture 15 minutes, 3h ou 5h après irradiation. A la fin des traitements, les cellules sont lavées une fois au D-PBS puis fixées à l'aide d'une solution contenant 4% de paraformaldéhyde (PAF) et 2% de sucrose pendant 15 à température ambiante. Une fois toutes les lamelles fixées, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'une solution contenant 300 mM de sucrose, 3 mM de $MgCl_2$, 1 M d'HEPES pH 7, 5 M de NaCl et 0,5% de Triton X-100 pendant 3 minutes à température ambiante. Après un rinçage au D-PBS, les cellules sont mises en contact avec les anticorps dirigés contre la protéine TP53BP1 dilués dans une solution de PBS contenant 3% de BSA (Sérum d'albumine Bovin). L'incubation se fait pendant 1h à 37°C dans une étuve sèche. Ensuite, les cellules sont lavées une fois avec du D-PBS avant l'incubation des anticorps

Nom	Fournisseur	Référence	Origine animale	Dilution
γ -H2AX Phosphorylé (Ser139)	Millipore	05-636	Souris	1 / 800
TP53BP1	Bethyl	A303-906A	Chèvre	1 / 200
Anti-Mouse IgG FITC	Sigma	F2012	Chèvre	1 / 100
Anti-Goat IgG	Invitrogen	A21432	Âne	1 / 400

Tableau 5. *Liste des anticorps utilisés au cours des expériences d'études des lésions de l'ADN. Le fournisseur, la référence, l'origine animale et la dilution utilisée sont également précisés.*

secondaires dilués au 1/800 dans une solution de PBS. Après 20 minutes à l'obscurité dans une étuve sèche, les lamelles sont lavées 5 fois avec du D-PBS. L'anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de la protéine γ -H2AX est ensuite ajouté pendant 1h à l'obscurité à 37°C dans une étuve sèche. Après 3 lavages au D-PBS, l'anticorps secondaire dilué dans du D-PBS est ajouté pendant 20 minutes dans une étuve sèche et protégé de la lumière. A la fin de l'incubation, les lamelles sont rincées 5 fois avec du D-PBS. Le montage est ensuite réalisé en plaçant la lamelle sur une lame avec une goutte de VectaShield® (Vector Laboratories) qui contient du DAPI. Les lamelles sont laissées à sécher une nuit à 4°C à l'obscurité avant d'être visualisées au microscope à fluorescence (Nikon) équipé d'une caméra pour l'acquisition des images. Le nombre de foci de colocalisation γ -H2AX /TP53BP1 a été compté sur 50 noyaux par condition.

Les détails concernant les anticorps, gracieusement prêtés par l'équipe du Dr Henri-Pierre LASALLE du CRAN, sont présentés dans le **Tableau 5**.

VII. Étude de l'activité de la SA- β -Galactosidase

VII. 1. Par cytométrie en flux (sonde C12FDG)

Les cellules MDA-MB231 et MCF-10A sontensemencées à raison de 5×10^4 et 8×10^4 cellules/mL dans des boîtes 100 mm. 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 72h, 96h, 120h. A la fin des traitements, les milieux sont remplacés par des milieux préchauffés contenant 100 nM de bafilomycine A1 (préparée à partir d'une solution mère de 100 μ M diluée dans du DMSO et conservée à -20°C). Après 1h d'incubation à 37°C, 33 μ M de sonde C12FDG est ajouté (à partir d'une solution mère de 20 mM diluée dans du DMSO et conservée à -20°C à l'abri de la lumière) pendant 2h à 37°C. Par la suite, les cellules sont collectées par action de la trypsine. 5×10^5 cellules sont ensuite centrifugées à 200g pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du D-PBS froid, et l'analyse de la fluorescence s'effectue sur 20 000 cellules par le cytomètre en flux FACSCalibur (BD) couplé au logiciel CellQuest.

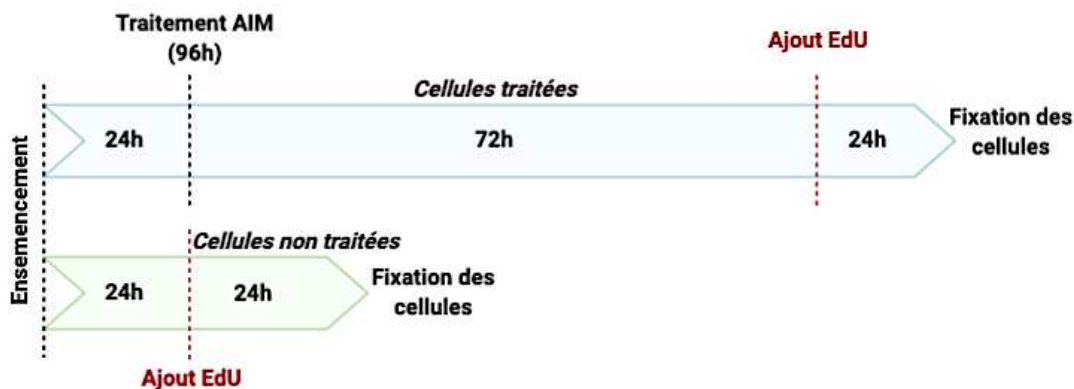


Figure 29. Représentation schématique du protocole d'étude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la sénescence cellulaire. Les cellules non traitées et traitées sont ensemencées au jour J0. 24 après, les cellules « traitées » sont mises en présence de 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 96h. Parallèlement, les cellules « non traitées » sont mises en présence d'EdU. Au jour J2, les boîtes des conditions « non traitées » sont arrêtées. 72h après le début du traitement avec les molécules AIMs, les cellules « traitées » sont mises en présence d'EdU. 24h après, les boîtes des conditions « traitées » sont arrêtées.

VII. 2. Par marquage colorimétrique de la SA- β -Galactosidase

Les cellules MDA-MB231 et MCF-7 sont ensemencées dans des boîtes 35 mm à raison de 10^5 cellules/mL et 5×10^4 cellules/mL pour les conditions non traitées et traitées respectivement. Quant aux cellules MCF-10A non traitées et traitées, elles sont ensemencées respectivement à 1.6×10^5 cellules/mL et 8×10^4 cellules/mL. 24h après ensemencement, les cellules sont traitées avec 2 μ M des molécules AIM2 et AIM3 pendant 96h. Pour éviter la confluence des boîtes non traitées qui pourrait induire un marquage de la SA- β -Galactosidase, les boîtes non traitées sont arrêtées 48h après ensemencement. Le plan expérimental est présenté dans la **Figure 29**. Au bout de 72h pour les boîtes traitées et 24h pour les boîtes non traitées, 10 μ M d'une solution mère à 10 mM d'EdU est ajouté dans le milieu de culture (Clit-iT® Plus EdU Imaging Kits, Molecular Probes, Life Technologies). 24h après l'ajout d'EdU, les cellules sont lavées une fois avec du D-PBS, avant d'être fixées à l'aide d'une solution contenant 25% de glutaraldéhyde fourni dans le kit Cellular Senescence Assay Kit (SA- β -Galactosidase, Cell Biolabs). Après une fixation de 5 minutes à température ambiante, les cellules sont lavées 3 fois avec du D-PBS. Le marquage se fait par incubation de la solution commerciale fournie par le kit à 37°C pendant 16h. Le lendemain, les cellules sont lavées 2 fois avec du D-PBS et le marquage EdU est réalisé selon le protocole décrit dans le **Paragraphe II.3**.

La révélation de la SA- β -Galactosidase se fait grâce à un microscope à contraste de phase au grossissement 40 équipé d'une caméra pour l'acquisition des images. L'EdU est révélé grâce au même microscope, *via* sa fonction fluorescente. Le nombre de cellules positives à la fois pour l'EdU et pour la SA- β -Galactosidase est comptabilisé. Pour chaque expérience, 100 cellules ont été comptées sur différents champs des boîtes.

VIII. Analyses statistiques

Les résultats présentés sont issus d'au moins trois expériences indépendantes. Ils sont représentés par la valeur moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. En fonction des expériences, un test *t* de Student ou un test ANOVA à un facteur est réalisé. Pour chaque test, la valeur de *p* (*p*-value) est calculée et les résultats sont considérés comme significatifs lorsque *p* est

strictement inférieur à 0,05 ($p < 0,05$). Les valeurs significatives sont représentées par des étoiles où * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Partie 2 : Étude *in silico*

I. Analyse du niveau protéique de DDB2 dans différents tissus humains

La comparaison de l'expression de la protéine DDB2 dans différents tissus a été réalisée via l'outil The Human Protein Atlas disponible à l'adresse <http://www.proteinatlas.org/> (Uhlen *et al.*, 2010). Le niveau d'expression est exprimé en « score protéique » basé sur des données immunohistochimiques et prenant en compte l'intensité de marquage (intensité négative, faible, modérée ou forte) et la fraction de cellules marquées (<25%, 25-75% ou >75%). Ensuite, la combinaison de l'intensité et de la fraction est automatiquement convertie en un score d'expression protéique. Par exemple, une intensité forte associée à 25 à 75% de cellules marquées correspond au score « Élevé ». Les scores sont présentés pour 44 tissus regroupés selon leur fonction physiologique.

II. Analyse des altérations du gène codant DDB2

L'outil cBio Cancer Genomic Portal, accessible à l'adresse <http://www.cbioportal.org/> regroupe des données transcriptomiques issus de 80 803 tumeurs de 263 études (Cerami *et al.*, 2012)(Gao *et al.*, 2014). En plus de l'analyse des variations du nombre de copie, du niveau d'expression génique et protéique et du niveau de méthylation, la plateforme donne accès aux altérations génétiques, dont les mutations. Pour notre analyse, les données TCGA PanCancer Atlas Studies comptant 10 967 échantillons issus de 31 études ont été sélectionnées. Avec les paramètres utilisés, la plateforme génère une représentation graphique du pourcentage d'altérations génétiques dans différents cancers. L'option « mutation » donne accès au nombre de mutations de *ddb2* dans le cancer du sein, ainsi que les changements au niveau protéique.

III. Analyse du niveau de transcrits codant DDB2

III. 1. Par Oncomine

La comparaison du niveau d'expression de *ddb2* entre tissus sains et tissus cancéreux a été réalisée *via* les bases de données transcriptomiques de l'outil Oncomine accessible à l'adresse <http://www.oncomine.org/resource/login.html> (Rhodes et al., 2007). Pour l'analyse, les paramètres choisis sont : p-value<0.01, fold-change de 2 et gene ranking in the top de 10%. En termes de statistique, un test *t* de Student a été utilisé.

III. 2. Par BCIP

L'outil BCIP (Breast Cancer Integrative Platform), accessible à l'adresse <http://omicsnet.org/bcancer/> permet la comparaison du niveau d'expression génique entre tissus sains et tissus cancéreux. Cet outil permet également de comparer l'expression de gènes entre tissus cancéreux classés selon leurs sous-types tumoraux, leurs stades pathologiques, leur statut métastatique, leur statut d'invasion ganglionnaire, leur statut ER/PR/HER2, la réponse aux thérapies et le pronostic. Pour la comparaison entre groupes, un test *t* de Student a été réalisé.

III. 3. Par GEPIA

GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis), disponible à l'adresse <http://gepia.cancer-pku.cn/>, est un outil utilisant les données transcriptomiques de TCGA et GTEx pour générer différentes analyses (Tang *et al.*, 2017). Les résultats sont présentés sous forme de dot plot ou de box plot. Pour notre analyse, des box plot représentant le niveau d'expression de *ddb2* dans les tissus mammaires sains et cancéreux ont été générés en utilisant les bases de données TCGA et avec les paramètres suivants : fold-change de 2 et p-value de 0,05. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à un facteur.

IV. Étude de la survie selon l'expression de *ddb2*

IV. 1. Par BCIP

La plateforme permet également l'analyse de la survie en fonction du niveau d'expression de *ddb2*, incluant la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans

métastase. Pour déterminer les différences statistiques, le site utilise le test de log-rank et génère automatiquement des graphes de Kaplan-Meier. Les Hazard Ratio (HR) ont été calculés en utilisant le modèle de régression de Cox.

IV. 2. Par PrognoScan

Cet outil, accessible à l'adresse <http://dna00.bio.kyutech.ac.jp/PrognoScan/index.html>, donne accès à des informations concernant la relation entre le niveau d'expression d'un gène et le pronostic des patients, incluant la survie globale, la survie sans récurrence et la survie sans métastase (Mizuno *et al.*, 2009). Pour notre analyse, le seuil de significativité a été ajusté à 0.05.

IV. 3. Par Kaplan-Meier Plotter

Ce site, accessible à l'adresse <http://kmplot.com/analysis/>, est capable de fournir des informations quant à l'impact d'environ 54 000 gènes sur la survie des patients dans 21 types de cancers différents (Nagy *et al.*, 2018). La plus grosse base de données concerne le cancer du sein avec 6 234 échantillons disponibles. Les critères d'inclusion et d'exclusion dans l'analyse des patients peuvent se baser sur le statut ER/PR/HER2, le statut d'invasion des ganglions, le statut TP53, le type de traitement reçu (endocrine, chimiothérapie conventionnelle). Pour l'analyse, des cohortes de patients ayant reçu des agents de chimiothérapie, mais pas de thérapie endocrine ont été sélectionnées dans le but de ne pas complexifier l'interprétation des résultats. Avec ces paramètres, la survie globale et la survie sans récurrence des patients selon le niveau d'expression de *ddb2* a été évaluée sur 631 et 3 951 patients respectivement. La plateforme calcule automatiquement les p-value et les Hazard Ratio.

IV. 4. Par SurvExpress

Cet outil (<http://bioinformatica.mty.itesm.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp>) permet non seulement de corréliser l'expression génique à la survie des patients, mais également l'expression génique à différents risques (risque de ne pas survivre, risque de développer des métastases, risque de récidiver). Pour l'étude, le risque de récurrence a été choisi. Ce risque est estimé par un score, encore appelé Indice Pronostic (IP). Brièvement, cet IP correspond à la composante linéaire du modèle de Cox. La plateforme génère automatiquement des groupes de risque en séparant au niveau de la médiane les IP classés du plus faible au plus élevé. Ensuite, les résultats sont présentés sous la forme d'un graphe Kaplan-Meier par groupe de risque et

d'un box plot comparant la différence d'expression génique entre les groupes de risques *via* le test *t* de Student. Le but du graphe Kaplan-Meier pour les groupes de risque est de prouver qu'il y a une différence statistique de survie entre les groupes à haut risque et à faible risque. Cette différence est estimée par un test log-rank, le Hazard Ratio et les indices de concordance qui estiment la probabilité qu'un patient du groupe à haut risque récidive après un patient du groupe à faible risque. Pour l'analyse, la base de données contenant le plus d'échantillons, The Breast Cancer Recurrence (1 574 échantillons), a été sélectionné.

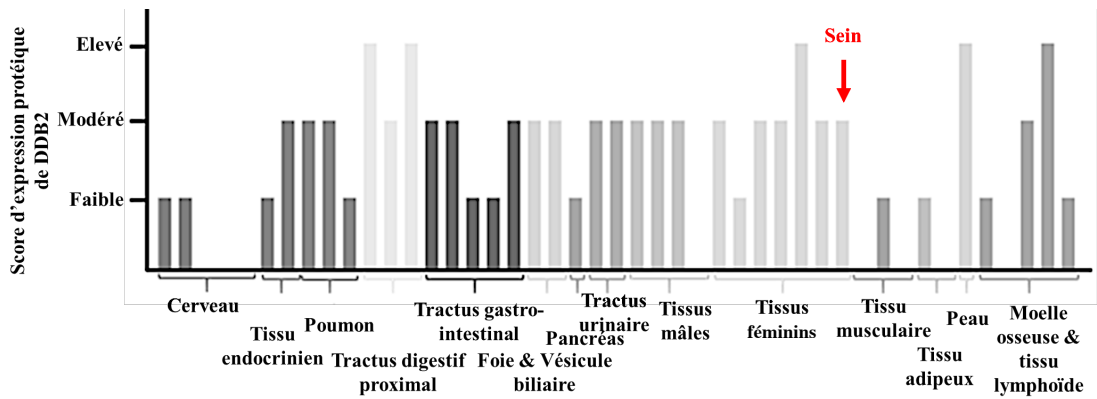


Figure 30. Niveau d'expression de la protéine DDB2 dans différents tissus humains. Le score d'expression protéique de DDB2 (faible, modéré et élevé) est présenté dans 44 tissus humain regroupés selon leur fonction physiologique (D'après The Human Protein Atlas). Le tissu mammaire est indiqué par une flèche rouge.

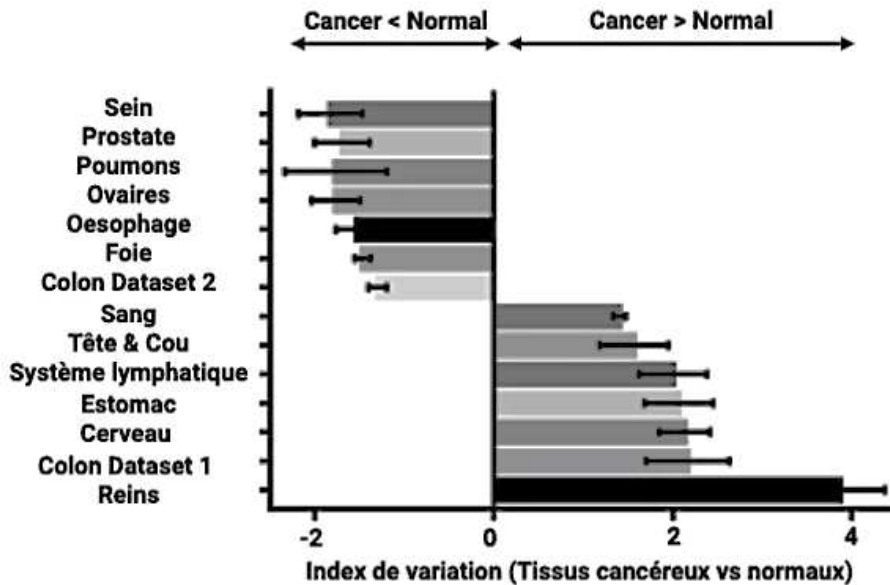


Figure 31. Comparaison du taux d'ARNm codant DDB2 entre différents tissus sains et cancéreux. La base de données Oncomine a été utilisée pour déterminer le niveau de variation du taux de transcrits de ddb2 entre différents tissus normaux et leur équivalent cancéreux.

Résultats

I. Validation du potentiel prédictif de DDB2 dans le cancer du sein par une étude *in silico*

Les travaux *in vitro* menés au laboratoire avaient mis en avant la potentielle utilisation du gène codant la protéine DDB2 comme marqueur de la progression métastatique et de la réponse des tumeurs mammaires à la chimiothérapie conventionnelle. Pour confirmer ces résultats, une étude *in silico* de différentes bases de données transcriptomiques a été réalisée.

I. 1. Analyse de l'expression de DDB2 dans des tissus humains sains

Dans un premier temps, le niveau d'expression de la protéine DDB2 a été étudié dans différents tissus humains sains grâce à la base de données The Human Protein Atlas (**Figure 30**). Les résultats indiquent que la protéine DDB2 est fortement exprimée dans les tissus du tractus digestif proximal, dans les tissus utérins, au niveau des tissus cutanés, de la moelle osseuse et du tissu lymphoïde. Au niveau des tissus cutanés, cette expression est corrélée avec le rôle majeur de DDB2 dans la réparation des lésions de l'ADN induites par les UVs (Stoyanova *et al.*, 2009). Au niveau des tissus mammaires, l'expression de DDB2 reste modérée comparativement aux autres tissus.

I. 2. Comparaison du niveau d'expression de *ddb2* entre tissus sains et tissus cancéreux

La comparaison du taux de transcrits codant DDB2 entre tissus sains et tissus cancéreux a été réalisée grâce à la plateforme Oncomine. Pour cette analyse, seuls les jeux de données répondant aux critères suivants ont été sélectionnés : p -value inférieure à 10^{-6} et un gene rank dans le top 10 (le gene rank correspond à une classification selon la p -value des gènes : ainsi, un gène dans le top 10 présente une des 10 p -value les plus faibles des études sélectionnées). Parmi les 14 tissus présentés, une surexpression de *ddb2* a été observée dans 7 tissus cancéreux par rapport à leur équivalent sain (sang, tête & cou, système lymphatique, estomac, cerveau, colon et reins) (**Figure 31**). Concernant le tissu colorectal, de manière surprenante, un autre jeu de données suggère plutôt que le gène est sous-exprimé dans les tumeurs par rapport aux tissus

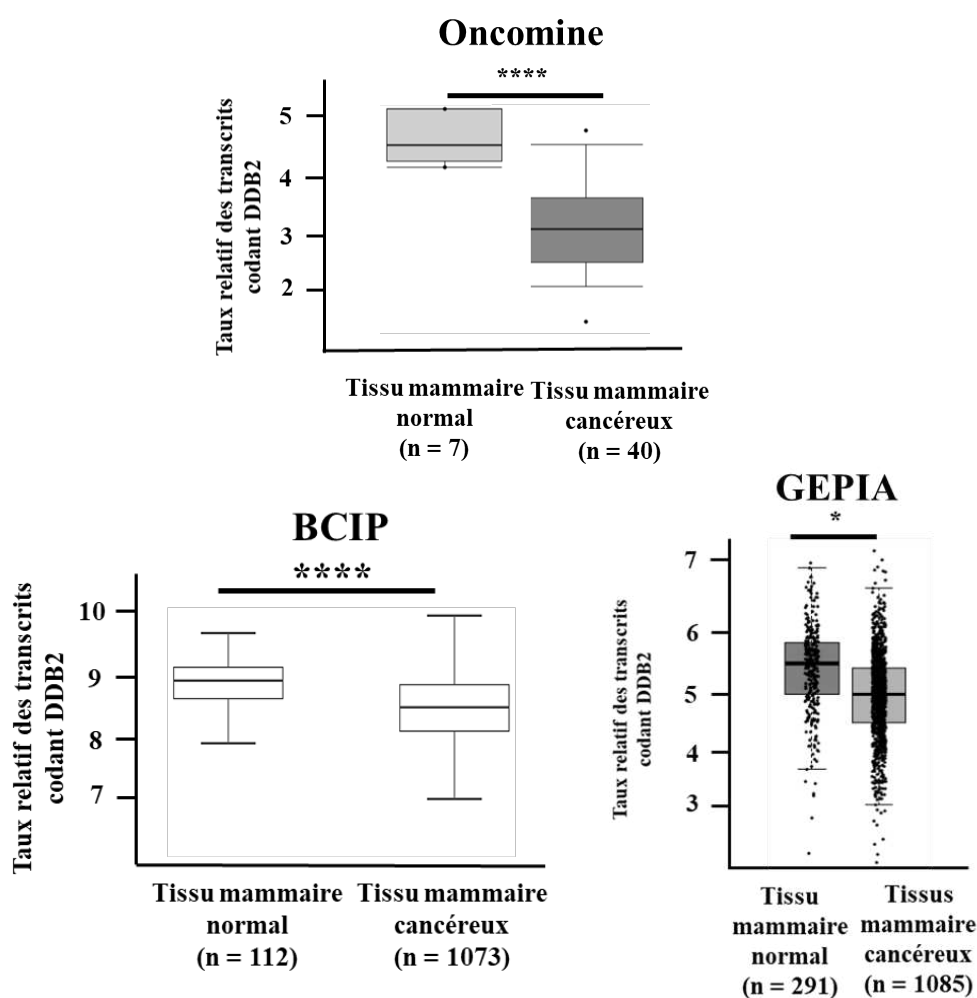


Figure 32. Comparaison du taux de transcrits codant DDB2 entre tissus mammaires sains et cancéreux. Les outils bio-informatiques utilisés (BCIP, GEPIA et Oncomine), ainsi que le nombre d'échantillons inclus dans les groupes « tissu mammaire normal » et « tissu mammaire cancéreux » sont indiqués. Les résultats sont exprimés sous la forme de boîtes à moustache résumant la médiane, les quartiles et les minimum/maximum des valeurs. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$ (Test de Student).

sains. Ces données concernant les tissus colorectaux indiquent donc que le taux de transcrits de *ddb2* varie selon les études. Quant au tissu mammaire, l'expression du gène *ddb2* est inférieure dans les tissus cancéreux pas rapport aux tissus sains.

Dans le but de renforcer l'observation d'une faible expression de *ddb2* dans les tissus mammaires cancéreux par rapport aux tissus sains, une autre cohorte de la plateforme Oncomine a été analysée, et les résultats obtenus permettent de confirmer que l'expression transcriptionnelle de *ddb2* est significativement diminuée dans les tumeurs mammaires de cette étude (**Figure 32**). Enfin, l'utilisation de 2 autres plateformes (BCIP et GEPIA) nous ont également permis de confirmer ces résultats (**Figure 32**).

Ces variations d'expression entre tissus sains et tissus cancéreux pouvant potentiellement être dues à des altérations génétiques du gène au cours de la tumorigenèse, le statut mutationnel de *ddb2* a été étudié dans 10 967 échantillons provenant de 32 études répertoriées par la plateforme cBioPortal. Les résultats de cette analyse montrent que le gène est altéré dans 119 échantillons des 10 9657 échantillons étudiés, correspondant à une fréquence d'environ 1% (**Figure 33**). Ces altérations sont retrouvées majoritairement dans les cholangiocarcinomes (cancer des voies biliaires) avec une fréquence d'altérations de 6%. Le cancer du sein se caractérise par des altérations génétiques d'une fréquence plus faible (0,92%), comprenant des mutations dans 0,28% des cas, des amplifications (0,55% des cas) et des délétions (0,09% des cas). Dans le cancer du sein, 5 mutations ont été retrouvées : 3 mutations faux-sens, 1 mutation au niveau d'un site d'épissage des ARNm et 1 mutation entraînant un décalage du cadre de lecture. Seule 1 des 3 mutations faux-sens touchent un domaine WD40 de la protéine, impliqué dans la reconnaissance des lésions de l'ADN et dans l'interaction avec les partenaires protéiques de DDB2 (**Figure 3**). Ces données suggèrent donc que le gène *ddb2* ne subit que très peu d'altérations géniques au cours de la tumorigenèse mammaire.

I. 3. Analyse de l'expression de *ddb2* dans le cancer du sein

Dans le but de mieux comprendre l'importance de la protéine DDB2 dans la tumorigenèse mammaire et sur la base des résultats du laboratoire, une analyse du niveau des transcrits de *ddb2* dans différents sous-types de tumeurs mammaires a été réalisée.

Dans un premier temps, la corrélation entre le statut ER/PR/HER2 (les 3 biomarqueurs utilisés classiquement dans la prise en charge du cancer du sein) et le niveau d'expression de *ddb2* a été analysée. Les données de transcriptome provenant de la plateforme BCIP révèlent que 879 tumeurs exprimant ces trois marqueurs, et dites non-TNBC pour « non-triple negative

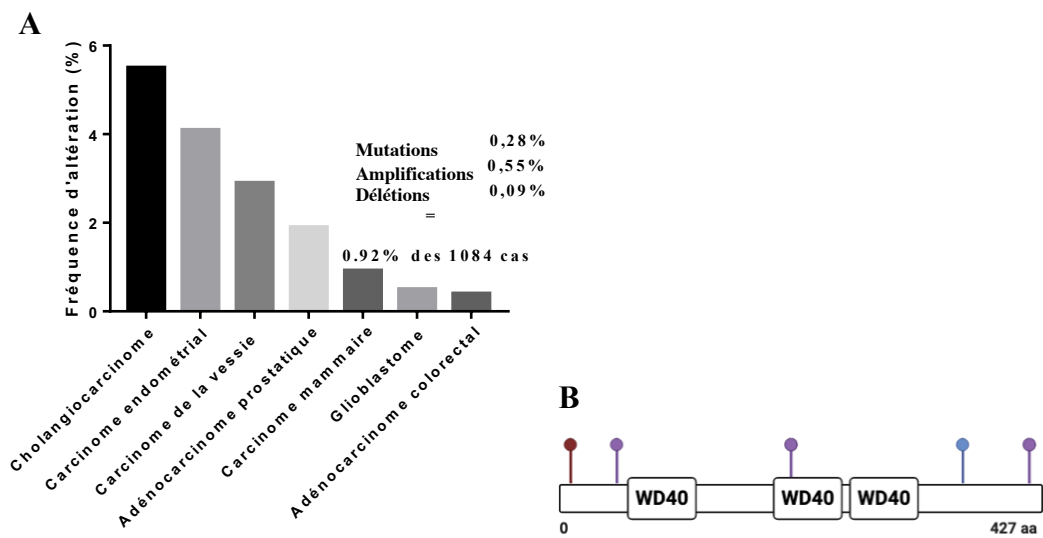


Figure 33. Fréquences des altérations génétiques du gène *ddb2* dans différents cancers. (A) L'outil *cBioPortal* a été utilisé pour générer le graphique représentant le taux moyen d'altérations génétiques dans certaines tumeurs. Pour le carcinome mammaire, la fréquence de répartition des différentes altérations (mutations, amplifications et délétions) est précisée. (B) Les 3 mutations faux-sens (violet), la mutation du site d'épissage (rouge) et la mutation par décalage du cadre de lecture (bleu) du gène *ddb2* sont représentées, ainsi que les domaines WD40.

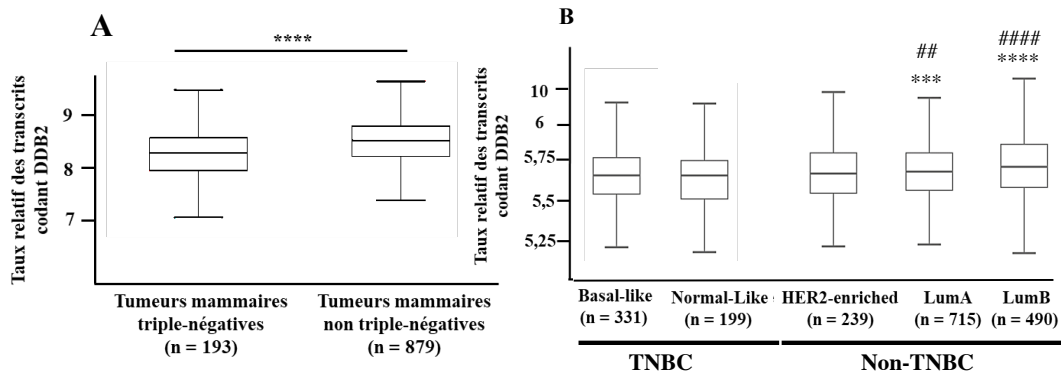


Figure 34. Comparaison du niveau d'expression de *ddb2* dans des tumeurs mammaires selon leur signature moléculaire. L'outil *BCIP* a permis la comparaison du niveau d'expression du gène *ddb2* entre différentes tumeurs mammaires classées selon (A) leur statut triple-négatif (**** $p < 0,0001$ Test de Student) ; (B) leur grade histologique (* : test réalisé par rapport à Basal-Like / # : test réalisé par rapport à Normal-Like, ## $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ****/##### $p < 0,0001$ Test de Student). Les résultats sont exprimés sous la forme de boîtes à moustache résumant la médiane, les quartiles et les minimum/maximum des valeurs.

breast cancer », présentent un taux de transcrits codant DDB2 significativement plus élevé que 193 tumeurs n'exprimant pas ces marqueurs, et dites TNBC pour « triple negative breast cancer » (**Figure 34A**).

Les tumeurs mammaires non TNBC contiennent 3 sous-types, dénommés HER2-enriched, Luminal A et Luminal B, et les tumeurs TNBC rassemblent 2 sous-types, appelés Basal-Like et Normal-Like. Le niveau d'expression de *ddb2* dans ces 5 sous-types de tumeurs mammaires a été étudié toujours à l'aide de l'outil BCIP, mais dans des échantillons différents par rapport aux échantillons utilisés précédemment qui n'étaient classés qu'en fonction de leur statut « Triple négatif ». Ces nouveaux échantillons permettent de vérifier que le niveau des transcrits est inférieur dans les tumeurs TNBC Basal-like et Normal-Like, par rapport aux tumeurs non-TNBC Luminal A et Luminal B (**Figure 34B**). Enfin, aucune différence statistique du niveau de transcrits codant DDB2 n'est observée entre les tumeurs HER2-enriched (non-TNBC) et les tumeurs Basal-Like ou Normal-Like (TNBC). Il est à noter que parmi les 3 sous-types non-TNBC, les tumeurs HER2-enriched sont les plus agressives, expliquant leur plus mauvais pronostic par rapport aux tumeurs Luminal A et B (Kondov *et al.*, 2018).

Par la suite, la corrélation entre le niveau d'expression de *ddb2* et le grade histologique, ainsi que le stade pathologique des tumeurs mammaires, qui traduisent respectivement l'agressivité et l'extension de la tumeur, a été analysée. Une forte expression du gène *ddb2* est retrouvée dans les tumeurs de grade 1 (taux d'expression de *ddb2* de 6,52) (**Figure 35A**) et dans des tumeurs mammaires de stade I (taux d'expression de *ddb2* de 5,76) (**Figure 35B**). L'expression de *ddb2* diminue de manière significative dans les tumeurs de grades histologiques élevés avec une valeur d'expression du gène de 6,48 et 6,16 respectivement pour les tumeurs de grade 2 et 3. Cette diminution significative de l'expression du gène est également retrouvée dans les tumeurs de stades pathologiques élevés avec un taux moyen d'expression du gène de 5,72 et 5,62 respectivement pour les tumeurs de stade II et IV.

Ces observations indiquent une corrélation inverse entre le niveau de transcrits de *ddb2* et l'agressivité des tumeurs mammaires, ainsi qu'une expression plus faible dans les tumeurs triples négatives comparées aux autres tumeurs mammaires.

I. 4. Comparaison de l'expression de *ddb2* selon le pronostic des tumeurs mammaires

Les tumeurs mammaires de hauts grades histologiques et/ou de hauts stades pathologiques sont très largement de mauvais pronostic. Au vu de la diminution de l'expression

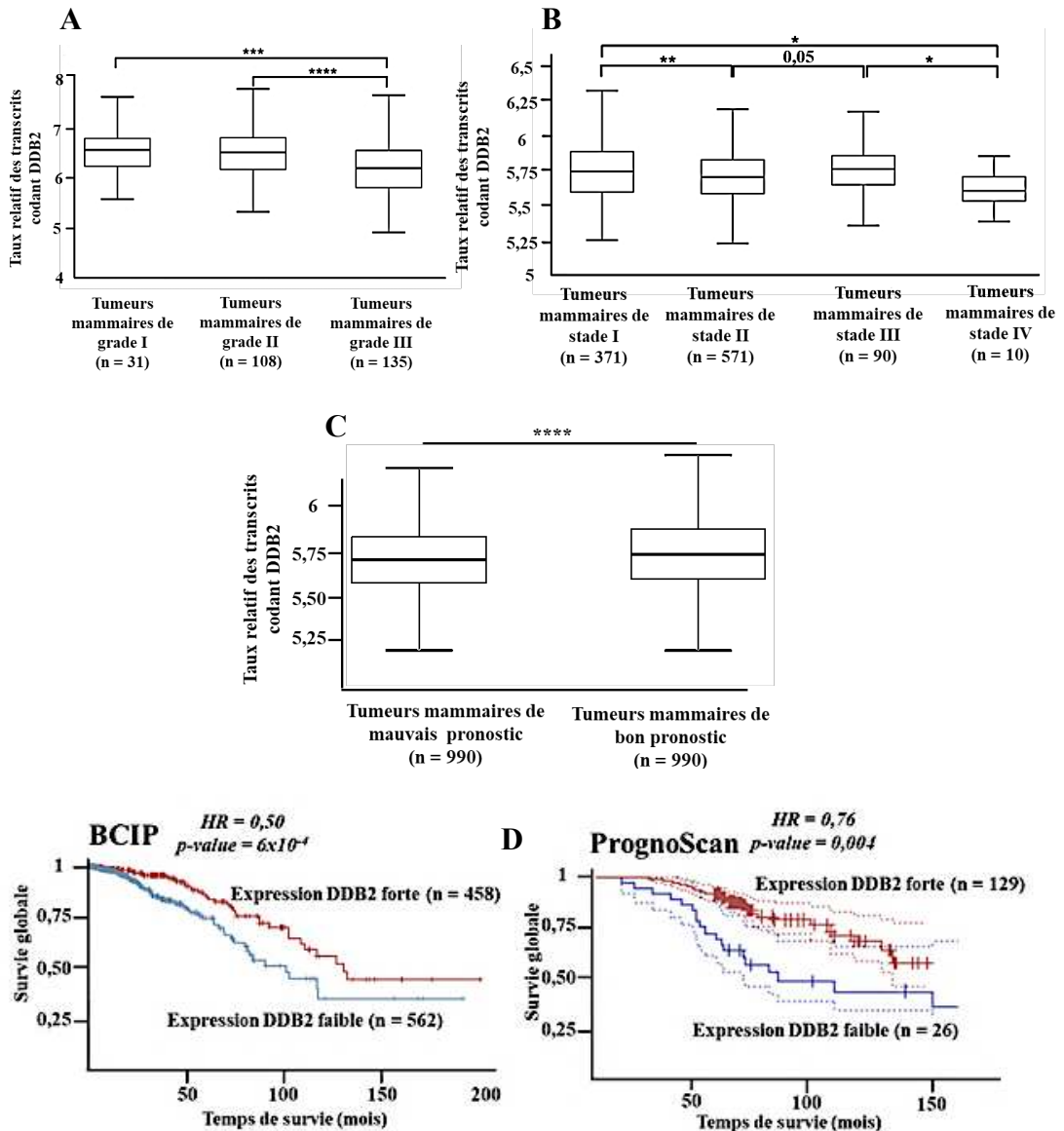


Figure 35. Comparaison du niveau d'expression de *ddb2* dans des tumeurs mammaires en fonction de l'agressivité et du pronostic. La base de données BCIP a été utilisée pour déterminer la corrélation entre le niveau d'expression du gène *ddb2* et (A) le grade histologique, (B) le stade pathologique, et (C) le pronostic des tumeurs mammaires. Les résultats sont exprimés sous la forme de boîtes à moustache résumant la médiane, les quartiles et les minimum/maximum des valeurs. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ (Test de Student). (D) La survie globale des patientes selon le niveau d'expression du gène codant DDB2 au sein des tumeurs mammaires (faible ou forte) a également été extraite des bases de données BCIP (gauche) et PrognScan (droite). Les Hazard Ratio (HR) et les p-value sont également présentés

de *ddb2* dans les tumeurs de hauts grades et stades, la suite du travail a été de voir si l'expression du gène pouvait être un indicateur du pronostic des tumeurs mammaires. Pour cela, l'expression de *ddb2* a été comparée entre 990 tumeurs mammaires de bon pronostic et 990 tumeurs de mauvais pronostic (**Figure 35C**). En accord avec la corrélation entre le taux d'ARNm codant DDB2 et l'agressivité des tumeurs, le gène est surexprimé de manière significative dans les tumeurs de bon pronostic (valeur moyenne d'expression de 5,72) par rapport aux tumeurs de mauvais pronostic (expression moyenne de 5,69). De plus, une forte expression de *ddb2* est associée à une meilleure survie globale de patientes atteintes de cancer du **sein** (**Figure 35D**). Plus précisément, la survie à 150 mois de patientes atteintes de tumeurs mammaires est de 50% et 30% respectivement dans le cas de tumeurs exprimant fortement et faiblement *ddb2*. L'expression de *ddb2* corrèle donc avec le pronostic des tumeurs mammaires. Ces données sont en accord avec les données de comparaison des sous-types tumoraux précédemment présentées (**Figures 34A & B**). En effet, les tumeurs mammaires TNBC (Normal-Like et Basal-Like), les plus agressives et associées à un mauvais pronostic, sont caractérisées par une plus faible expression de *ddb2* par rapport aux tumeurs non-TNBC (Luminal A et B), qui sont de meilleur pronostic. Enfin, les tumeurs non-TNBC HER2-enriched, qui présentent un plus mauvais pronostic par rapport aux tumeurs Luminal A et B, sont caractérisées par un taux de transcrits codant DDB2 similaire à celui observé dans les tumeurs TNBC. L'ensemble de ces résultats permettent d'affirmer que l'expression du gène codant DDB2 est un indicateur du pronostic des tumeurs mammaires.

La survie globale peut être impactée notamment par la réponse des tumeurs aux traitements, par le risque de récurrence après traitement, et par la dissémination métastatique. La suite du travail a par conséquent été d'étudier le lien entre DDB2 et ces trois paramètres.

*I. 4. 1. Validation du potentiel prédictif de l'expression de *ddb2* lors de la progression métastatique des tumeurs mammaires*

Dans un premier temps, le taux des transcrits codant DDB2 a été comparé entre 2 cohortes de tumeurs mammaires qui diffèrent par leur statut métastatique. De manière intéressante, *ddb2* est surexprimée de manière significative dans 97 tumeurs mammaires non métastatiques (expression relative de 7,8) comparées à 14 tumeurs métastatiques qui présentent une expression relative du gène de 7,4 (**Figure 36A**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment concernant le stade pathologique qui traduit l'extension tumorale : en effet, une forte expression du gène n'a été observée que dans les tumeurs mammaires de faibles

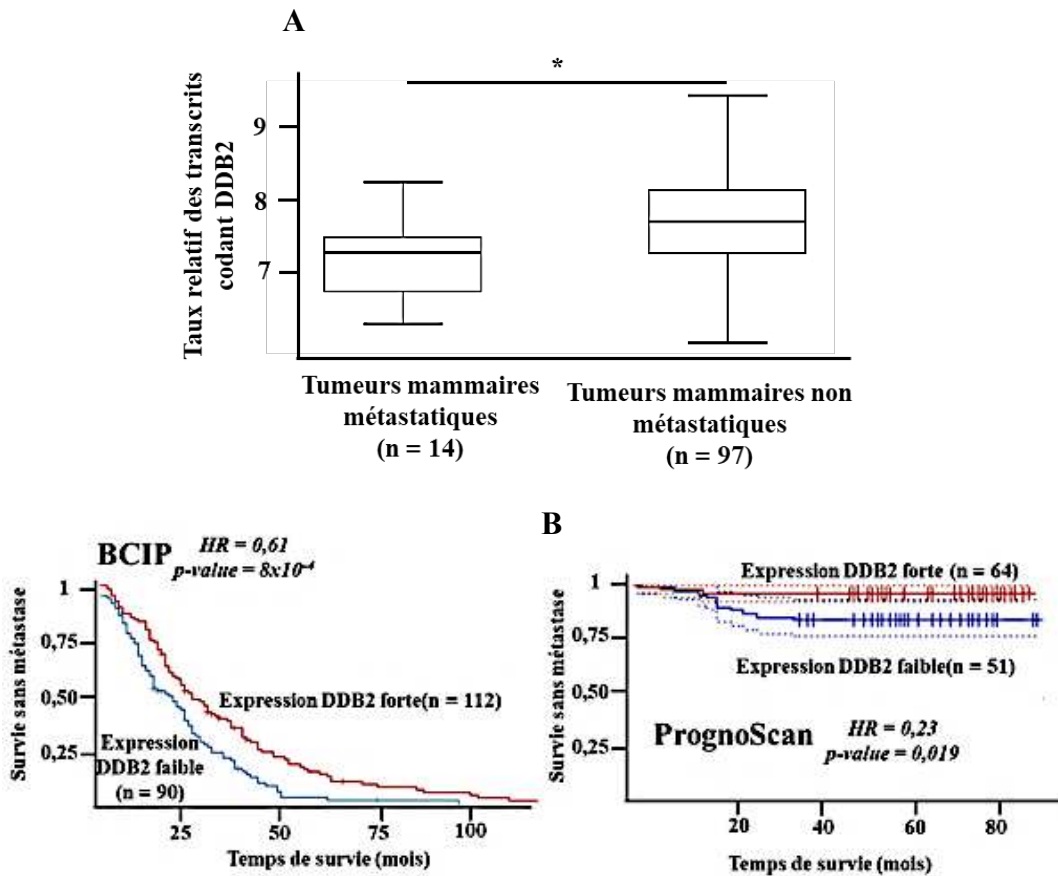


Figure 36. Comparaison du niveau d'expression de ddb2 selon le statut métastatique des tumeurs mammaires. (A) Le niveau d'expression du gène ddb2 a été comparé via la plateforme BCIP entre deux cohortes de tumeurs mammaires qui diffèrent par leur statut métastatique (Les résultats sont exprimés sous la forme de boîtes à moustache résumant la médiane, les quartiles et les minimum/maximum des valeurs) * $p < 0,05$ (Test de Student). (B) La survie sans métastase des patients selon leur niveau d'expression du gène codant DDB2 (faible ou forte) a également été extraite des bases de données BCIP (gauche) et PrognScan (droite). Les Hazard Ratio (HR) et les p-value sont également présentés.

stades, qui se caractérisent par l'absence de métastases, alors que l'expression du gène diminue dans les tumeurs de hauts stades, qui sont métastatiques. En accord avec ces résultats, l'analyse de la survie sans métastase montre que les patientes dont les tumeurs mammaires expriment fortement *ddb2* vivent significativement plus longtemps sans métastase comparées aux patientes dont les tumeurs ont un taux plus faible de transcrits (**Figure 36B**).

*I. 4. 2. Validation du potentiel prédictif de *ddb2* dans la réponse thérapeutique des tumeurs mammaires*

Dans le cadre du traitement du cancer du sein, la chimiothérapie est le plus souvent administrée à la suite d'une chirurgie. C'est pourquoi l'analyse *in silico* s'est portée sur l'impact de l'expression de *ddb2* sur la réponse des tumeurs mammaires à la chimiothérapie adjuvante. 2 bases de données ont été utilisées : la base BCIP et la base Kaplan-Meier Plotter. Notre analyse a permis de mettre en évidence que la survie globale de patientes traitées par thérapie adjuvante est significativement augmentée dans des tumeurs présentant des taux élevés de transcrits codant DDB2 (**Figure 37A**).

*I. 4. 3. Validation du potentiel prédictif de *ddb2* lors de l'apparition de récurrences*

De manière intéressante, l'expression de *ddb2* n'est pas seulement importante au moment du traitement, mais permet également de diminuer le risque de récurrence après traitement. En effet, une forte expression du gène est associée à une survie sans récurrence prolongée d'après les plateformes BCIP et Kaplan Meier Plotter (**Figure 37B**). La probabilité de récurrence peut être estimée par un « indice de pronostic » généré par l'outil SurvExpress. En se basant sur cet indice, les patientes peuvent être séparées en 2 groupes : un groupe à « haut risque de récurrence » et un groupe à « faible risque de récurrence ». Afin de valider la corrélation entre le risque de récurrence de chaque groupe et la survie, le site génère automatiquement un graphique Kaplan Meier où la survie globale des deux groupes est présentée (**Figure 38A**). Les patientes atteintes de cancer du sein du groupe « à faible risque » vivent significativement plus longtemps que les patientes du groupe à « haut risque de récurrence ». Après cette vérification, l'expression du gène a été analysée dans les deux groupes. Le groupe à « haut risque de récurrence » est associé à une expression plus faible de *ddb2* par rapport au groupe à « faible risque de récurrence » (**Figure 38B**).

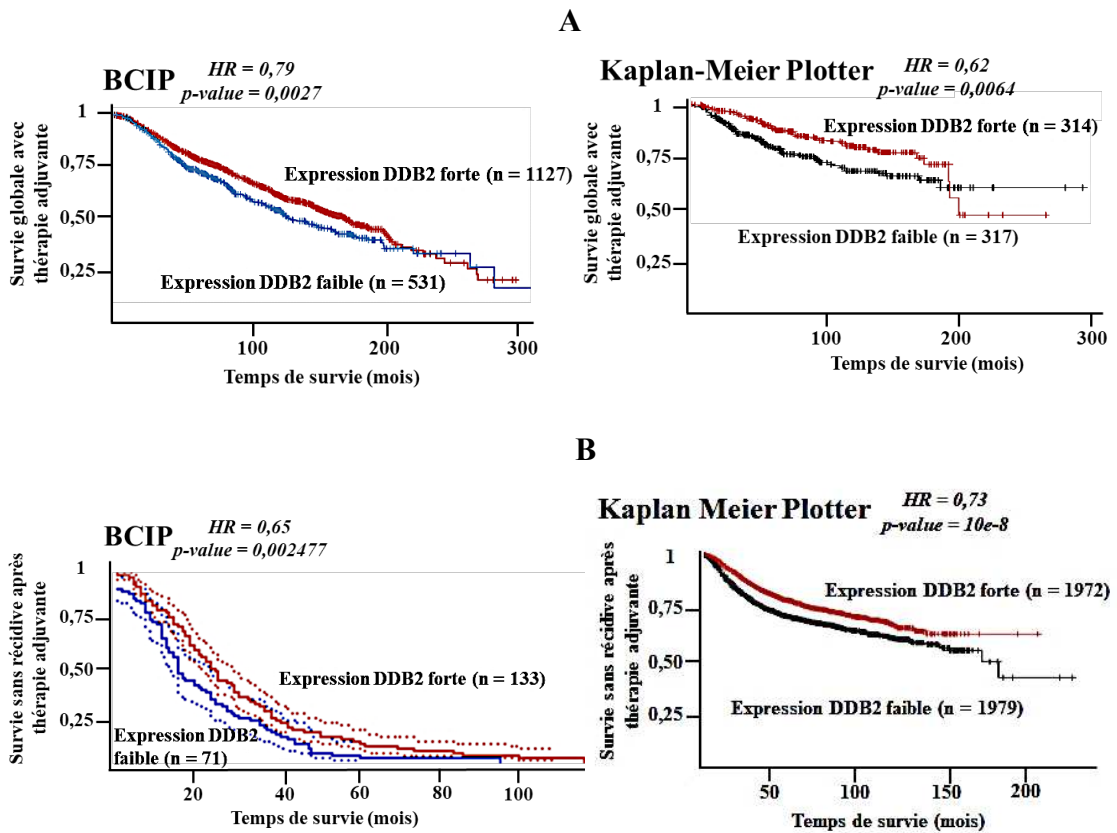


Figure 37. Comparaison de la survie globale avec thérapie adjuvante et de la survie sans récurrence après thérapie adjuvante de patientes atteintes de tumeurs mammaires selon le niveau d'expression de ddb2. **(A)** La survie globale avec thérapie adjuvante de patientes atteintes de carcinomes mammaires classés selon le niveau d'expression du gène codant DDB2 (faible ou forte expression) a été déterminée grâce aux plateformes BCIP (gauche) et Kaplan Meier Plotter (droite). **(B)** La corrélation entre le niveau d'expression des transcrits codant DDB2 et la survie sans récurrence après thérapie adjuvante chez des patientes atteintes de cancer du sein a été établie grâce aux plateformes BCIP (gauche) et Kaplan Meier Plotter (droite). Les Hazard Ratio (HR) et les p-value sont également présentés.

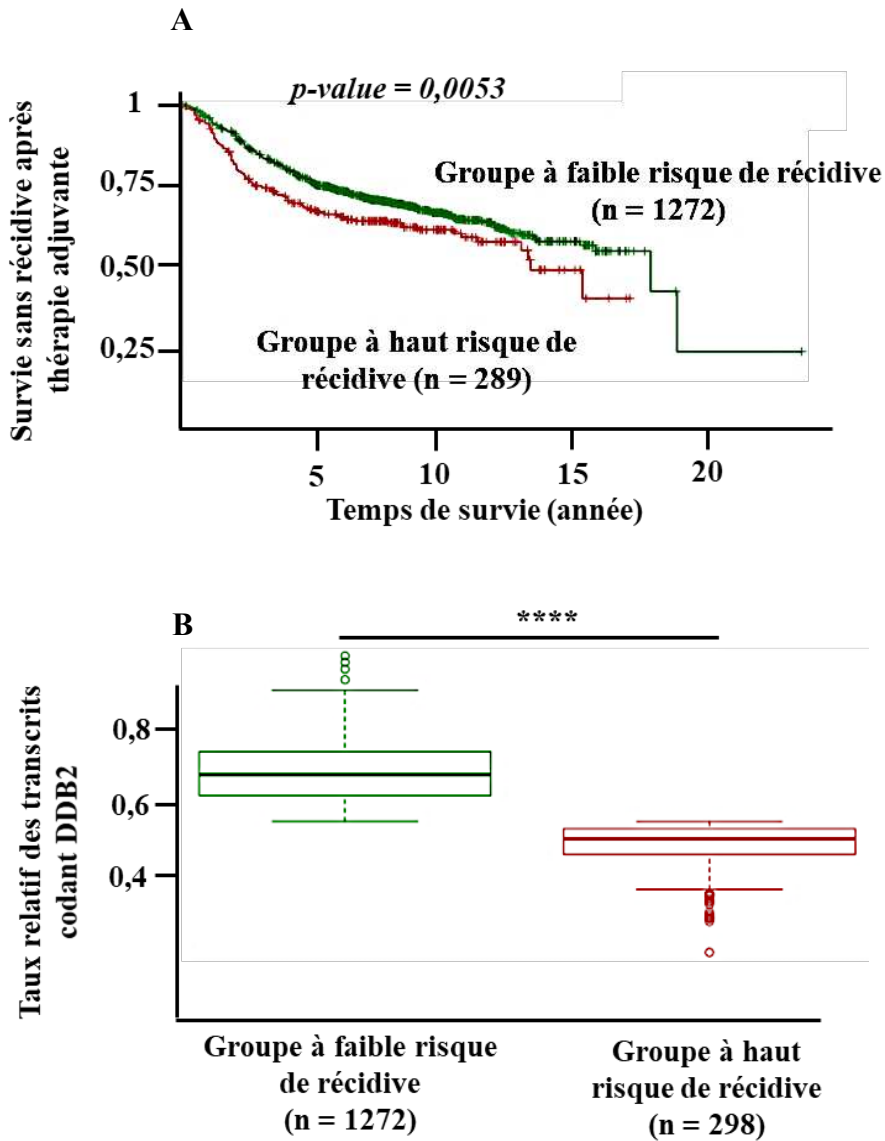


Figure 38. *Corrélation entre le niveau d'expression de ddb2 et le risque de récurrence des tumeurs mammaires traitées par thérapie adjuvante. (A) La survie sans récurrence de patientes atteintes de cancers du sein classés selon leur risque de récurrence (faible ou haut risque de récurrence) a été déterminée via la plateforme SurvExpress. (B) Le niveau d'expression du gène codant DDB2 a été comparé dans les groupes de tumeurs mammaires à haut et à faible risque de récurrence. Les résultats sont exprimés sous la forme de boîtes à moustache résumant la médiane, les quartiles et les minimum/maximum des valeurs. **** $p < 0,0001$ (Test de Student).*

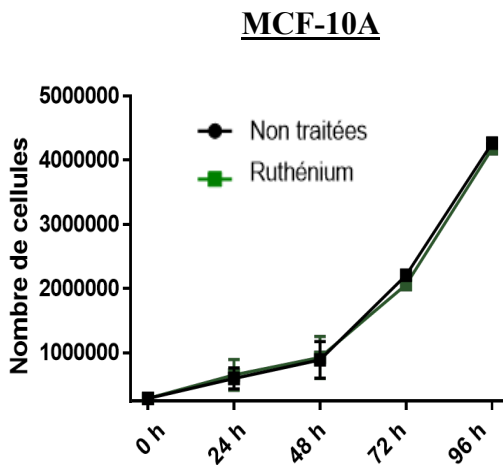
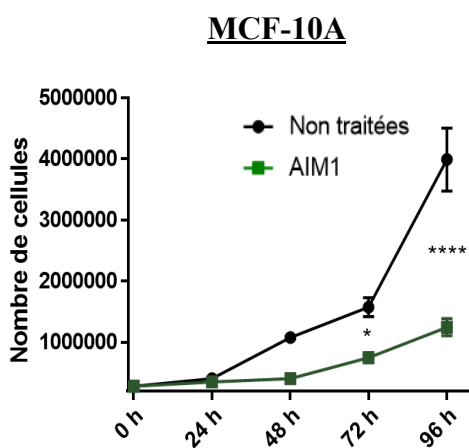
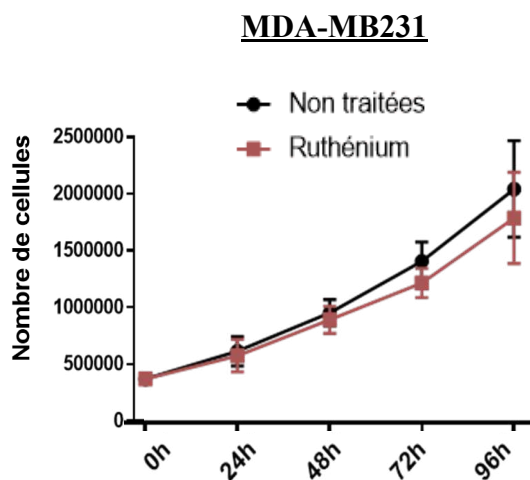
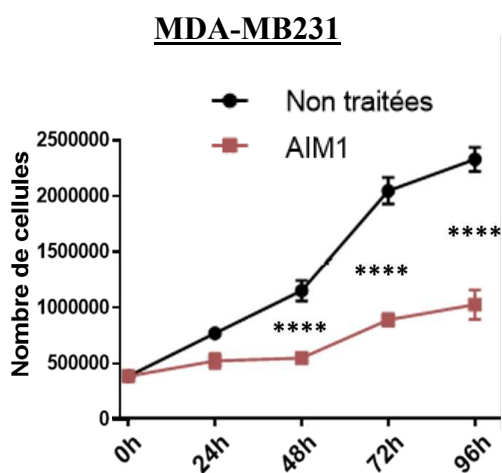


Figure 39. Etude de l'effet des molécules AIM1 et Ru sur la prolifération des cellules MDA-MB231 et MCF-10A. 24h après ensemencement (correspondant au temps 0h), les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM1 ou de Ru pendant 24h, 48h, 72h et 96h. Toutes les 24h, les cellules non traitées et traitées sont collectées, et le nombre de cellules est déterminé par l'utilisation d'une cellule de Malassez. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Ces analyses permettent donc de démontrer que DDB2 pourrait être un marqueur prédictif intéressant du risque de récurrence après thérapie.

II. Étude des mécanismes à l'origine de l'effet cytostatique d'AIM2 et AIM3 dans des lignées mammaires

II. 1. Étude des relations structures/fonctions antiprolifératives des complexes organométalliques à base de Fer

Comme cité précédemment, les complexes AIM2 et AIM3 induisent un arrêt total de la prolifération cellulaire de différentes lignées mammaires. D'un point de vue structurale, ces deux complexes se caractérisent par la présence d'un ion Fe^{2+} central complexé par deux ligands ter-pyridine fonctionnalisés avec des groupements de type phényles périphériques. Afin d'établir une relation entre la structure des complexes et leur effet sur la prolifération cellulaire, 2 autres complexes organométalliques ont été synthétisés. Ces molécules, appelées AIM1 et Ru, se caractérisent respectivement par l'absence des groupements aromatiques périphériques, et le remplacement de l'ion Fe^{2+} par un ion Ru^{2+} .

Dans un premier temps, l'effet des complexes AIM1 et Ru sur la prolifération d'une lignée cancéreuse mammaire, les cellules MDA-MB231, et d'une lignée mammaire saine, les cellules MCF-10A, a été étudié à la même dose que celle établie pour les complexes AIM2 et AIM3 (2 μ M). Les résultats montrent que le nombre de cellules MDA-MB231 traitées avec AIM1 passe de 4×10^5 cellules au moment de l'ensemencement (0h) à environ 10×10^5 cellules après 96h de traitement (**Figure 39**). Les cellules MDA-MB231 non traitées prolifèrent quant à elles jusqu'à atteindre un nombre d'environ 23×10^5 cellules après 96h de culture. Le traitement de ces cellules avec le complexe AIM1 entraîne donc une réduction de 40% de la prolifération. De la même manière, une réduction de la prolifération des cellules épithéliales saines MCF-10A est observée, avec un nombre de cellules de 11×10^5 et 40×10^5 cellules après 96h de culture en présence et en absence d'AIM1 respectivement (**Figure 39**). Un traitement avec le complexe Ru ne permet pas d'observer de différence significative du nombre de cellules MDA-MB231 et MCF-10A traitées par rapport aux cellules non traitées (**Figure 39**). Ces données indiquent que le complexe AIM1 induit un ralentissement de la prolifération des cellules MDA-MB231 et MCF-10A, mais n'empêche pas complètement leur prolifération, comme ce qui avait été observé en présence des complexes AIM2 et AIM3. Les groupements aromatiques décorant les complexes AIM2 et AIM3 participent donc à leur effet antiprolifératif.

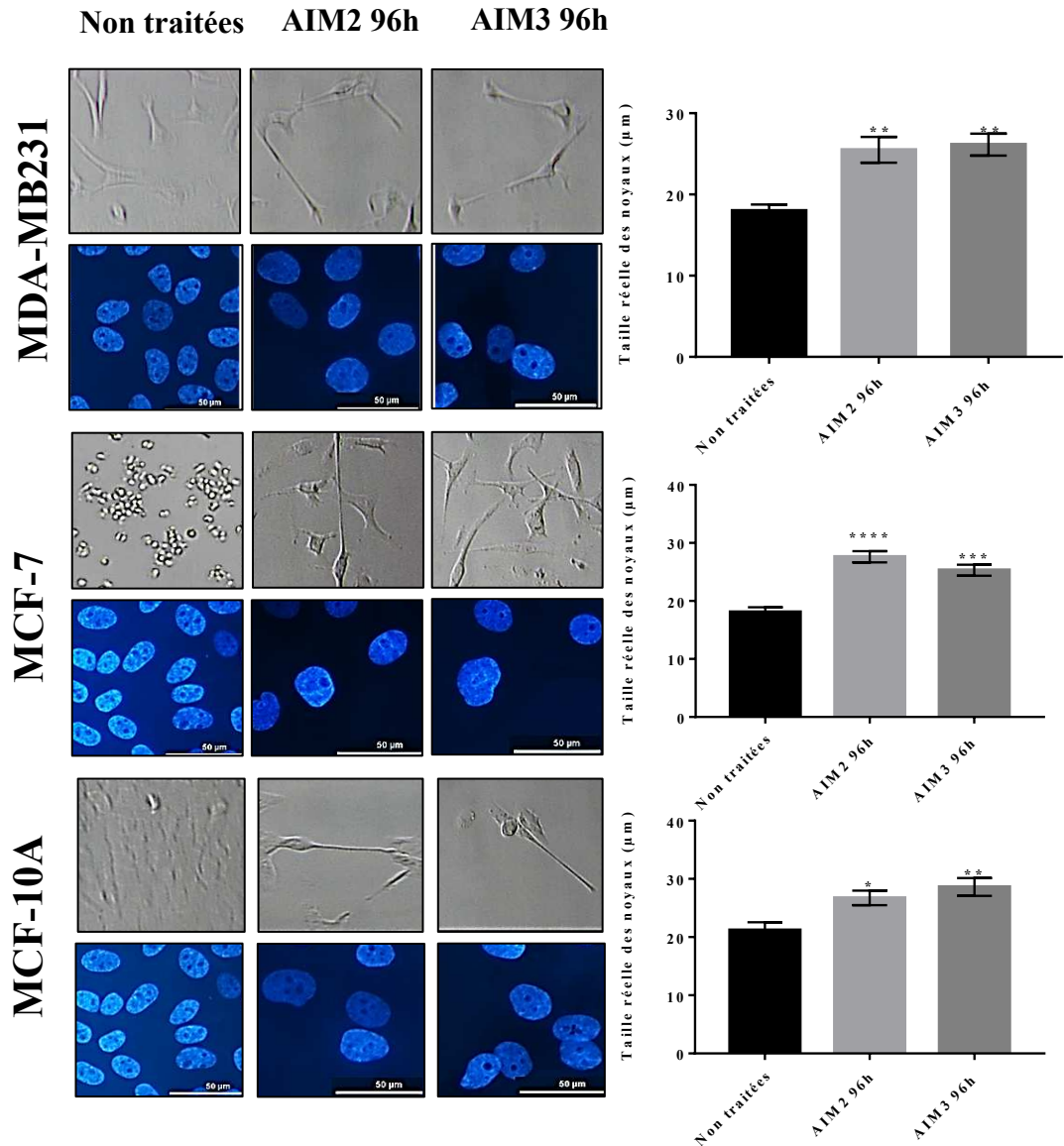


Figure 40. Etude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la morphologie et la taille des noyaux des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées avec 2 µM d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 96h. A la fin des traitements, la morphologie des cellules a été observée au microscope à contraste de phase à l'objectif x40. Le noyau des cellules a été observé après un marquage au Hoescht au microscope à épifluorescence (grossissement x100) (Les noyaux présentés ne correspondent pas aux cellules visualisées en microscopie à contraste de phase). Les résultats de la taille des noyaux correspondent à la moyenne de 3 séries indépendantes pour lesquelles 100 noyaux par condition ont été comptés. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

De plus, l'ion Fe^{2+} des molécules AIM2 et AIM3 est essentiel pour leur effet sur la prolifération cellulaire.

En conclusion, seules les molécules AIM2 et AIM3 permettent un arrêt total de la prolifération de lignées mammaires saines et cancéreuses. Les données préalablement acquises par le laboratoire avaient montré que cet arrêt de la prolifération cellulaire s'étend jusqu'à 144h de traitement avec seulement 30% des cellules en phases sub-G1 après 120h. Cette absence de mort cellulaire associée à l'arrêt de prolifération, nous ont conduit à vérifier la potentielle entrée en sénescence des cellules traitées avec AIM2 et AIM3.

II. 2. Étude de l'induction de la sénescence par AIM2 et AIM3

La sénescence cellulaire se caractérise, en plus d'un arrêt de la prolifération, par des modifications phénotypiques, l'expression de la SA (Senescence-Associated)- β -Galactosidase, l'expression de marqueurs protéiques (p53, p21, p16, p14...), par un marquage positif de protéines de la réparation de l'ADN (γ -H2AX et TP53BP1 par exemple) et par l'établissement d'un stress oxydatif. Pour étudier l'influence d'AIM2 et d'AIM3 sur la sénescence cellulaire, une lignée cancéreuse mammaire (MDA-MB231) et une lignée mammaire non cancéreuse (MCF-10A) ont été utilisées. Ces deux lignées expriment des formes mutées du gène codant la protéine p53, impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. La lignée cancéreuse mammaire MCF-7 a été utilisée comme modèle de cellules exprimant la forme sauvage du gène codant p53.

II. 2. 1. Observation du phénotype des cellules traitées

Il est décrit que les cellules sénescents acquièrent un phénotype de cellules aplaties, en forme d'étoiles avec des extensions cytoplasmiques (Cristofalo and Pignolo, 1993)(Chen *et al.*, 2013)(Herranz and Gil, 2018). L'observation des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A traitées pendant 96h avec 2 μ M d'AIM2 et d'AIM3 indique que ces dernières s'étendent beaucoup plus que les cellules non traitées (**Figure 40**). De plus, les cellules traitées se caractérisent par la formation de longs filaments cytoplasmiques. Les changements phénotypiques sont beaucoup plus marqués dans les cellules épithéliales MCF-7 et MCF-10A qui semblent acquérir un phénotype de type fibroblastique.

La taille des noyaux a également été étudiée dans ces cellules. Alors que les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A possèdent des noyaux d'environ 20 μ m de longueur, les

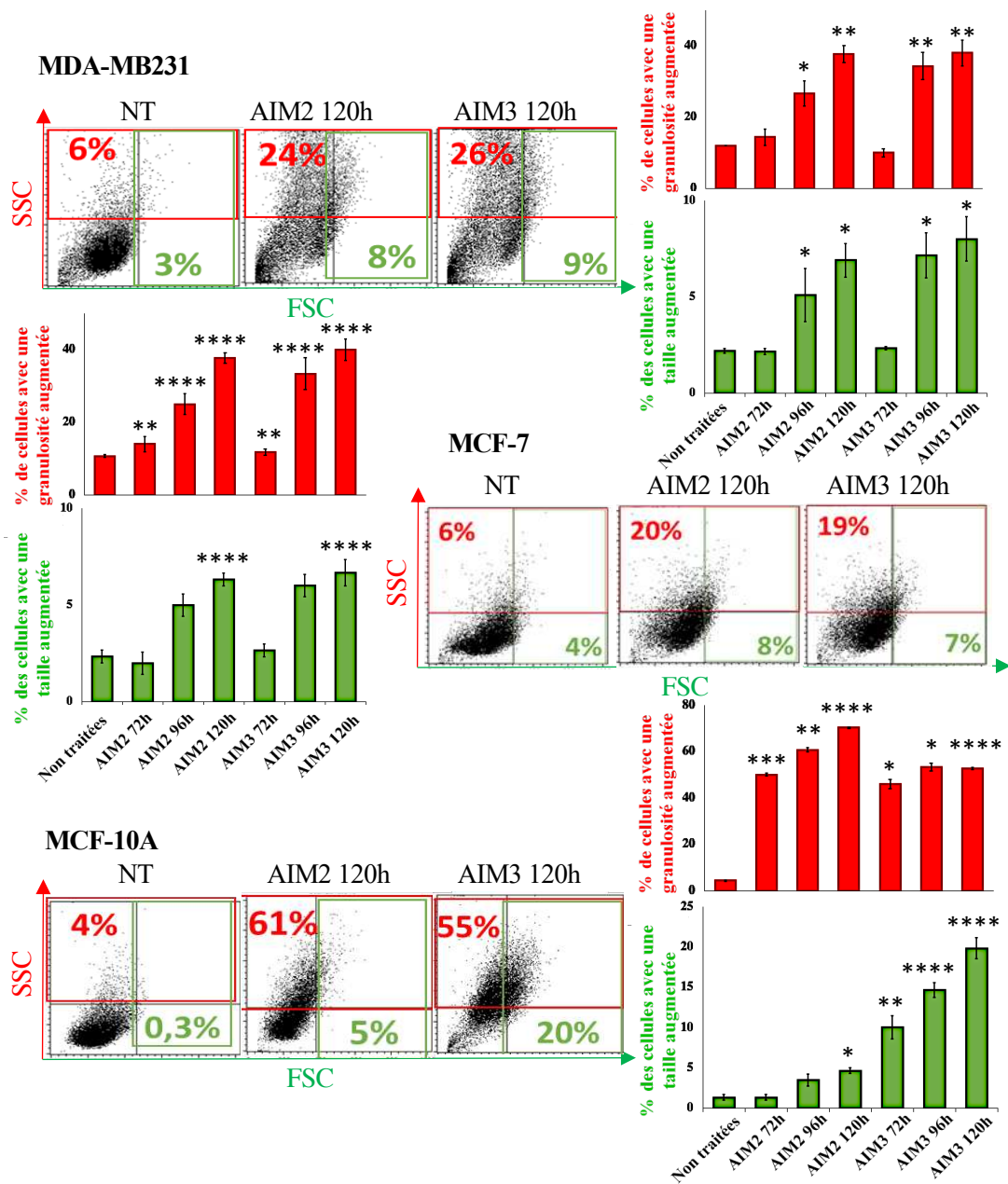


Figure 41. Etude de l'effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la granulométrie et la taille des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 72h, 96h et 120h. A la fin des traitements, les paramètres FSC (taille) et SSC (granulosité) ont été évalués par analyse des cellules en cytométrie en flux. Les cellules non traitées ont été placées dans le quadrant inférieur gauche. Le pourcentage de cellules avec une granulométrie augmentée (représentées en rouge) et une taille augmentée (représentées en vert) a été déterminé par comptage des cellules dans les quadrants vert rouge (SSC high) et (FSC high) respectivement. Les résultats correspondent à la moyenne de 3 séries indépendantes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

noyaux des cellules traitées ont plutôt une taille de 25 μm (**Figure 40**). Cette augmentation de la taille des noyaux est également une caractéristique commune des cellules sénescents.

Enfin, il est également décrit que les cellules en sénescence présentent des modifications des paramètres SSC (side scatter) et FSC (forward scatter) en cytométrie en flux, représentant respectivement la granulosité et la taille des cellules (Bojko *et al.*, 2019)(Gorgoulis *et al.*, 2019). Des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A ont été traitées pendant 72h, 96h et 120h avec 2 μM d'AIM2 et d'AIM3 puis analysées par cytométrie en flux. La population a été divisée en 4 quadrants, et les cellules non traitées ont été placées dans le quadrant gauche inférieur, représentatif de cellules de faible taille et de faible granulosité. Ensuite, une quantification des cellules de taille augmentée (quadrants inférieur et supérieur de droite) et de granulosité augmentée (quadrants gauche et droit supérieurs) a été réalisée.

Une augmentation de la taille des cellules MDA-MB231 traitées avec AIM2 et AIM3 a été observée par rapport aux cellules non traitées (**Figure 41**). Le pourcentage de cellules avec un paramètre FSC élevé passe de 3% dans les cellules non traitées à 9% après 96h de traitement avec AIM2 ou AIM3. Une augmentation importante de la granulosité sous traitement avec les complexes a également été observée. En effet, seules 6% des cellules non traitées présentent un paramètre SSC élevé, alors que ce pourcentage passe à environ 25% dans les cellules traitées pendant 96h (**Figure 41**).

L'augmentation de la taille et de la granulosité des cellules MCF-7 traitées avec AIM2 et AIM3 est similaire. En effet, une augmentation d'un facteur 2 du nombre de cellules MCF-7 présentant un paramètre FSC élevé est observée entre les conditions non traitées (4%) et traitées avec AIM2 ou AIM3 pendant 120h (8%) (**Figure 41**). Le nombre de cellules MCF-7 présentant une granulosité élevée est de 6% dans les cellules non traitées et 20% dans les cellules traitées.

Cette augmentation de la granulosité est encore plus importante dans les cellules MCF-10A, où le pourcentage de cellules présentant une forte granulosité passe de 4% dans les cellules non traitées à environ 60% dans les cellules traitées pendant 96h (**Figure 41**). Un traitement avec AIM3 induit également une augmentation importante de la taille des cellules MCF-10A, puisque 20% des cellules traitées présentent un FSC élevé alors que ce pourcentage n'est que de 0,3% dans les cellules non traitées. De manière surprenante, la taille des cellules ne semble pas affectée par la molécule AIM2, puisque seules 5% des cellules traitées présentent une taille augmentée et ce même après 120h de traitement (**Figure 41**).

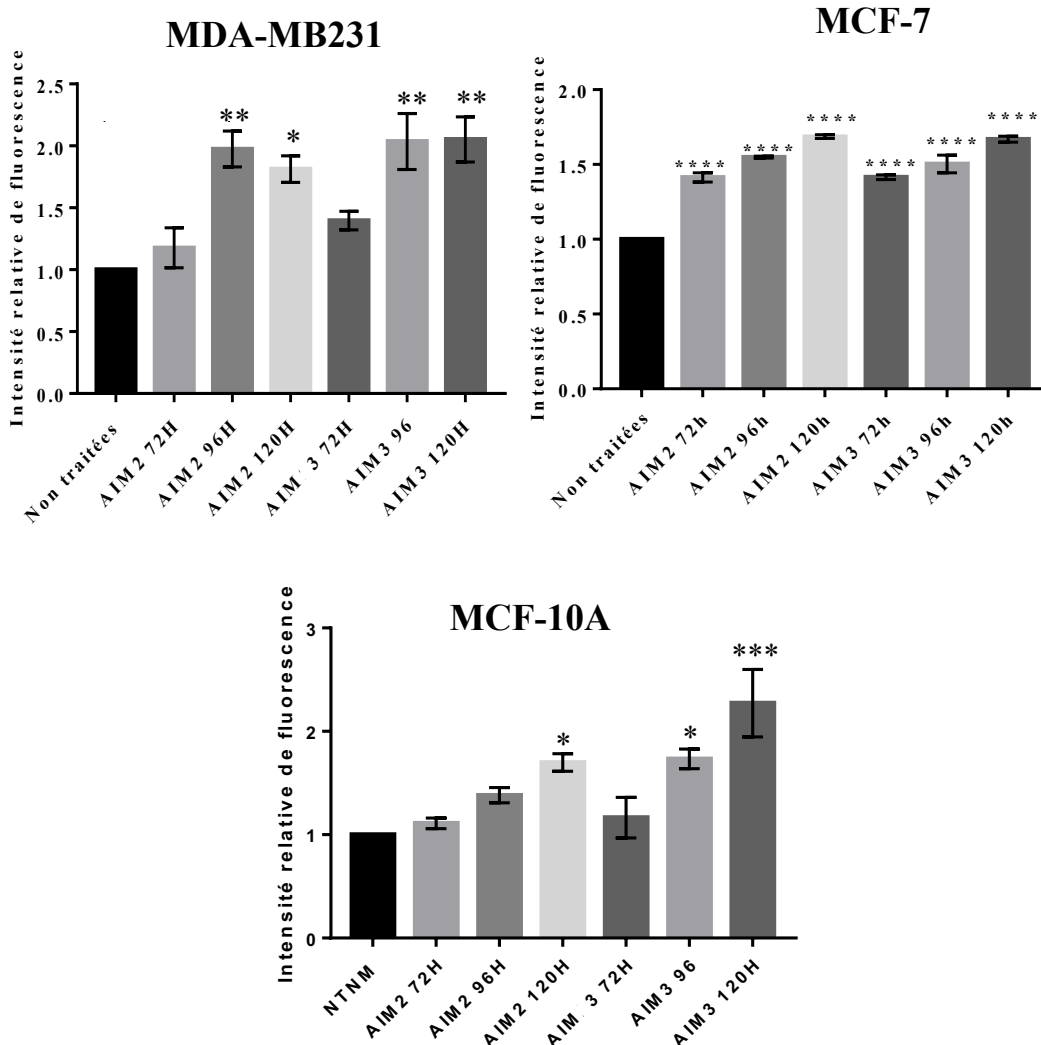


Figure 42. Etude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 72h, 96h et 120h. A la fin des traitements, les cellules ont été mises en présence de Bafilomycine A1 pendant 1h à 37°C, avant d'être marquées par la sonde C12FDG pendant 2h à 37°C. La fluorescence émise par la sonde a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats présentés sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes, et correspondent à la moyenne du pic de fluorescence normalisée des cellules traitées rapportée à celle des cellules non traitées. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc qu'un traitement long (96h et 120h) avec AIM3 induit des modifications phénotypiques de toutes les lignées cellulaires testées, MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A, ce qui pourrait suggérer une entrée en sénescence. Des changements morphologiques similaires ont été observés en présence de la molécule AIM2 dans les lignées tumorales MDA-MB231 et MCF-7, mais pas dans la lignée MCF-10A. Cette absence de modifications phénotypiques des cellules MCF-10A traitées avec AIM2 pourrait indiquer une absence d'entrée en sénescence.

II. 2. 2. Analyse de l'activité de la SA- β -Galactosidase

II. 2. 2. 1. Par cytométrie en flux

Les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A ont été traitées pendant 72h, 96h et 120h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 avant d'être mises en présence de la sonde C12FDG (un substrat fluorescent de l'enzyme SA- β -Galactosidase), dont l'intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats ont été exprimés de 2 manières : en intensité relative en prenant en compte la moyenne du pic de fluorescence pour les conditions traitées, et en ramenant les valeurs à la moyenne obtenue pour les cellules non traitées (**Figure 42**) ; ou en pourcentage de cellules SA- β -Galactosidase positives (**Figure 43**). Pour ce faire, les courbes de fluorescence des cellules non traitées et traitées ont été superposées, et la borne M1 a été placée à l'endroit où les courbes « traitées » ne se superposent plus à la courbe « non traitée ».

Les résultats ont mis en évidence une augmentation de l'intensité relative de fluorescence d'un facteur 2 dans les cellules MDA-MB231 traitées pendant 96h et 120h avec AIM2 et AIM3 par rapport aux cellules non traitées (**Figure 42**). En termes de pourcentages de cellules positives, environ 20% des cellules non traitées présentent une fluorescence, et ce pourcentage est doublé dans les cellules traitées pendant 96h et 120h (**Figure 43**).

Concernant l'autre lignée cancéreuse mammaire, les cellules MCF-7, une induction moins marquée de la sénescence a été observée puisqu'une augmentation d'un facteur 1,5 de l'intensité relative de la fluorescence a été observée (**Figure 42**). Le pourcentage de cellules MCF-7 SA- β -galactosidase positives passe de 25% dans les cellules non traitées à environ 40% dans les cellules traitées (**Figure 43**). L'augmentation du nombre de cellules MCF-7

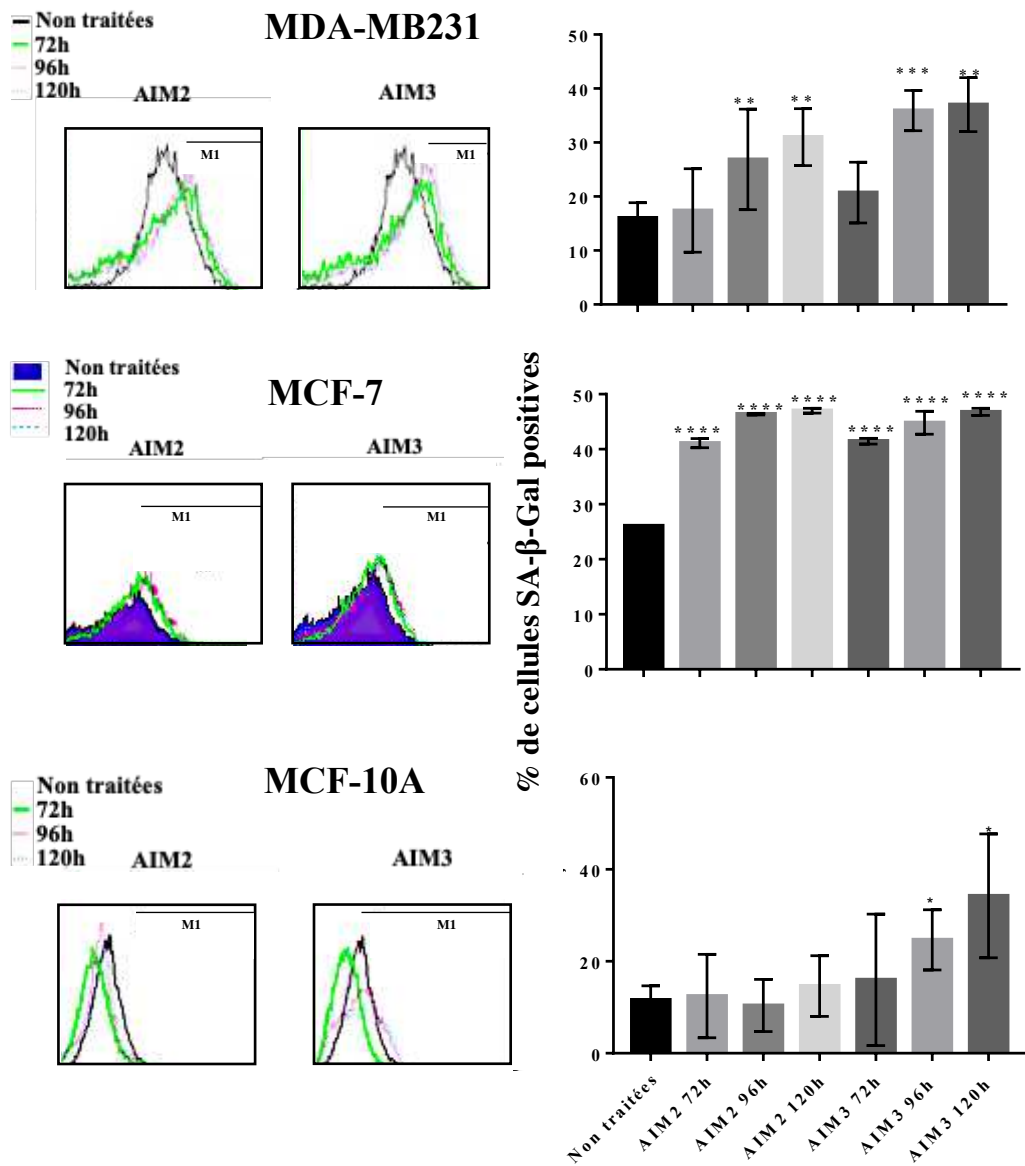


Figure 43. Etude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 72h, 96h et 120h. A la fin des traitements, les cellules ont été mises en présence de Bafilomycine A1 pendant 1h à 37°C, avant d'être marquées par la sonde C12FDG pendant 2h à 37°C. La fluorescence émise par la sonde a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux. Les résultats présentés, qui sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes, correspondent au pourcentage de cellules positives. Les pics superposés de fluorescence pour les différentes conditions sont présentés, tout comme la borne M1 qui a été placée à l'endroit où les courbes « Traitées » ne se superposent plus aux courbes « Non traitées ». * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

sénescentes devient significative dès 72h de traitement, alors qu'il a fallu attendre 96h dans le cas des cellules MDA-MB231.

Une augmentation d'un facteur 2 de l'intensité relative de fluorescence est observée à 120h de traitement avec AIM3 dans la lignée mammaire saine MCF-10A (**Figure 42**). Cette augmentation est moins importante dans les cellules traitées pendant 120h avec AIM2 (induction d'un facteur 1,5), bien qu'elle soit significative. A 96h, le niveau relatif de fluorescence des cellules MCF-10A traitées avec AIM3 est significativement supérieur dans les cellules non traitées, alors qu'aucune différence significative n'est observée en présence d'AIM2. Ensuite, le pourcentage de cellules MCF-10A non traitées positives est similaire à celui observé dans les cellules MDA-MB231 (environ 10%) (**Figure 43**). De la même manière que dans les cellules MDA-MB231, ce pourcentage est doublé dans les cellules MCF-10A traitées pendant 120h avec AIM3. A 96h de traitement avec AIM3, ce pourcentage est d'environ 25%. De manière surprenante, aucune augmentation du pourcentage de cellules positives n'a été observée dans les cellules MCF-10A traitées avec AIM2, et ce même après 120h.

Ces résultats de cytométrie indiquent donc que les complexes AIM2 et AIM3 induisent une entrée en sénescence des deux lignées cancéreuses mammaires (MDA-MB231 et MCF-7). Pour la lignée mammaire saine MCF-10A, seule la molécule AIM3 en est capable.

II. 2. 2. 2. Par colorimétrie

Pour ces marquages, le temps 96h a été sélectionné, temps pour lequel une sénescence a été observée en cytométrie en flux pour les trois lignées cellulaires. Les cellules traitées ont été comparées à des cellules non traitées, laissées en culture uniquement 48h pour éviter la confluence qui pourrait entraîner une entrée des cellules en sénescence. Le marquage SA- β -galactosidase a été complété par un marquage des cellules en prolifération *via* le marquage EdU. En effet, au cours des marquages de la SA- β -gal, différents niveaux d'intensité ont été observés, et établir un seuil d'intensité au-delà duquel le marquage « bleu » correspondait bien à des cellules sénescentes paraissait trop arbitraire. Ce co-marquage a permis de ne comptabiliser que les cellules SA- β -galactosidases positives et EdU négatives (correspondant aux cellules non prolifératives) dans le but de limiter le comptage de faux positifs.

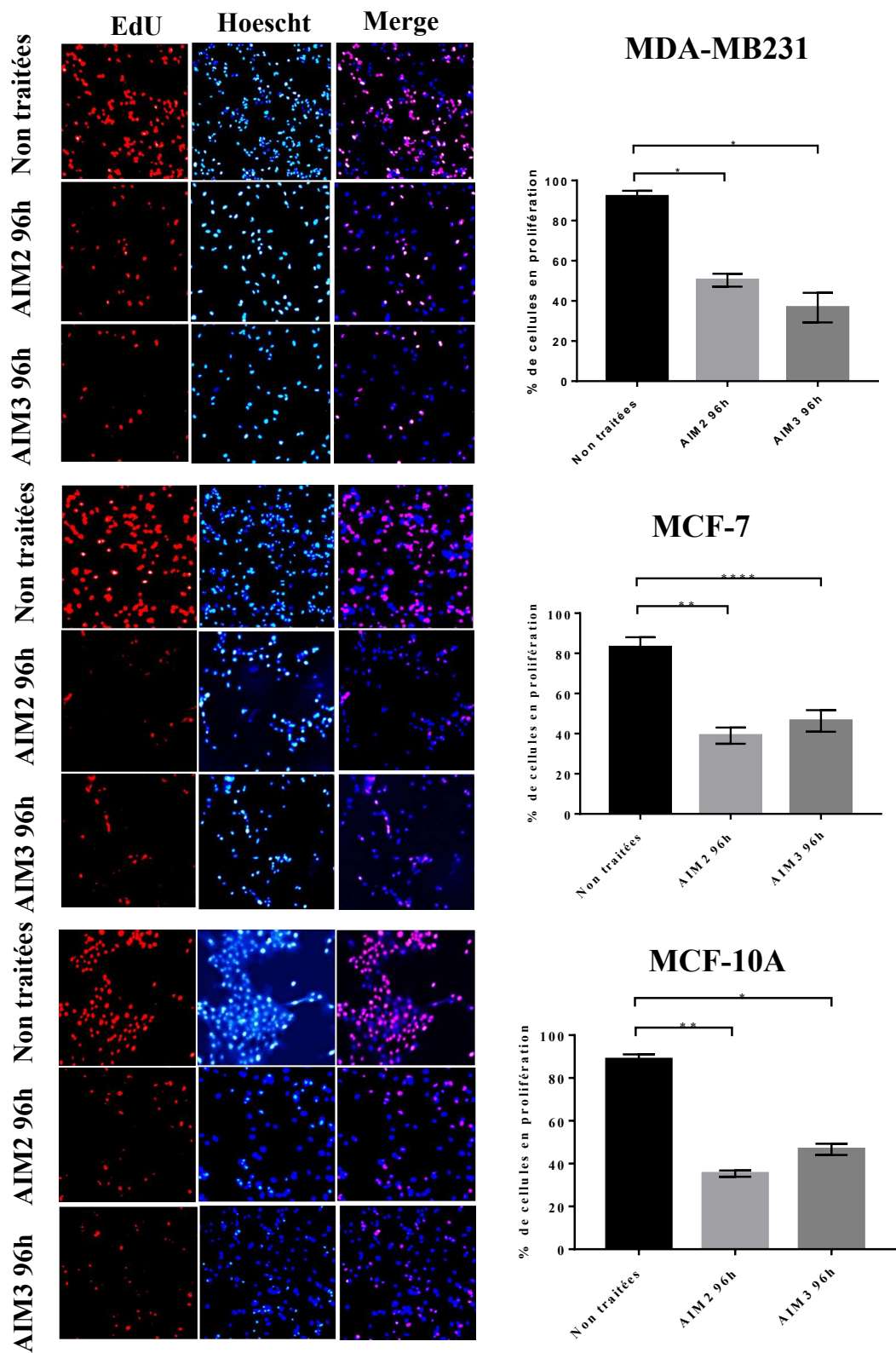


Figure 44. Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 96h. Les cellules non traitées ont été laissées en culture uniquement 48h pour éviter la confluence. A la fin des traitements, ou au bout des 48h pour les conditions non traitées, un marquage à l'EdU a été réalisé afin de visualiser les cellules en prolifération. Les expériences sont issues d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Le marquage EdU a permis de vérifier l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 dans les trois lignées cellulaires étudiées. En effet, les résultats ont mis en évidence une diminution d'environ 50% de l'incorporation d'EdU dans les cellules MDA-MB31, MCF-7 et MCF-10A traitées pendant 96h avec 2 μ M d'AIM2 et d'AIM3 par rapport aux cellules non traitées (**Figure 44**).

Les expériences de co-marquages ont révélé qu'une très faible proportion des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A non traitées sont en sénescence (environ 5%) (**Figure 45**). Une augmentation d'un facteur 3 du nombre de cellules positives a été observée dans les cellules MDA-MB231 et MCF-7 traitées pendant 96h avec les molécules AIM2 et AIM3. Cette augmentation semble être similaire à la fois entre les deux lignées, suggérant une entrée en sénescence similaire des deux types cellulaires, et entre les deux complexes AIM2 et AIM3, ce qui rejoint l'absence de différences entre AIM2 et AIM3 en termes d'effet cytostatique qui avait été observée.

Quant aux cellules MCF-10A, environ 5% des cellules non traitées sont positives pour la SA- β -gal et négatives pour l'EdU (**Figure 45**). Une augmentation d'un facteur 3 du nombre de cellules sénescents est observée dans les cellules traitées pendant 96h avec AIM3. Cette augmentation est du même ordre que dans les lignées MDA-MB231 et MCF-7, ce qui suggère que la capacité de la molécule AIM3 à induire la sénescence ne se limite pas qu'aux cellules cancéreuses mammaires, mais s'étend également à la lignée mammaire saine. Enfin, de manière surprenante, alors que beaucoup de cellules MCF-10A traitées avec AIM2 paraissent être positives pour la SA- β -galactosidase, le co-marquage avec l'EdU révèle que la très grande majorité des cellules marquées sont également EdU positives (**Figure 45**). Ces résultats suggèrent donc que la coloration bleue n'est, dans ce cas précis, pas révélatrice d'une entrée en sénescence.

Les modifications phénotypiques observées précédemment accompagnent l'entrée en sénescence des cellules MDA-MB231 et MCF-7 dès 96h de traitement avec AIM2 et AIM3, et des cellules MCF-10A en présence d'AIM3. Enfin, l'absence d'augmentation de la taille des cellules MCF-10A en présence d'AIM2 est associée à une incapacité de la molécule à induire la sénescence dans ces cellules.

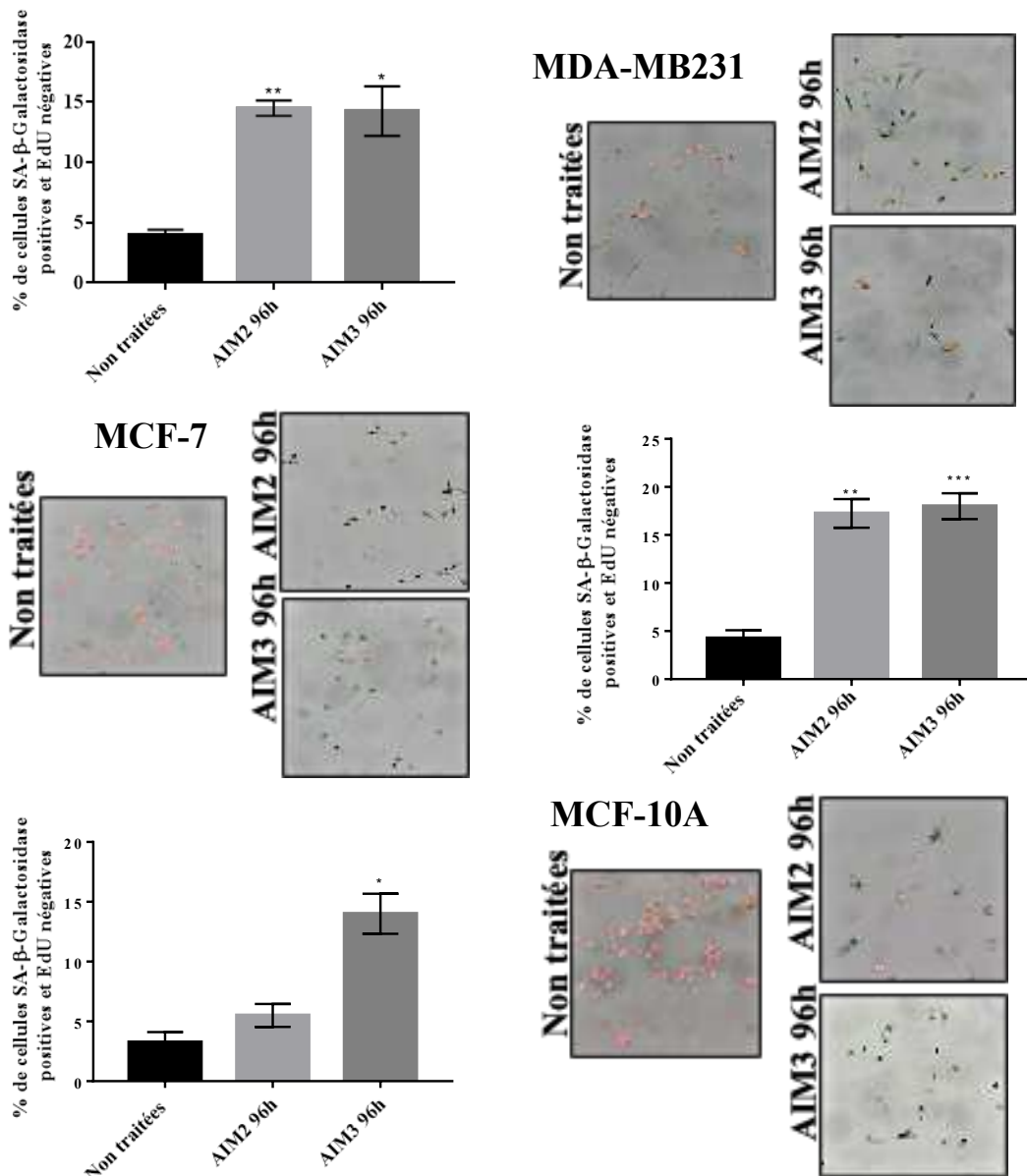


Figure 45. Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur l'entrée en sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 96h. Les cellules non traitées ont été laissées en culture uniquement 48h pour éviter la confluence. 24h avant le marquage, l'EdU a été ajouté au milieu de culture. A la fin des traitements ou au bout des 48h pour les conditions non traitées, les cellules en sénescence ont été révélées par un marquage de la SA- β -Galactosidase (bleu). Les cellules en prolifération (rouge) ont également été marquées. 100 cellules ont été comptées pour chaque condition. Seules les cellules SA- β -galactosidase positives et EdU négatives ont été comptabilisées. Les résultats présentés proviennent d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

II. 2. 3. Réversibilité de la sénescence

De plus en plus de preuves tendent à montrer que la sénescence pourrait être réversible (Chakradeo *et al.*, 2015). Cette réversibilité permettrait d'expliquer la reprise de la prolifération des cellules MCF-10A lorsque la molécule AIM3 est retirée du milieu de culture après 72h de traitement. Parallèlement, aucune reprise de la prolifération de la lignée cancéreuse MDA-MB231 n'a été observée dans ces mêmes conditions.

Pour étudier la réversibilité de la sénescence, les cellules ont été traitées pendant 96h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 avant marquage (condition « AIM2/3 96h »). D'autres cellules ont également été traitées pendant 96h, puis le milieu a été remplacé par un milieu contenant AIM2 ou AIM3 pendant 48h supplémentaires (condition « AIM2/3 96h + AIM2/3 48h »). Enfin, le milieu de culture de cellules prétraitées pendant 96h avec AIM2/3 a été remplacé par un milieu ne contenant pas de molécule (condition « AIM2/3 + NT 48h »).

Dans un premier temps, la réversibilité du traitement avec AIM2/3 sur la prolifération des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A a été vérifiée par mesure de l'incorporation d'EdU. Les résultats ont montré qu'un traitement de 96h avec AIM2/3 induit bien une diminution de 50% du nombre de cellules ayant incorporé l'EdU (**Figure 46**), comme ce qui avait été montré dans la **Figure 44**. Ensuite, une diminution d'un facteur 2,5 du pourcentage de cellules EdU positives a été observée entre les conditions « AIM 96h » et « AIM 96h + AIM 48h » (diminution du pourcentage de 50% à 20%), et ce dans les trois lignées étudiées, et en présence des 2 molécules (**Figure 46**). Ces données prouvent donc que la diminution de l'incorporation d'EdU induite par AIM2 et AIM3 est renforcée dans le temps.

Dans les cellules cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7, aucune augmentation du pourcentage de cellules EdU positives n'est observée dans les conditions « AIM + NT » par rapport aux conditions « AIM + AIM » (**Figure 46**). Ces données viennent confirmer l'irréversibilité de l'effet cytotatique d'AIM2 et AIM3 sur les lignées cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7.

Enfin, une augmentation d'un facteur 2,5 du pourcentage des cellules MCF-10A EdU positives a été observée entre les conditions « AIM + AIM » et « AIM + NT » (**Figure 46**). Le pourcentage de cellules positives dans les conditions « AIM + NT » retrouve une valeur similaire à celui des conditions « AIM 96h » (environ 50%). Ces données confirment que l'effet

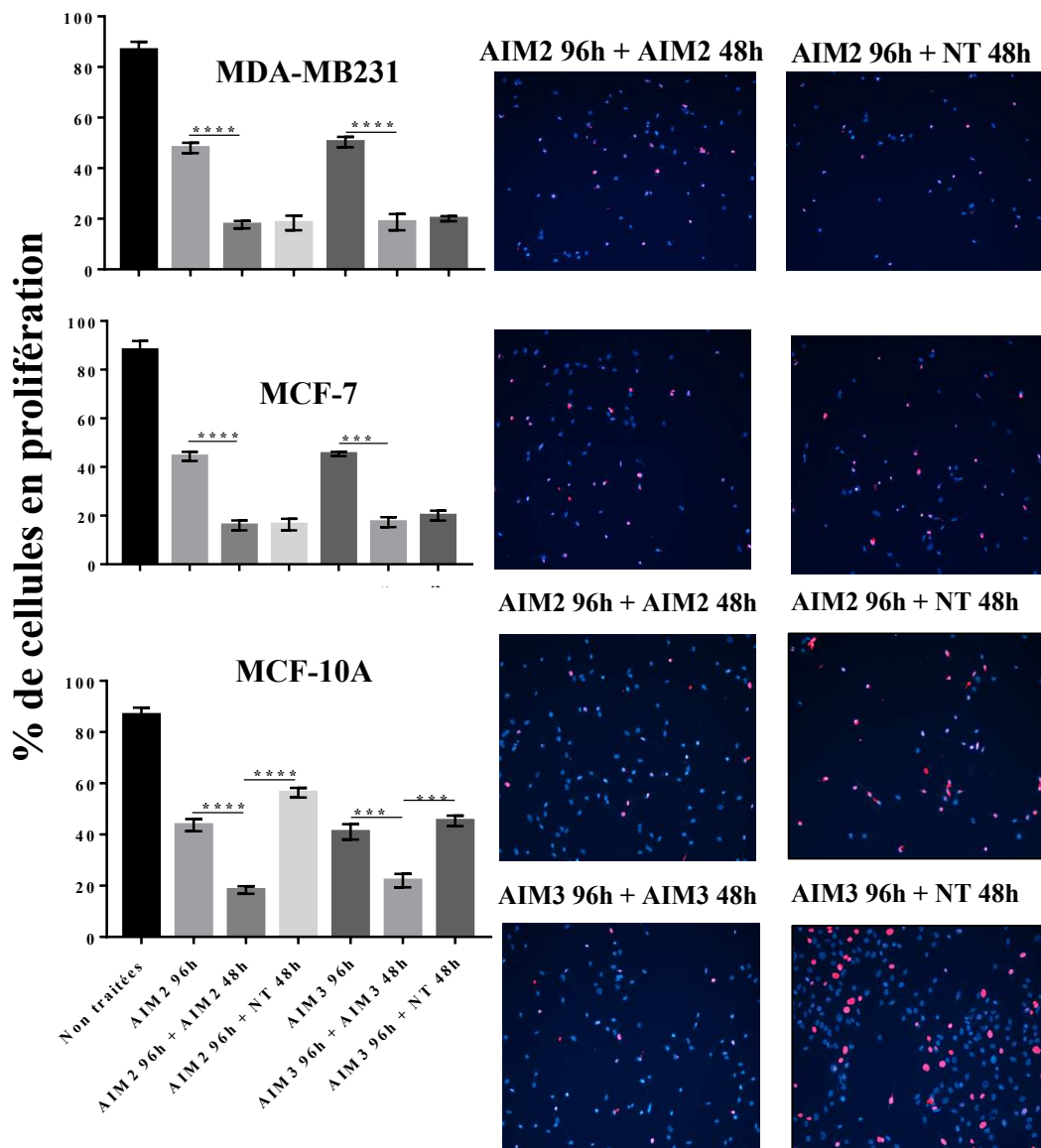


Figure 46. Etude de la réversibilité d'un traitement de 96h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la prolifération des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules des conditions « Non traitées » ont été laissées en culture 48h pour éviter la confluence. Les cellules « AIM2/3 96h » ont été traitées pendant 96h. Les cellules « AIM2/3 96h + AIM2/3 48h » ont été traitées pendant 96h avec AIM2/3, puis le milieu a été changé avec un milieu contenant AIM2/3 pendant 48h supplémentaires. Enfin, les cellules « AIM2/3 96h + NT 48h » ont été traitées avec AIM2/3 pendant 96h, et le milieu a ensuite été remplacé par un milieu sans molécule pendant 48h. 24h avant le marquage, l'EdU a été ajouté dans le milieu de culture. Le nombre de noyaux positifs pour l'EdU a été ramené au nombre total de noyaux visualisés par un marquage au Hoescht. Les résultats présentés proviennent d'au moins 3 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

cytostatique des molécules AIM2 et AIM3 est réversible dans la lignée mammaire saine MCF-10A.

Afin d'étudier l'implication d'une potentielle réversibilité de la sénescence dans la reprise de la prolifération des cellules MCF-10A lorsqu'AIM2 ou AIM3 sont retirées du milieu de culture, l'activité de la SA- β -galactosidase a été visualisée en parallèle de l'incorporation de l'EdU. Le nombre de cellules SA- β -galactosidase positives/EdU négatives a été rapporté au nombre de cellules totales.

Dans les cellules cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7 traitées avec AIM2/3 pendant 96h, le pourcentage de cellules en sénescence augmente d'un facteur 3 (**Figure 47**), comme ce qui avait été montré dans la **Figure 45**. Ensuite, ce pourcentage passe de 15% à 30% respectivement pour les conditions « AIM 96h » et « AIM 96h + AIM 48h ». Ces données soulignent donc que la sénescence n'est pas seulement maintenue avec des temps longs de traitement (96h et 144h), mais augmente. Enfin, aucune modification du pourcentage de cellules sénescents est observée entre les conditions « AIM 96h + AIM 48h » et « AIM 96h + NT 48h » dans les cellules MDA-MB231 et MCF-7. Ces données suggèrent que la sénescence induite par un traitement de 96h avec AIM2/3 des deux lignées cancéreuses mammaires n'est pas réversible lorsque les molécules sont retirées. Cette irréversibilité de la sénescence dans les lignées cancéreuses est donc probablement associée à l'irréversibilité de l'effet cytostatique des complexes sur ces cellules.

Enfin, aucune induction de la sénescence n'a été observée en présence d'AIM2 pendant 96h dans les cellules MCF-10A (**Figure 47**), comme ce qui a été montré dans la **Figure 45**. Aucune modification du pourcentage de cellules sénescents n'a été observée dans les conditions « AIM2 96h + AIM2 48h » et « AIM2 96h + NT 48h » par rapport à la condition « AIM2 96h ». Ces résultats soulignent bien l'incapacité de la molécule AIM2 à induire la sénescence des cellules MCF-10A même à des temps longs (144h de traitement). De la même manière que dans la **Figure 45**, la molécule AIM3 induit une augmentation du pourcentage de cellules sénescents d'un facteur 3 (**Figure 47**). Ce pourcentage passe de 18% dans la condition « AIM3 96h » à 28% dans la condition « AIM3 96h + AIM3 48h ». Ainsi, tout comme dans les cellules MDA-MB231 et MCF-7, l'effet inducteur de la sénescence de la molécule AIM3 dans la lignée MCF-10A est renforcé à des temps longs. De manière intéressante, seules 18% des cellules « AIM3 96h + NT 48h » sont en sénescence. Ces résultats démontrent la réversibilité

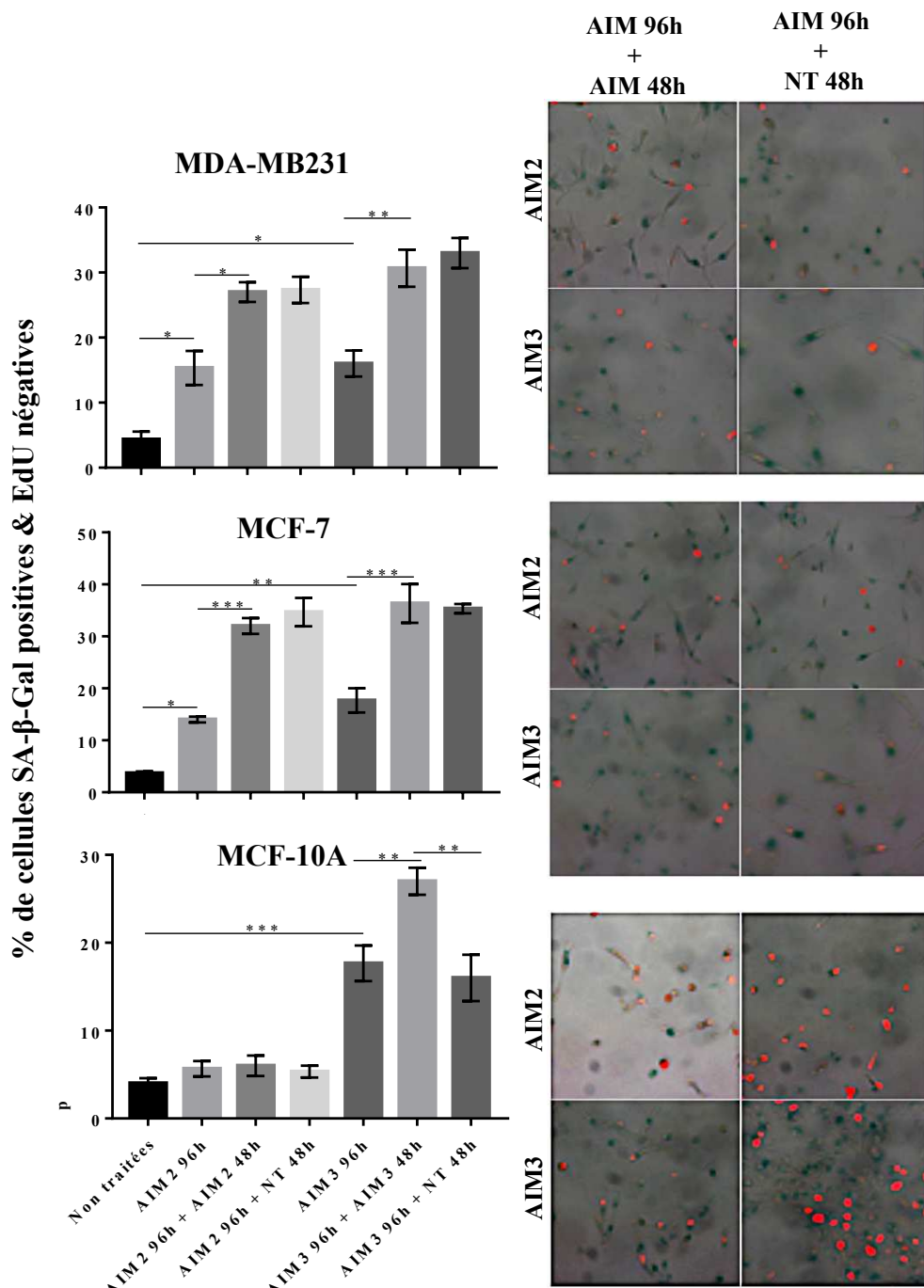


Figure 47. Etude de la réversibilité d'un traitement de 96h avec les molécules AIM2 et AIM3 sur la sénescence des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées de la même manière que dans la Figure 48. 24h avant le marquage, l'EdU a été ajouté dans le milieu de culture. A la fin des traitements, un marquage de la SA-β-galactosidase a été réalisé. 100 cellules ont été comptées pour chaque condition. Seules les cellules SA-β-galactosidase positives et EdU négatives ont été comptabilisées. Les résultats présentés proviennent d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

de la sénescence induite par AIM3 dans les cellules MCF-10A. Cette réversibilité pourrait permettre d'expliquer la reprise de la prolifération après un arrêt du traitement.

En conclusion, la reprise de la prolifération des cellules mammaires saines MCF-10A après l'arrêt du traitement avec AIM3 est associée à une sortie de l'état de sénescence induite par le complexe. Au contraire, la sénescence induite par AIM2 et AIM3 dans les lignées cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7 est maintenue, même lorsque les molécules sont retirées du milieu de culture, ce qui aboutit à un maintien de leur effet cytostatique dans ces deux lignées.

II. 2. 4. Étude des mécanismes moléculaires à l'origine de l'induction de la sénescence par les complexes AIM2 et AIM3

II. 2. 4. 1. Analyse de l'expression de p21

L'arrêt du cycle cellulaire des cellules sénescents fait très majoritairement intervenir l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Son niveau d'expression a ainsi été étudié dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A traitées pendant 24h, 48h et 72h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3. Cette cinétique de temps de traitement a été choisie afin de visualiser une potentielle induction de la sénescence.

Des expériences de Western Blot ont révélé une augmentation de l'expression de p21 dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A traitées avec AIM2 (**Figure 48A**) et AIM3 (**Figure 48B**), les résultats ne devenant significatifs qu'au bout de 72h. Quant aux expériences de RT-qPCR, les résultats indiquent une augmentation significative d'un facteur 1,3 de l'expression du gène codant p21, dès 24h de traitement avec AIM2 (**Figure 48A**) et AIM3 (**Figure 48B**).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que la protéine p21 est potentiellement impliquée dans l'arrêt de la prolifération cellulaire caractéristique de la sénescence induite par les complexes AIM2 et AIM3.

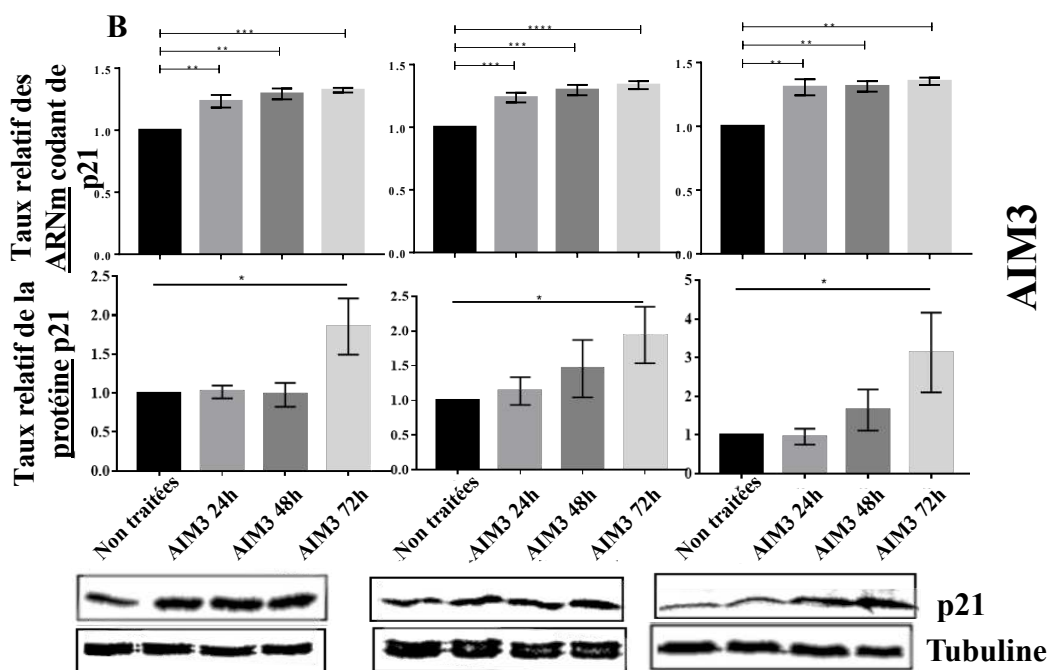
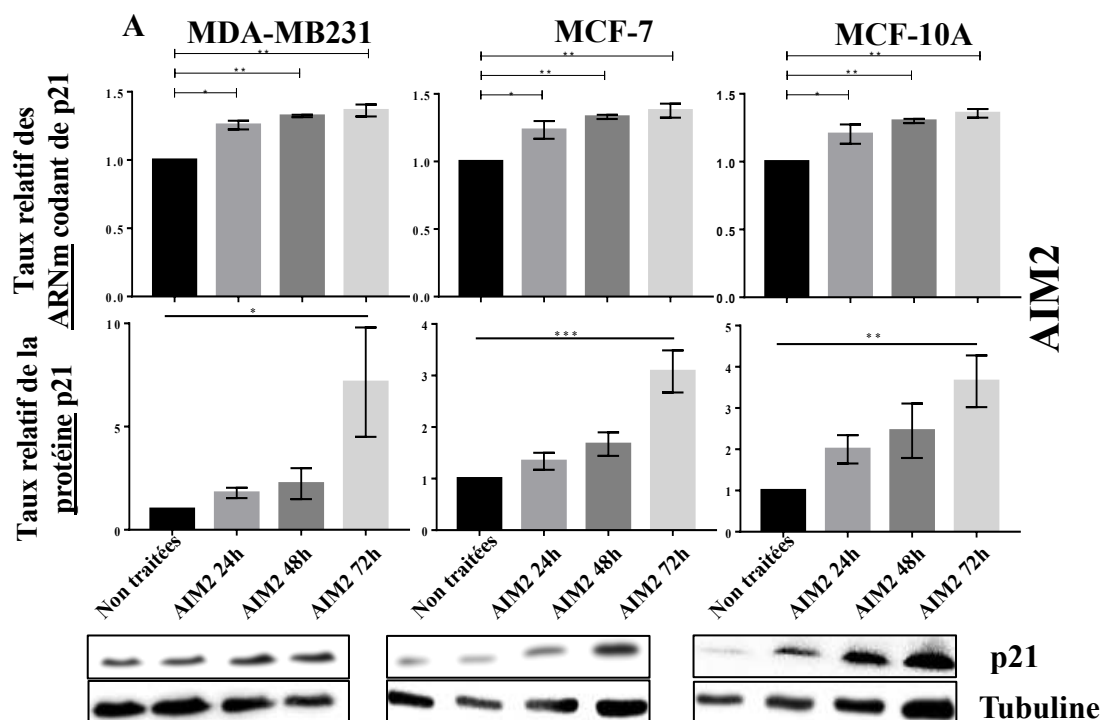


Figure 48. Effet des molécules AIM2 (A) et AIM3 (B) sur le taux d'ARNm codant p21 et sur le taux protéique de p21 dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 24h, 48h et 72h. A la fin des traitements, les cellules ont été collectées, et les ARNs extraits ont subi une rétro-transcription en ADNc. Le niveau d'expression de p21 a été déterminé par PCR en utilisant des amorces spécifiques. Parallèlement, les protéines totales extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un transfert sur membrane PVDF. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

II. 2. 4. 2. Analyse de la quantité intracellulaire en ROS

Les espèces réactives de l'oxygène sont connus pour induire une entrée en sénescence (Ameziane-El-Hassani and Dupuy, 2017). L'hypothèse d'une influence des complexes AIM2 et AIM3 sur la quantité intracellulaire en ROS repose 1) sur la capacité des ions Fe^{2+} à induire une production de ROS (Dixon and Stockwell, 2014)(Chen *et al.*, 2019), et 2) sur l'observation de dysfonctionnements mitochondriaux dès 24h de traitement avec nos complexes, qui pourraient résulter, ou être à l'origine, d'un stress oxydant. Pour tester l'influence des complexes sur la quantité intracellulaire en ROS, le niveau de fluorescence émise par les sondes DHE et MitoSox, qui traduisent la présence respective des ions O_2^- et du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , a été mesuré par cytométrie en flux. Des cellules traitées avec 50 ng/mL de Doxorubicine pendant 48h ont été utilisées en tant que témoin positif, du fait de la capacité de cette molécule à induire une production de ROS.

L'analyse du niveau de fluorescence des sondes montre que la Doxorubicine induit bien une production de ROS, mais cette production est beaucoup plus importante avec la sonde MitoSox (augmentation d'un facteur de 2,5 par rapport aux cellules non traitées) en comparaison de la sonde DHE (augmentation d'un facteur 1,3 par rapport aux cellules non traitées) (**Figure 49**). Un traitement des cellules MDA-MB231 avec 2 μ M d'AIM2 et AIM3 induit une augmentation d'un facteur 1,4 de la quantité de ROS par rapport aux cellules non traitées, et ce avec les deux sondes (**Figure 49**). En présence des deux sondes, 2 μ M de la molécule Ru n'induit pas de modification significative du taux de ROS par rapport aux cellules non traitées. Enfin, la molécule AIM1 induit une augmentation de la production de ROS avec la sonde MitoSox d'un facteur 1,2, mais pas avec la sonde DHE.

Ces résultats indiquent que les complexes AIM1, AIM2 et AIM3, qui contiennent un ion ferreux, sont capables d'induire une augmentation de la quantité intracellulaire en ROS dès 24h de traitement dans la lignée MDA-MB231. Le remplacement de l'ion Fe^{2+} par un ion Ru^{2+} ne permet plus d'observer cette augmentation du taux de ROS. Ces expériences permettent d'établir un lien entre la nature de l'ion contenu dans nos complexes et leurs effets cellulaires. Dès lors, l'ion Fe^{2+} des molécules AIM1, AIM2 et AIM3 pourrait participer à leur effet cytostatique notamment au travers de sa capacité à induire une augmentation du taux de ROS. Cet état de stress oxydatif pourrait être à l'origine de l'induction de la sénescence observée en présence d'AIM2 et AIM3.

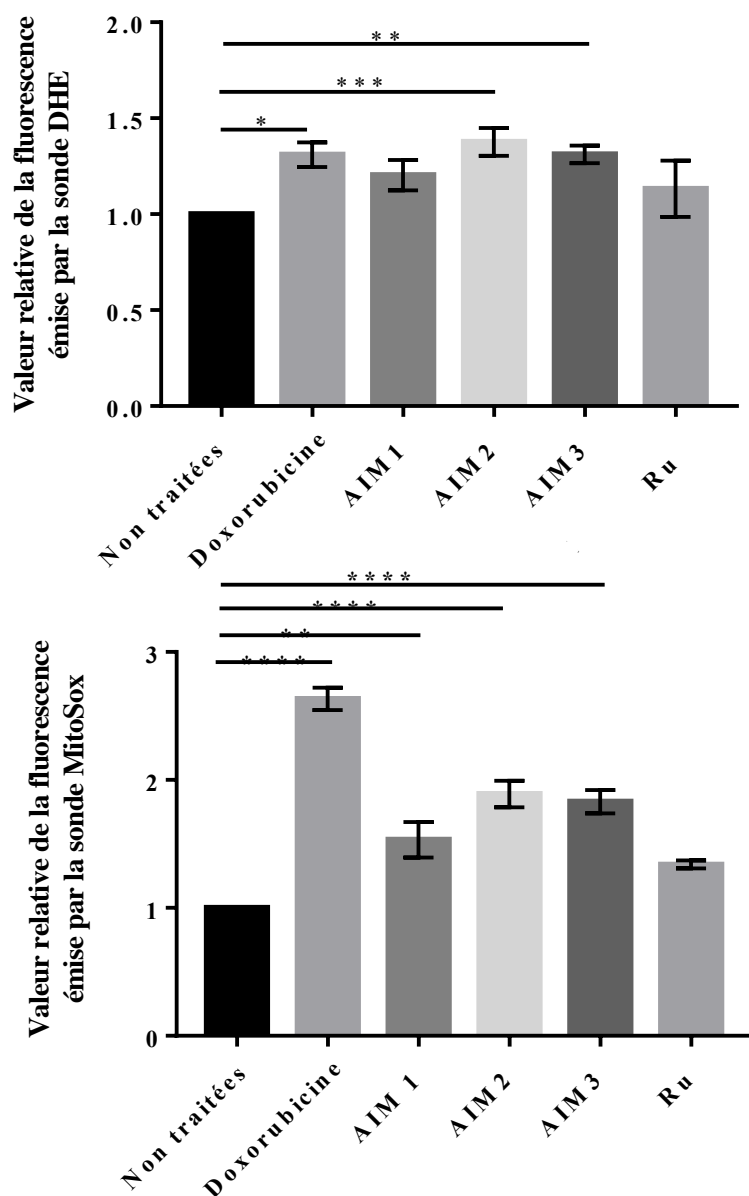


Figure 49. Etude de l'impact des molécules sur la quantité intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène dans les cellules MDA-MB231. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées avec 2 μ M d'AIM1, d'AIM2, d'AIM3 ou de Ru pendant 24h. Parallèlement, des cellules ont été traitées avec 50 ng/mL de Doxorubicine pendant 48h. A la fin des traitements, les cellules ont été collectées, et marquées à l'aide des sondes DHE (A) et MitoSox (B) dont l'intensité de fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux. Les résultats présentés, qui sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes, correspondent à la moyenne normalisée par rapport aux cellules non traitées. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

II. 2. 4. 3. Analyse des lésions de l'ADN induites par AIM2 et AIM3

L'apparition de lésions de l'ADN, en particulier des cassures doubles brins, est connue pour induire une entrée en sénescence (D'Adda Di Fagagna, 2008). L'hypothèse de la formation de lésions de l'ADN par les molécules AIM2 et AIM3 résulte de l'observation d'une interaction entre ces molécules et l'ADN (Gattuso *et al.*, 2015). Ces interactions non-covalentes pourraient induire la formation d'adduits AIM-ADN, pouvant conduire à l'émergence de cassures doubles brins. Pour étudier la capacité des complexes AIM2 et AIM3 à induire des cassures doubles brins, les foci de colocalisation entre γ -H2AX (une forme phosphorylée au niveau de la sérine 139 de l'histone H2A apposée majoritairement au niveau de lésions de l'ADN) et TP53BP1 (une protéine de réparation de l'ADN), deux marqueurs des lésions de l'ADN, ont été comptabilisés dans les noyaux des cellules MDA-MB231. La colocalisation a été privilégiée par rapport aux marquages individuels des protéines, puisqu'elle témoigne de façon plus certaine de la présence de cassures doubles brins (Nakamura *et al.*, 2010). Des cellules irradiées par des rayonnements ionisants de radiothérapie ont été utilisées comme contrôle positif.

Dans un premier temps, des temps courts de traitement avec AIM2 et AIM3 ont été réalisés afin de mettre en évidence une potentielle corrélation entre la formation de lésions de l'ADN et l'induction de la sénescence. Les résultats montrent que les cellules irradiées se caractérisent par environ 8 foci de colocalisation par noyau de cellules marquées (**Figure 50**). Les cellules non traitées présentent en moyenne 2 foci de colocalisation par noyau, comme ce qui est décrit dans les cellules cancéreuses rénales UOK262 (Johnson *et al.*, 2018) et dans les cellules HeLa (Herman *et al.*, 2013), témoignant d'un stress basal dans ces cellules, sans que ce stress soit suffisant pour induire une entrée en sénescence. Enfin, une augmentation temps dépendant du nombre de foci moyen par noyau est observée dans les cellules traitées avec 2 μ M d'AIM2 et d'AIM3. La différence entre les cellules non traitées et traitées ne devient significative qu'au bout de 72h de traitement, avec environ 6 foci de colocalisation par noyau de cellules marquées (**Figure 50**).

Ces résultats permettent de mettre en évidence la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à générer des cassures doubles brins de l'ADN dès 72h de traitement dans les cellules MDA-MB231, qui corrèle avec les changements morphologiques et l'induction de la sénescence observés précédemment.

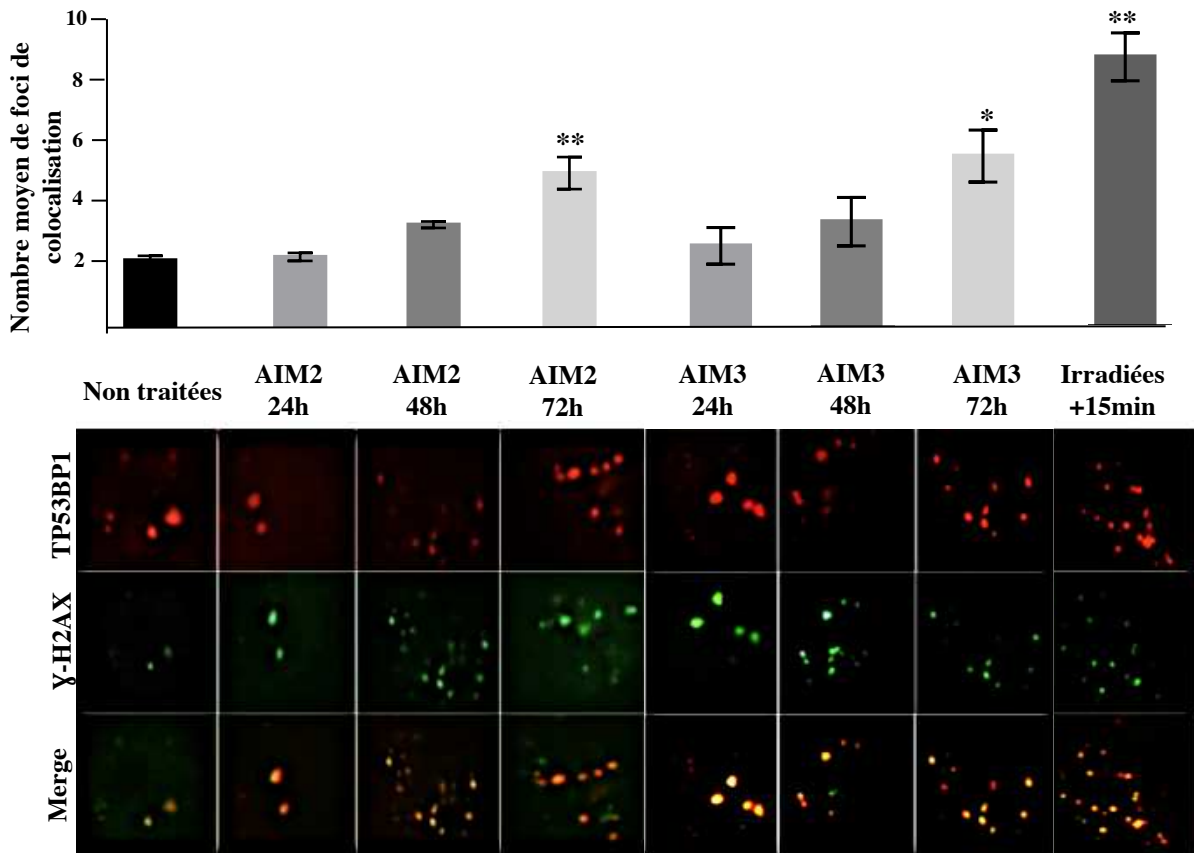


Figure 50. Effet des molécules AIM2 et AIM3 sur la formation de cassures doubles brins de l'ADN dans les cellules MDA-MB231. Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 24h, 48h ou 72h avant marquage. Parallèlement, des cellules ont étéensemencées puis irradiées pendant 1 min par des rayons ionisants utilisés en radiothérapie (2 Greys). Les cellules irradiées ont été laissées en culture 15 min post-irradiation avant fixation. Le marquage a été réalisé par l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre la forme phosphorylée d'H2AX (γ H2AX) et contre la protéine TP53BP1. Après visualisation, le nombre moyen de cellules présentant un co-marquage γ H2AX-TP53BP1 a été comptabilisé. Au sein de ces cellules co-marquées, le nombre de foci a été compté sur 50 cellules par condition. Les résultats, issus d'au moins 3 expériences indépendantes, correspondent au ratio entre le nombre de co-foci et le nombre de cellules co-marquées. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Les marquages de la SA- β -Galactosidase ont mis en évidence un maintien de la sénescence induite par AIM2 et AIM3 dans la lignée cancéreuse MDA-MB231, et ce même après 144h de traitement (**Figure 46**). Or, la présence de lésions de l'ADN est essentielle au maintien de la sénescence au cours du temps (D'Adda Di Fagagna, 2008). La suite du travail a été de mettre en relation le maintien dans le temps de la sénescence induite par AIM2 et AIM3 dans les cellules MDA-MB231 avec un maintien de la présence de cassures doubles brins. Afin d'adapter le contrôle positif, les cellules irradiées ont été laissées en culture 3h ou 5h après irradiation. Dans les cellules MDA-MB231 traitées pendant 96h avec AIM2 ou AIM3, le nombre moyen de foci est d'environ 8 par noyau, alors qu'il était de 6 dans les cellules traitées pendant 72h (**Figure 51**). Ce nombre moyen passe à 10 dans les cellules traitées pendant 120h, sans qu'aucune différence statistique n'apparaisse entre 96h et 120h de traitement.

Ces résultats permettent donc de démontrer la présence de cassures doubles brins induites par AIM2 et AIM3 dans les cellules MDA-MB231, même à des temps longs. La présence de ces lésions permet d'expliquer le maintien dans le temps de la sénescence induite par les complexes.

De plus, le nombre moyen de foci de colocalisation dans les cellules MDA-MB231 traitées avec AIM2 ou AIM3 reste toujours significativement inférieur à celui des cellules exposées à des rayonnements de radiothérapie, et laissées en culture 3h et 5h (**Figure 51**). Une analyse du clivage de PARP a révélé que seul le temps 5h post-irradiation induit une entrée en apoptose des cellules MDA-MB231. Ainsi, bien que les complexes AIM2 et AIM3 soient capables d'induire la formation de cassures doubles brins, leur nombre n'est pas suffisant pour induire une entrée en apoptose. Pour autant, ces lésions pourraient fragiliser la molécule d'ADN, rendant les cellules sensibles à des agents ciblant l'ADN et provoquant une entrée en apoptose. Pour tester cette hypothèse, une exposition à des rayons ultraviolets, connus pour induire des lésions de l'ADN, a été réalisée après différents prétraitements des cellules MDA-MB231 avec les complexes AIM2 et AIM3. Les résultats montrent qu'une exposition aux UVs induit une entrée en apoptose des cellules non traitées, ce résultat étant attendu puisque des lésions de l'ADN induit par ce type de rayonnements conduisent généralement les cellules vers l'apoptose (Almnaseer and Mourta-Maarabouni, 2018) (**Figure 52**). De manière intéressante, le prétraitement de 24h avec la molécule AIM2 sensibilise les cellules MDA-MB231 à la mort induite par les UVs, se traduisant par un doublement du niveau relatif de PARP clivé par rapport aux cellules non traitées exposées aux UVs (**Figure 52**). Afin de savoir si le temps de culture

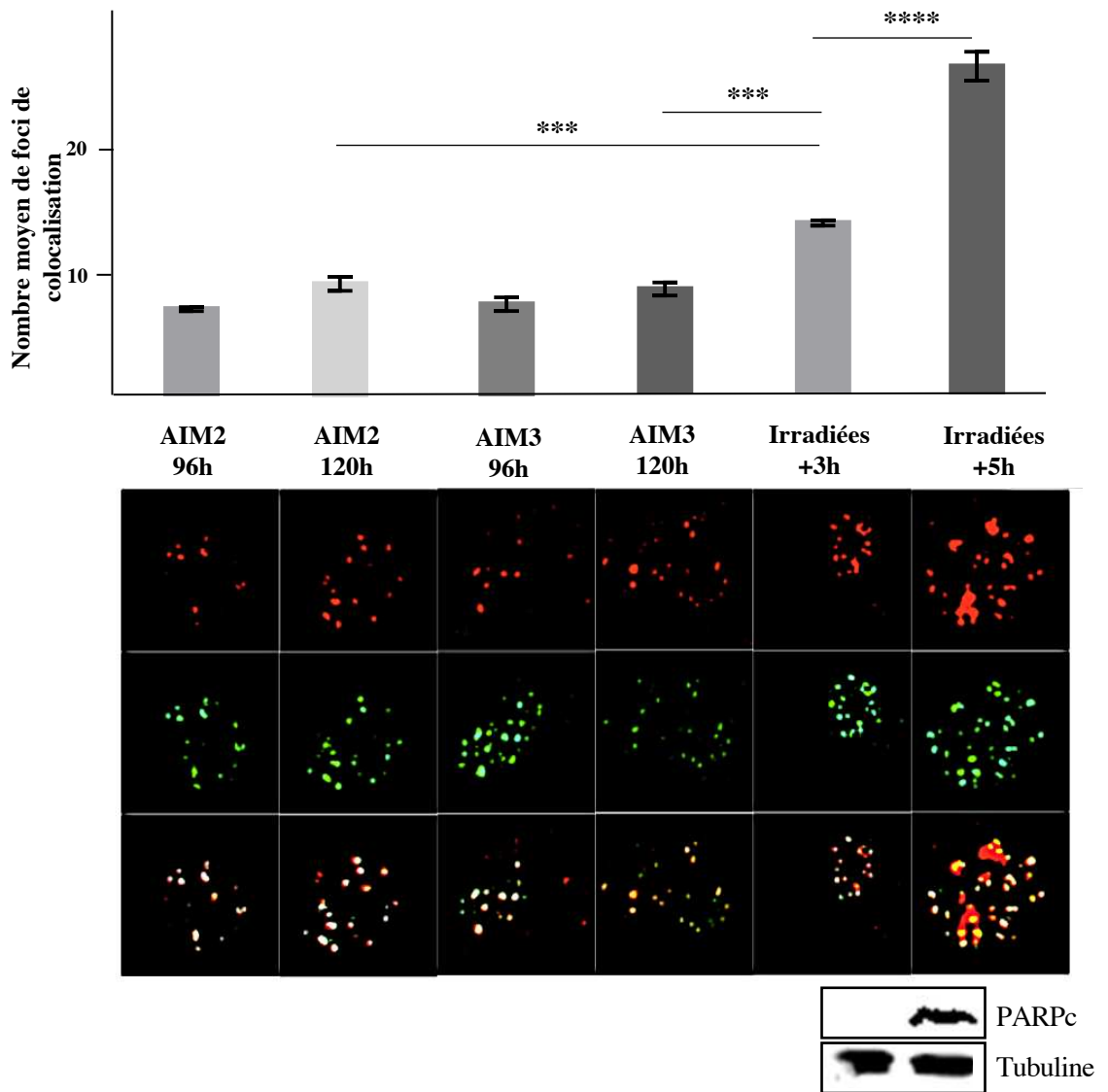


Figure 51. Effet du temps de traitement avec AIM2/3 et du temps post-irradiation dans les cellules MDA-MB231. Les cellules ont été traitées avec 2 μM d'AIM3 pendant 96h ou 120 avant marquage. Parallèlement, des cellules ont été ensemencées puis irradiées pendant 1 min par des rayons ionisants utilisés en radiothérapie (2 Greys). Les cellules irradiées ont été laissées en culture 3h ou 5h post-irradiation avant marquage, ou avant récupération des protéines totales et révélation de la forme clivée de PARP et de la tubuline après migration électrophorétique et transfert sur membrane PVDF. Le marquage a été réalisé par l'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre la forme phosphorylée d'H2AX (γH2AX) et contre la protéine TP53BP1. Après visualisation, le nombre moyen de cellules présentant un co-marquage $\gamma\text{H2AX-TP53BP1}$ a été comptabilisé. Au sein de ces cellules co-marquées, le nombre de foci a été compté sur 50 cellules par condition. Les résultats, issus d'au moins 3 expériences indépendantes, correspondent au ratio entre le nombre de co-foci et le nombre de cellules co-marquées. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

post-exposition avait une influence sur cet effet sensibilisateur, les mêmes expériences ont été réalisées, mais les cellules ont été laissées en culture seulement 4h post-irradiation. Ce nouveau plan expérimental a également permis de réaliser des prétraitements d'1h et de 4h avec AIM2, ce qui n'était pas le cas dans les expériences précédentes. Les résultats montrent qu'une entrée en apoptose des cellules non traitées a également lieu lorsque les cellules sont laissées 4h en culture après irradiation. De plus, un prétraitement de 24h avec AIM2 permet également d'observer une potentialisation de l'effet pro-apoptotique des UVs, se caractérisant par une augmentation d'un facteur 2,5 du marquage PARP clivé par rapport aux cellules non traitées et irradiées. De manière intéressante, les prétraitements d'1h et 4h ne permettent pas d'observer une quelconque potentialisation (**Figure 52**). Ces données suggèrent donc qu'un prétraitement de 24h avec AIM2 de la lignée MDA-MB231 sensibilise les cellules à la mort induite par les UVs, ce qui pourrait être dû à la fragilisation de l'ADN par le complexe.

II. 3. Conclusion

Ces travaux ont permis de mettre en évidence la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à inhiber la prolifération des cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et MCF-7 par induction de la sénescence. Un maintien de la sénescence dans ces lignées, se traduisant par une absence de reprise de la prolifération, est observé une fois le traitement arrêté. Une induction de la sénescence a également été observée en présence de la molécule AIM3 dans la lignée mammaire saine MCF-10A. Lorsqu'AIM3 est retirée du milieu de culture, une reprise de la prolifération associée à une sortie de l'état de sénescence a été observée.

Cet état de sénescence induit par les complexes AIM2 et AIM3 s'accompagne de changements morphologiques. De plus, la capacité des complexes AIM2 et AIM3 à induire un stress oxydatif et à générer des cassures doubles brins pourrait être impliqués dans l'établissement et le maintien de la sénescence cellulaire. En plus de leur implication dans la sénescence, les lésions de l'ADN pourraient être à l'origine de l'effet sensibilisateur des complexes face à la mort induite par les rayons UVs. La suite de ce travail avait pour but d'analyser la capacité des complexes AIM2 et AIM3 à sensibiliser les cellules mammaires à différents agents thérapeutiques. Plus précisément, l'effet sensibilisateur des complexes face à des traitements prescrits dans le cadre de nombreux cancers, dont celui du sein au travers du Tamoxifène, de la Doxorubicine, du 5-Fluorouracile et de la radiothérapie, a été étudié. En effet, la caractérisation de molécules capable de potentialiser l'effet de différents traitements

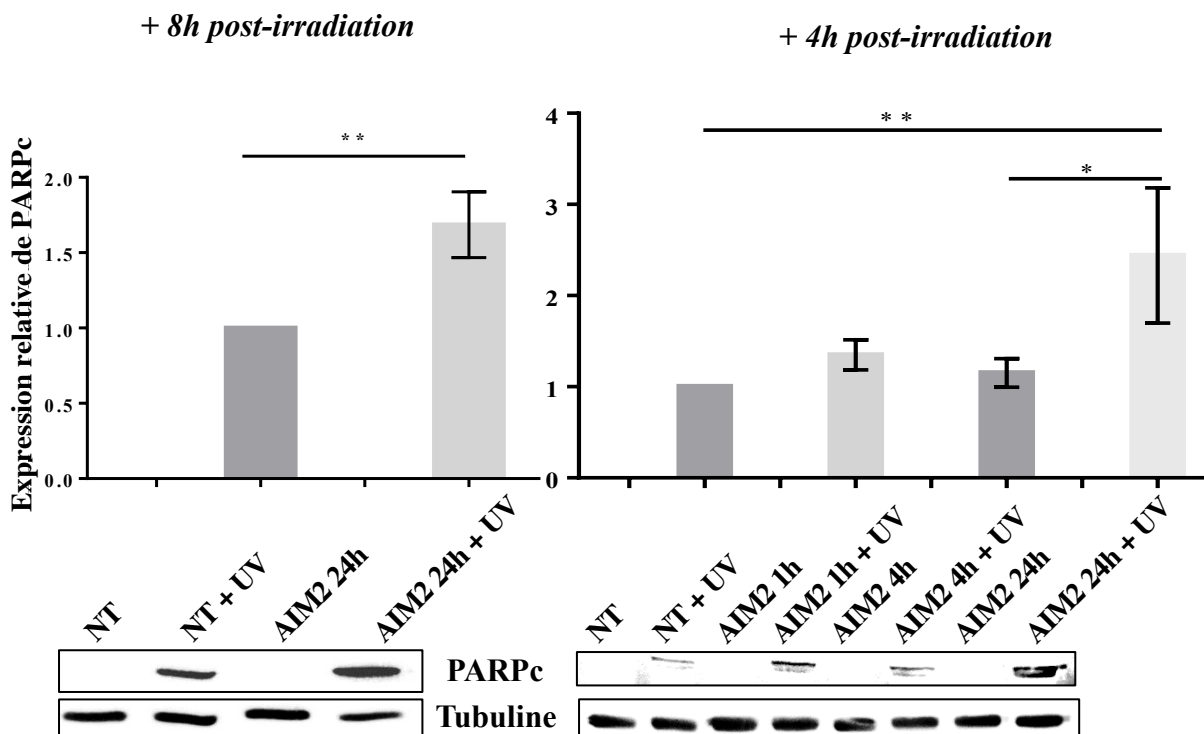


Figure 52. Effet potentialisateur de la molécule AIM2 face à la mort induite par les UVs dans les cellules MDA-MB231. (A) Les cellules ont été ensemencées, puis traitées avec 2 μ M d'AIM2 pendant 24h. A la fin des traitements, une exposition aux UVs a été réalisée pendant 30 secondes à 0,2 Joules. 8h après irradiation, les cellules ont été collectées, et les protéines extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes suivie d'un transfert sur membrane PVDF. La présence de la forme clivée de PARP (PARPc) et de la tubuline a été révélée par l'utilisation d'anticorps spécifiques. **(B)** Les cellules ont été traitées avec 2 μ M d'AIM2 pendant 1h, 4h ou 24h. A la fin des traitements, les cellules ont été exposées aux UVs comme précédemment, puis laissées en culture 4h post-irradiation. Ensuite, une électrophorèse en conditions dénaturantes a été réalisée avant marquage de la forme clivée de PARP (PARPc) et de la tubuline. Les résultats correspondent à au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

anticancéreux permet d'envisager une réduction de doses de chimiothérapie ou de radiothérapie, limitant les effets secondaires.

III. Effet d'un prétraitement avec AIM2 ou AIM3 sur la sensibilité de cellules tumorales mammaires à différents traitements anticancéreux

Pour cette étude, le temps de prétraitement avec AIM2 ou AIM3 a été fixé à 24h car les complexes sont capables dès 24h 1) d'inhiber la prolifération cellulaire, aboutissant à une potentielle sensibilisation des cellules à différents traitements cancéreux, 2) de sensibiliser les cellules MDA-MB231 à la mort induite par les UVs, et 3) d'induire une déméthylation de l'ADN, potentiellement associée à une réinduction de gènes impliqués dans la sensibilité à différents agents cytotoxiques. Pour cette étude, deux lignées cancéreuses mammaires ont été utilisées : une lignée exprimant le récepteur aux œstrogènes ER α (T47D) et une lignée ER α négative (MDA-MB231). Une lignée mammaire non cancéreuse a également été utilisée (MCF-10A).

Pour étudier l'effet sensibilisateur des complexes, la synergie d'action entre AIM2 ou AIM3 et différents agents anticancéreux a été étudiée selon la méthode de Chou Talalay (Chou, 2010). Pour cela, les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A ont été prétraitées avec des doses croissantes d'AIM2/3 pendant 24h, puis les cellules ont été mises en présence de différentes concentrations d'agents de chimiothérapie pendant 48h. La viabilité cellulaire a ensuite été déterminée par coloration au cristal violet, et les valeurs pour chaque condition ont été traitées avec le logiciel CompuSyn, qui permet de déterminer le niveau de synergie entre deux molécules au travers d'un indice de combinaison (CI). Des CI inférieurs à 1 traduisent une synergie d'action, sans que la valeur du CI ne soit représentative de l'intensité de la synergie. Des CI égaux ou supérieurs à 1 traduisent respectivement un effet additif et un effet antagoniste.

Lignée cancéreuse ERa - MDA-MB231

Dose d'AIM (μM) + Dose de Tamoxifène (μM)	Combinaison Index (CI)	
	AIM2 + Tamoxifène	AIM3 + Tamoxifène
0,5 + 1,25	0,41	0,65
1 + 2,5	0,88	0,46
2 + 5	0,33	0,91
3 + 7,5	0,27	0,51
4 + 10	0,30	0,85

Lignée cancéreuse ERa + T47D

Dose d'AIM (μM) + Dose de Tamoxifène (μM)	Combinaison Index (CI)	
	AIM2 + Tamoxifène	AIM3 + Tamoxifène
0,5 + 1,25	0,04	0,15
1 + 2,5	0,06	0,26
2 + 5	0,12	0,24
3 + 7,5	0,01	0,09
4 + 10	0,01	0,13

Lignée mammaire saine MCF-10A

Dose d'AIM (μM) + Dose de Tamoxifène (μM)	Combinaison Index (CI)	
	AIM2 + Tamoxifène	AIM3 + Tamoxifène
0,5 + 1,25	0,53	0,66
1 + 2,5	0,65	0,49
2 + 5	0,48	0,36
3 + 7,5	0,59	0,34
4 + 10	0,96	0,88

Figure 53. Etude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou du Tamoxifène. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées à des doses croissantes d'AIM2/3 pendant 24h et/ou à des doses croissantes de Tamoxifène pendant 48h. Les valeurs d'absorbance du cristal violet ont été moyennées et normalisées par rapport aux cellules non traitées. Ces valeurs ont été insérées dans le logiciel CompuSyn qui permet de quantifier le niveau de synergie entre molécules sous la forme d'un Combinaison Index. Les $CI < 1$ et $CI > 1$ traduisent respectivement une synergie d'action et un effet antagoniste.

III. 1. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires au Tamoxifène

Le Tamoxifène est un antagoniste d'ER α correspondant au traitement de référence pour les tumeurs hormono-sensibles, qui expriment les récepteurs aux œstrogènes. L'absence d'expression d'ER α dans les tumeurs triples négatives empêche le recours au Tamoxifène, ce qui participe au mauvais pronostic de ce type de tumeurs. Des études *in vitro* ont montré que l'inhibition de l'expression du gène *ESR1* codant ER α dans les cellules tumorales triples négatives MDA-MB231 est due à une hyperméthylation du promoteur du gène (Ottaviano *et al.*, 1994). Dans ce sens, le recours à un agent déméthylant (la 5-azadésoxycytidine), en association avec un inhibiteur des Histones Désacétylases (la Trichostatine A) permet de réinduire l'expression d'ER α dans la lignée MDA-MB231, et de restaurer une sensibilité au Tamoxifène (Sharma *et al.*, 2006). La capacité des complexes à réinduire l'expression d'*ESR1* dans la lignée MDA-MB231, potentiellement responsable d'une sensibilisation des cellules au Tamoxifène, a donc été étudiée.

Les résultats de cristal violet indiquent que toutes les combinaisons de doses d'AIM2/3 et de Tamoxifène permettent d'observer une synergie d'action dans les cellules MDA-MB231, se caractérisant par des CI inférieurs à 1 (**Figure 53**). Cet effet sur la prolifération/viabilité cellulaire pouvant être la conséquence d'une mort cellulaire accrue, le clivage de PARP a été étudié par Western Blot dans les cellules MDA-MB231. Un traitement de 48h au Tamoxifène des cellules MDA-MB231 ne permet pas d'observer de marquage PARP clivé (**Figure 54**). Ce résultat n'est pas surprenant puisque ces cellules sont décrites pour être insensibles au Tamoxifène par l'absence d'expression d'ER α . Enfin, un prétraitement des cellules MDA-MB231 avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3 pendant 24h suivi d'un traitement de 48h avec 5 μ M de Tamoxifène ne permet pas d'observer d'apparition de bandes correspondant à la forme clivée de PARP.

Pour étudier la capacité de la molécule AIM2 à réinduire l'expression d'ER α , les cellules MDA-MB231 ont été traitées pendant 1h, 4h et 24h avec 2 μ M d'AIM2. Malheureusement, malgré de nombreuses mises au point, les résultats de qPCR n'ont pas permis d'observer de réinduction de l'expression du gène codant ER α , ce qui était le cas en présence de 5-azadésoxycytidine et de TSA, servant de contrôle positif (**Figure 55**).

Les résultats pour la lignée ER α négative MDA-MB231 indiquent donc que les complexes AIM2 et AIM3 ne permettent pas de restaurer une sensibilité au Tamoxifène,

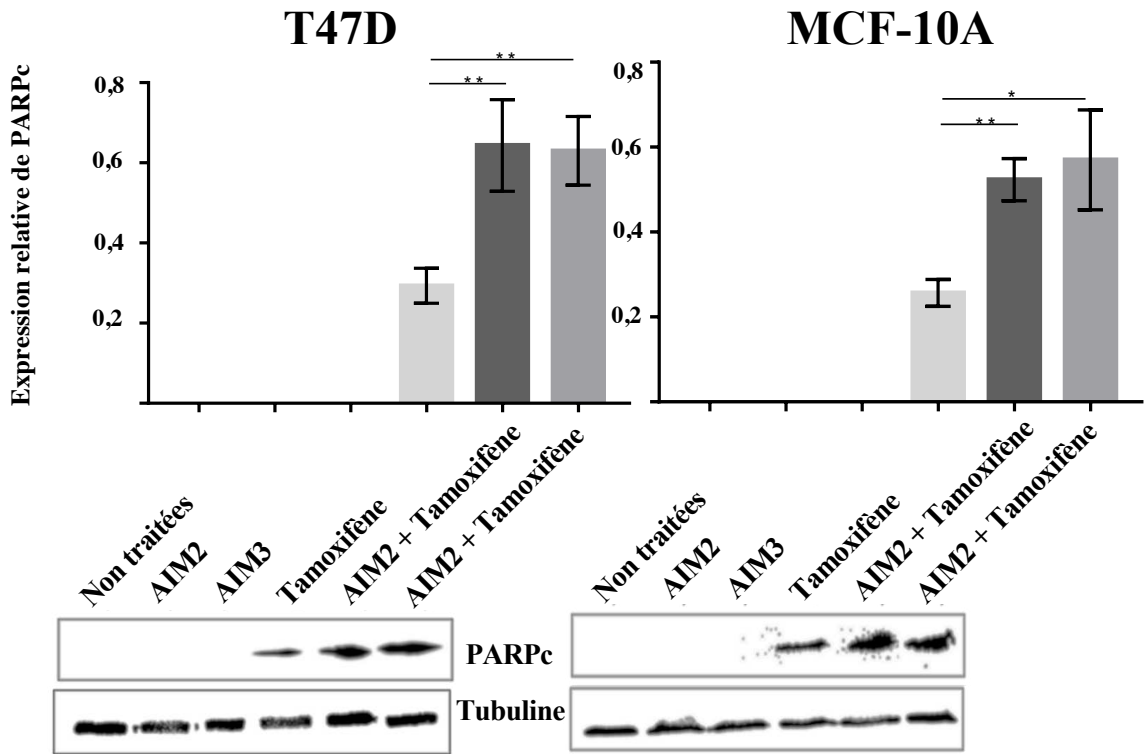
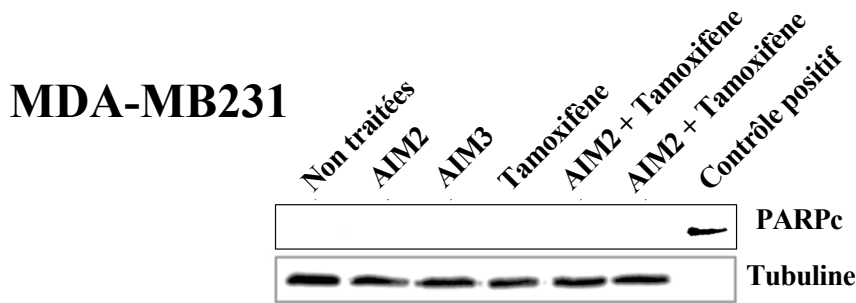


Figure 54. *Etude de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à sensibiliser les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A au Tamoxifène. Après traitement de 24h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, suivi ou non d'un traitement avec 5 μ M de Tamoxifène pendant 48h, les cellules ont été collectées. Les protéines totales extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes, suivies d'un transfert sur membrane PVDF. Les bandes correspondantes à la forme clivée de PARP (PARPc) et à la tubuline ont été révélées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Pour les cellules MDA-MB231, le dépôt d'un marqueur positif d'apoptose a été réalisé. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.*

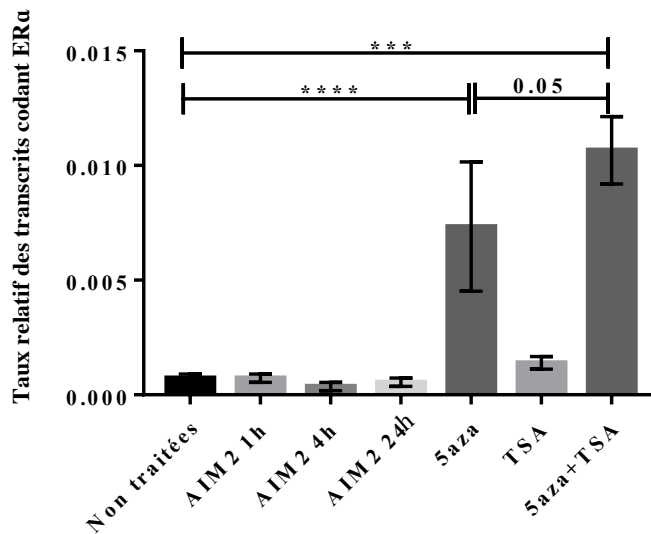


Figure 55. Etude de la capacité du complexe AIM2 à réinduire l'expression du gène codant ERα dans la lignée triple négative MD-MB231. Les cellules MDA-MB231 ont été traitées avec soit 2 μ M d'AIM2 pendant 1h, 4h ou 24h, soit 5 μ M de 5aza (5-aza-2-désoxycytidine) pendant 72h et/ou 100 ng/mL de TSA (Trichostatine A) pendant 16h. Les ARNs totaux ont été extraits, et des RT-PCR ont été réalisées en utilisant des amorces permettant l'amplification des ARNm codant ERα et GAPDH (invariant). Les résultats, issus de 3 expériences indépendantes, sont présentés sous la forme du ratio ERα/GAPDH. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

AIM2/3+Tamoxifène		Lignées mammaires cancéreuses		Lignée mammaire saine
		MDA-MB231	T47D	MCF-10A
AIM2	Synergie (CI)	Oui	Oui	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Aucun	Oui	Oui
AIM3	Synergie (CI)	Oui	Oui	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Aucun	Oui	Oui

Tableau 6. Tableau récapitulatif des résultats de synergie (CI) après coloration au cristal violet et des résultats de potentialisation par l'étude du clivage de PARP (cPARP) dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A en présence d'AIM2/3 et de Tamoxifène. Concernant la synergie, seuls les résultats pour les doses 2 μ M d'AIM2/3 utilisés pour les expériences de clivage de PARP sont présentés sous la forme « Oui » et « Non » traduisant respectivement la présence et l'absence de synergie d'action. Quant à la potentialisation, les résultats sont résumés sous la forme « Oui » signifiant que le marquage PARP clivé est significativement plus intense dans les conditions « AIM + Tamoxifène » par rapport aux conditions « Tamoxifène », et « Aucun » traduisant l'absence de marquage de PARP clivé dans toutes les conditions. Les rectangles rouges mettent en évidence les discordances entre synergie et potentialisation.

probablement en lien avec l'incapacité de la molécule AIM2 à réinduire l'expression de la cible du Tamoxifène, la protéine ER α . Pour autant, une synergie d'action a été observée entre AIM2 ou AIM3 et le Tamoxifène, qui pourrait traduire une potentialisation de l'effet antiprolifératif du Tamoxifène, plutôt que de son effet cytotoxique.

L'étude de l'effet sensibilisateur d'AIM2/3 face au Tamoxifène a également été réalisée dans les cellules ER α positives T47D, afin de voir si les complexes permettaient également d'améliorer la réponse de ces cellules. Les mêmes expériences ont été réalisées dans la lignée mammaire saine MCF-10A. Une synergie d'action entre les complexes AIM2 ou AIM3, et l'agent d'hormonothérapie a été observée dans les cellules T47D et MCF-10A, et ce à toutes les combinaisons de doses (**Figure 53**). Les résultats de l'étude du clivage de PARP indiquent que les cellules T47D et MCF-10A sont sensibles à l'effet cytotoxique du Tamoxifène utilisé à la dose de 5 μ M. De plus, une augmentation significative du clivage de PARP a été observée dans les conditions « AIM2/3 + Tamoxifène » par rapport aux conditions « Tamoxifène » (**Figure 54**).

En conclusion, la synergie d'action entre AIM2/3 et le Tamoxifène observée dans les cellules cancéreuses mammaires T47D et la lignée mammaire saine MCF-10A se traduit par une potentialisation de l'effet pro-apoptotique de l'agent d'hormonothérapie (**Tableau 6**). Au contraire, les complexes AIM2/3 ne permettent pas de rendre les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 sensibles à l'effet cytotoxique du Tamoxifène, bien qu'une synergie d'action ait été observée (**Tableau 6**).

III. 2. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires à la Doxorubicine et au 5-Fluorouracile

La capacité des molécules AIM2 et AIM3 à sensibiliser les lignées cellulaires MDA-MB231, T47D et MCF-10A à deux agents de chimiothérapie couramment utilisés dans la prise en charge du cancer du sein (Doxorubicine et 5-Fluorouracile) a été testée.

Comme précédemment, la synergie d'action entre AIM2/3 et les agents de chimiothérapie a été étudiée *via* la détermination des CI.

Lignée cancéreuse ERa - MDA-MB231

Dose d'AIM (μ M) + Dose de Doxorubicine (ng/mL)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + Doxorubicine	AIM3 + Doxorubicine
0,5 + 12,5	0,36	0,21
1 + 25	0,29	0,28
2 + 50	0,53	0,44
3 + 75	1,21	0,41
4 + 100	1,06	0,51

Lignée cancéreuse ERa + T47D

Dose d'AIM (μ M) + Dose de Doxorubicine (ng/mL)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + Doxorubicine	AIM3 + Doxorubicine
0,5 + 12,5	0,38	0,50
1 + 25	0,41	0,85
2 + 50	0,52	0,90
3 + 75	0,60	0,75
4 + 100	0,66	0,45

Lignée mammaire saine MCF-10A

Dose d'AIM (μ M) + Dose de Doxorubicine (ng/mL)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + Doxorubicine	AIM3 + Doxorubicine
0,5 + 12,5	0,96	0,73
1 + 25	0,25	0,36
2 + 50	0,54	0,64
3 + 75	0,41	0,39
4 + 100	0,46	0,44

Figure 56. Etude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou de la Doxorubicine. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées à des doses croissantes d'AIM2/3 pendant 24h et/ou à des doses croissantes de Doxorubicine pendant 48h. Les valeurs d'absorbance du cristal violet ont été moyennées et normalisées par rapport aux cellules non traitées. Ces valeurs ont été insérées dans le logiciel CompuSyn qui permet de quantifier le niveau de synergie entre molécules sous la forme d'un Combination Index. Les $CI < 1$ et $CI > 1$ traduisent respectivement une synergie d'action et un effet antagoniste.

La quasi-totalité des combinaisons de doses permettent d'observer une synergie d'action entre AIM2/3 et la Doxorubicine dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231, T47D et MCF-10A, se traduisant par des CI inférieurs à 1 (**Figure 56**). Seules les combinaisons 3 μ M d'AIM2 + 75 ng/mL de Doxorubicine et 4 μ M d'AIM2 + 100 ng/mL de Doxorubicine dans les cellules MDA-MB231 ne permettent pas d'observer de synergie, se caractérisant par des CI respectifs de 1,21 et 1,06 (**Figure 56**).

Les résultats de clivage de PARP ont révélé qu'un traitement de 50 ng/mL de Doxorubicine induit une entrée en apoptose des lignées cancéreuses MDA-MB231 (**Figure 58**) et T47D (**Figure 59A**), mais pas des cellules MCF-10A (**Figure 59B**). Ces résultats mettent donc en lumière des différences de sensibilité à la dose utilisée de Doxorubicine selon les modèles cellulaires. Ensuite, un prétraitement des cellules MDA-MB231 (**Figure 58**) et T47D (**Figure 59A**) avec 2 μ M d'AIM2 ou AIM3, suivi d'un traitement avec 50 ng/mL de Doxorubicine permet d'observer un clivage de la protéine PARP significativement plus intense comparé à la condition Doxorubicine seule, à l'origine de la synergie d'action observée précédemment. Ces données indiquent donc que les molécules AIM2 et AIM3 potentialisent l'effet pro-apoptotique de la Doxorubicine, et ce uniquement dans les cellules tumorales mammaires MDA-MB231 et T47D, en épargnant les cellules mammaires saines MCF-10A, dans lesquelles aucun clivage de PARP n'est pas observé bien qu'une synergie d'action ait été observée dans ces cellules (**Figure 59B**).

Toutes les combinaison d'AIM3 et de 5-Fu permettent d'observer une synergie d'action dans les lignées MDA-MB231 et T47D (**Figure 57**). Au contraire, aucune synergie d'action, se traduisant par des CI supérieurs à 1, n'a été observée entre AIM2 et le 5-Fu dans ces lignées, quelques soient les doses. Enfin, dans les cellules MCF-10A, une synergie d'action entre AIM2/AIM3 et le 5-Fu est observée à toutes les doses (**Figure 57**).

L'analyse du clivage de PARP a permis de montrer que l'absence de synergie observée en présence d'AIM2 dans les lignées MDA-MB231 (**Figure 58**) et T47D (**Figure 59A**) se traduit par une absence de potentialisation de l'effet pro-apoptotique du 5-Fu. Au contraire, dans ces deux lignées, la synergie d'action observée entre AIM3 et l'agent de chimiothérapie est associée à une potentialisation de l'effet cytotoxique du 5-Fu. Enfin, alors qu'une synergie avait été observée entre AIM2 ou AIM3 et le 5-Fu dans la lignée MCF-10A, aucune induction de l'apoptose n'a été observée dans cette lignée, quelque soit la condition (**Figure 59B**).

Lignée cancéreuse ERa - MDA-MB231

Dose d'AIM (μ M) + Dose de 5-Fluorouracile (μ M)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + 5-Fu	AIM3 + 5-Fu
0,5 + 12,5	2,00	0,53
1 + 25	2,70	0,44
2 + 50	3,44	0,47
3 + 75	4,80	0,43
4 + 100	6,00	0,43

Lignée cancéreuse ERa + T47D

Dose d'AIM (μ M) + Dose de 5-Fluorouracile (μ M)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + 5-Fu	AIM3 + 5-Fu
0,5 + 12,5	2,90	0,96
1 + 25	1,14	0,79
2 + 50	2,28	0,61
3 + 75	3,42	0,47
4 + 100	2,46	0,46

Lignée mammaire saine MCF-10A

Dose d'AIM (μ M) + Dose de 5-Fluorouracile (μ M)	Combination Index (CI)	
	AIM2 + 5-Fu	AIM3 + 5-Fu
0,5 + 12,5	0,50	0,94
1 + 25	0,56	0,93
2 + 50	0,70	0,71
3 + 75	0,49	0,20
4 + 100	0,54	1,00

Figure 57. Etude des indices de combinaisons (CI) obtenus après traitement des cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec AIM2/3 et/ou de 5-Fluorouracile. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées à des doses croissantes d'AIM2/3 pendant 24h et/ou à des doses croissantes de 5-Fluorouracile pendant 48h. Les valeurs d'absorbance du cristal violet ont été moyennées et normalisées par rapport aux cellules non traitées. Ces valeurs ont été insérées dans le logiciel CompuSyn qui permet de quantifier le niveau de synergie entre molécules sous la forme d'un Combination Index. Les $CI < 1$ $CI = 1$ et $C > 1$ traduisent respectivement une synergie d'action, un effet additif et un effet antagoniste.

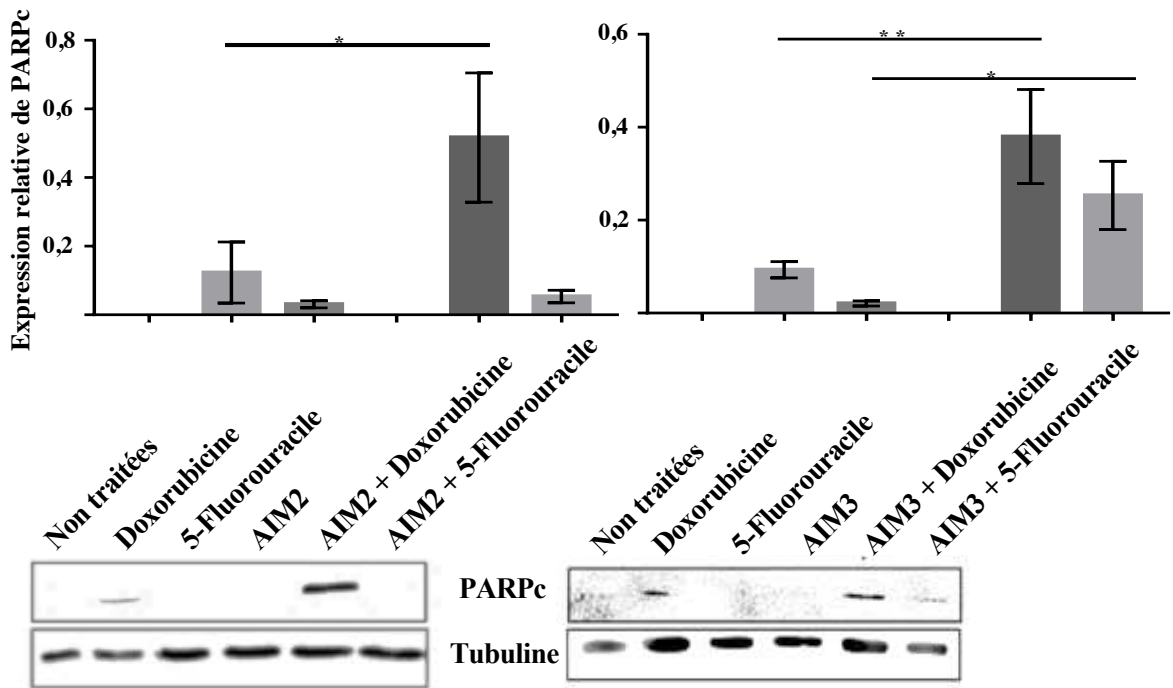
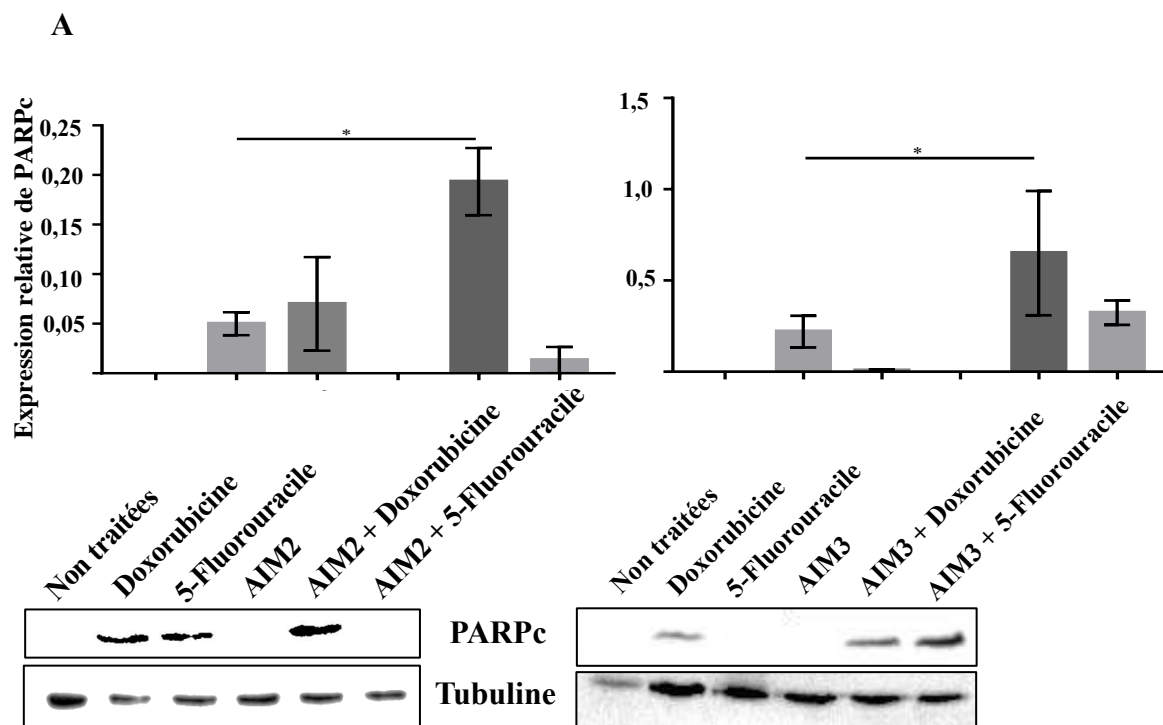


Figure 58. Etude de l'effet sensibilisateur des molécules AIM2 et AIM3 dans les cellules MDA-MB231. Après traitement de 24h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, suivi ou non d'un traitement avec 50 ng/mL de Doxorubicine ou 50 μ M de 5-Fluorouracile pendant 48h, les cellules ont été collectées. Les protéines totales extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes, suivies d'un transfert sur membrane PVDF. Les bandes correspondantes à la forme clivée de PARP (PARPc) et à la tubuline ont été révélées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



B

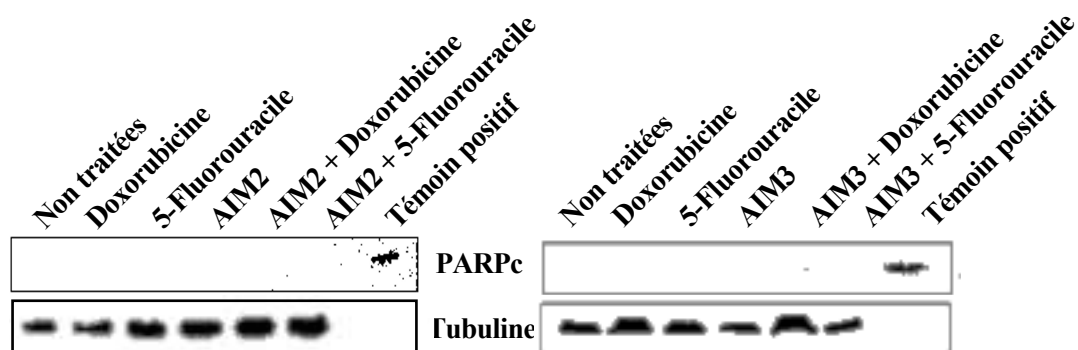


Figure 59. Etude de l'effet sensibilisateur des molécules AIM2 et AIM2 dans les cellules T47D (A) et MCF-10A (B). Après traitement de 24h avec 2 μ M d'AIM2 ou d'AIM3, suivi ou non d'un traitement avec 50 ng/mL de Doxorubicine ou 50 μ M de 5-Fluorouracile pendant 48h, les cellules ont été collectées. Les protéines totales extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes, suivies d'un transfert sur membrane PVDF. Les bandes correspondantes à la forme clivée de PARP (PARPc) et à la tubuline ont été révélées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Pour les cellules MCF-10A, le dépôt d'un marqueur positif d'apoptose a été réalisé. Les résultats sont issus d'au moins 3 expériences indépendantes. * $p < 0,05$.

Ces résultats indiquent que seule la molécule AIM3 permet d'observer une synergie d'action dans les modèles cellulaires de tumeurs mammaires, se traduisant par une sensibilisation des cellules à l'effet cytotoxique du 5-Fu, ce qui n'est pas le cas pour la molécule AIM2

En conclusion, les synergies d'action observées entre AIM2/3 et la Doxorubicine et entre AIM3 et le 5-Fu dans les lignées cancéreuses MDA-MB231 et T47D sont associées à une potentialisation de l'effet pro-apoptotique des agents de chimiothérapie (**Tableau 7**).

Dans la lignée MCF-10A, la discordance entre les résultats de synergie et de clivage de PARP (**Tableau 7**) pourrait s'expliquer par une potentialisation de l'effet cytostatique de la Doxorubicine et du 5-Fu par AIM2/3 plutôt que de leurs effets cytotoxiques. Pour tenter de mettre en évidence une potentialisation de l'effet cytostatique de la Doxorubicine et du 5-Fu par AIM3 dans la lignée MCF-10A, une expérience très préliminaire d'analyse du cycle cellulaire a été réalisée. Cette expérience, qui n'a été réalisée qu'une seule fois, met en évidence une légère augmentation du pourcentage de cellules MCF-10A en phase G2/M en présence de Doxorubicine par rapport aux cellules non traitées, suggérant un blocage en phase G2/M en présence de Doxorubicine (**Figure 60**). Un prétraitement avec AIM3 suivi d'un traitement avec de la Doxorubicine ne permet pas d'observer de modification du pourcentage de cellules en phase G2/M. Ensuite, une augmentation de 50% du nombre de cellules en phase G0/G1 a été observée en présence de 5-Fu par rapport aux cellules non traitées. Ce pourcentage ne varie pas lorsque les cellules sont prétraitées avec AIM3 avant d'être mises en présence de 5-Fu. Cette expérience très préliminaire ne permet pas de mettre en évidence une modification de la répartition des cellules MCF-10A entre les conditions « Doxorubicine/5-Fu » et « AIM3 + Doxorubicine/5-Fu ». Autrement dit, cette expérience ne permet pas de conclure que la synergie observée entre AIM3 et la Doxorubicine ou le 5-Fu est due à une potentialisation de l'effet cytostatique des complexes. Pour véritablement étudier cette hypothèse, il conviendra néanmoins de synchroniser les cellules avant traitement.

III. 3. Effet sensibilisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur la réponse des cellules mammaires aux rayons ionisants utilisés en radiothérapie

La radiothérapie est également fréquemment employée dans la prise en charge du cancer du sein. Une partie des recherches en cancérologie vise à caractériser des composés chimiques permettant de sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires à la mort induite par les rayons

AIM2/3+Doxorubicine		Lignées mammaires cancéreuses		Lignée mammaire saine
		MDA-MB231	T47D	MCF-10A
AIM2	Synergie (CI)	Oui	Oui	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Oui	Oui	Aucun
AIM3	Synergie (CI)	Oui	Oui	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Oui	Oui	Aucun

AIM2/3+5-Fluorouracile		Lignées mammaires cancéreuses		Lignée mammaire saine
		MDA-MB231	T47D	MCF-10A
AIM2	Synergie (CI)	Non	Non	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Non	Non	Aucun
AIM3	Synergie (CI)	Oui	Oui	Oui
	Potentialisation (cPARP)	Oui	Oui	Aucun

Tableau 7. Tableau récapitulatif des résultats de synergie (CI) après coloration au cristal violet et des résultats de potentialisation par l'étude du clivage de PARP (cPARP) dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A en présence d'AIM2/3 et de Doxorubicine ou de 5-Fluorouracile. Concernant la synergie, seuls les résultats pour les doses 2 μ M d'AIM2/3 utilisés pour les expériences de clivage de PARP sont présentés sous la forme « Oui » et « Non » traduisant respectivement la présence et l'absence de synergie d'action. Quant à la potentialisation, les résultats sont résumés sous la forme « Oui » signifiant que le marquage PARP clivé est significativement plus intense dans les conditions « AIM + Doxorubicine/5-Fu » par rapport aux conditions « Doxorubicine/5-Fu », « Non » traduisant une absence d'augmentation de l'intensité de PARP clivé, et « Aucun » traduisant l'absence de marquage de PARP clivé dans toutes les conditions. Les rectangles rouges mettent en évidence les discordances entre synergie et potentialisation.

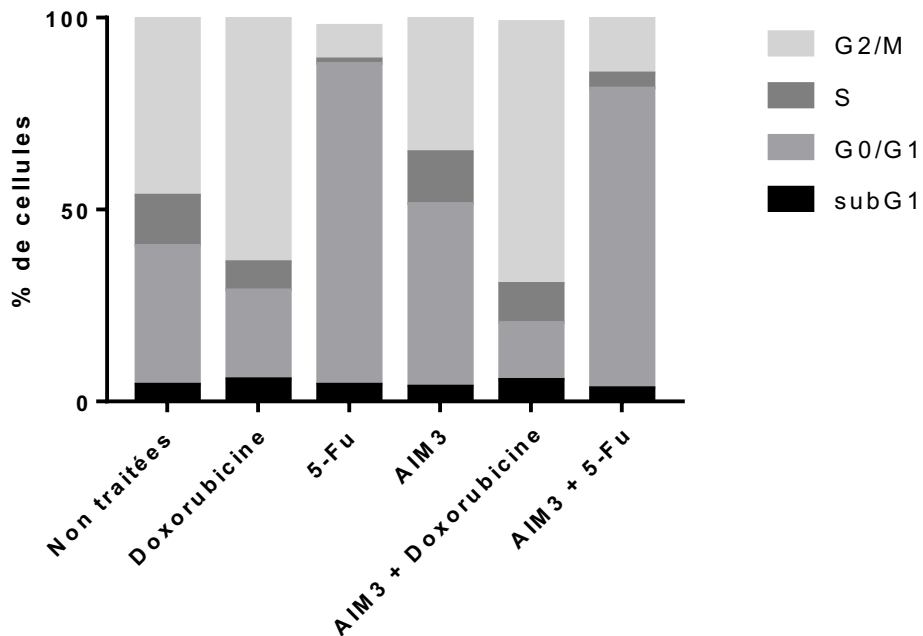


Figure 60. Analyse du cycle cellulaire des cellules mammaires saines MCF-10A traitées avec AIM3 et/ou avec deux agents de chimiothérapie (Doxorubicine et 5-Fluorouracile). 24h après ensemencement, les cellules des conditions « AIM3 », « AIM3 + Doxorubicine » et « AIM3 + 5-Fu » ont été traitées pendant 24h avec 2 μ M d'AIM3. Au bout de 24h, les cellules « Doxorubicine » et « AIM3 + Doxorubicine » ont été traitées avec 50 ng/mL de Doxorubicine pendant 48h, et les cellules « 5-Fu » et « AIM3 + 5-Fu » avec 50 μ M de 5-Fluorouracile. A la fin des traitements, les cellules ont été collectées, perméabilisées et fixées avec de l'éthanol. Les cellules ont ensuite été marquées avec de l'iodure de propidium pendant 15 minutes et analysées par cytométrie de flux. Le résultat présenté correspond à une seule expérience.

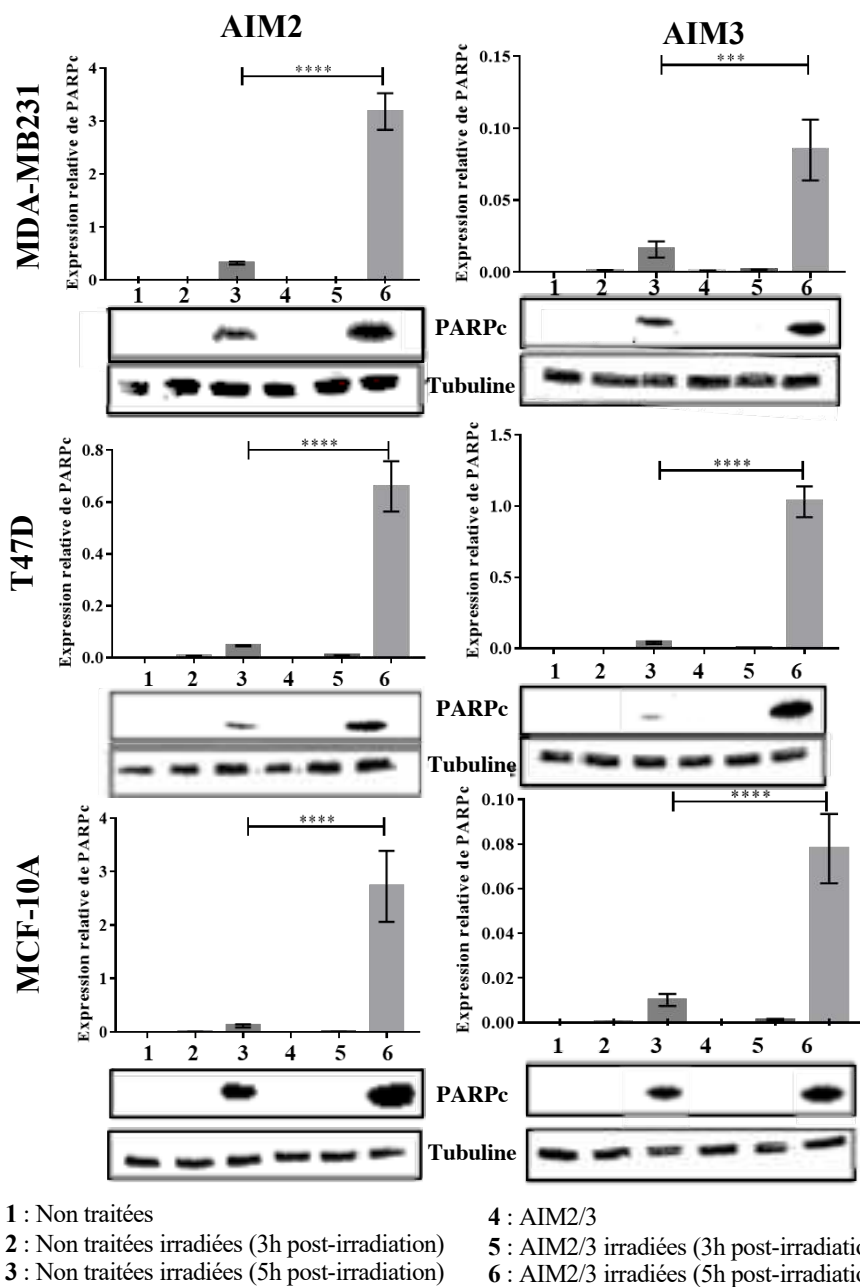


Figure 61. Effet potentialisateur des molécules AIM2/3 face à des rayons ionisants utilisés en radiothérapie dans les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A. Les cellules ont étéensemencées, puis traitées avec 2 μ M d'AIM2/3 pendant 24h. A la fin des traitements, une irradiation a été réalisée pendant 1 minute. 3h ou 5h après irradiation, les cellules ont été collectées, et les protéines extraites ont subi une électrophorèse en conditions dénaturantes puis un transfert sur membrane PVDF. La présence de la forme clivée de PARP (PARPc) et de la tubuline a été révélée par l'utilisation d'anticorps spécifiques. Les résultats correspondent à au moins 3 expériences indépendantes. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

ionisants, notamment dans le but de réduire les doses utilisées et limiter les effets secondaires (Liang *et al.*, 2003)(Matsuno *et al.*, 2018). L'effet radiopotentialisateur des complexes AIM2 et AIM3 sur des lignées mammaires a été étudié.

Pour cela, les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A ont été prétraitées pendant 24h avec 2 μ M d'AIM2/3 avant d'être irradiées. Les cellules ont ensuite été laissées en culture pendant 3h ou 5h. La mesure du clivage de PARP par Western Blot a révélé une entrée en apoptose des trois lignées non traitées au bout de 5h post-irradiation (**Figure 61**). Ces résultats concernant les cellules non traitées permettent donc de confirmer la sensibilité des 3 lignées à la dose de rayons et au temps d'irradiation choisis (2 Greys pendant 1 minute). Néanmoins, la condition 3h post-irradiation ne permet pas d'observer de clivage de PARP, démontrant l'absence d'apoptose. Concernant les 3 lignées cellulaires prétraitées avec AIM2/3, un clivage de PARP significativement plus intense que dans les cellules non traitées a été observé. Ces données indiquent donc que les molécules AIM2 et AIM3 permettent de sensibiliser les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A à la mort cellulaire induite par les rayons ionisants de radiothérapie.

III. 4. Conclusion

Ces travaux ont permis de mettre en évidence une activité potentialisatrice des complexes AIM2 et AIM3 en combinaison avec différents traitements fréquemment utilisés dans la prise en charge du cancer du sein.

En effet, AIM2 et AIM3 permettent de potentialiser l'effet pro-apoptotique d'un agent d'hormonothérapie, le Tamoxifène, dans une lignée tumorale mammaire ER α positive (les cellules T47D) et dans une lignée mammaire saine (les cellules MCF-10A). Dès lors, ces deux complexes pourraient permettre d'améliorer la réponse de tumeurs mammaires hormono-sensibles, bien que des effets secondaires sur des tissus sains pourraient apparaître.

Les deux complexes permettent également d'améliorer la réponse des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et T47D à la Doxorubicine. La réponse de ces deux lignées au 5-Fu est également augmentée en présence du complexe AIM3. De plus, de manière intéressante, ces effets potentialisateurs à la Doxorubicine et au 5-Fu épargnent la lignée mammaire saine MCF-10A. L'ensemble de nos résultats démontrent donc le potentiel intérêt clinique de ces complexes pour le traitement des cancers du sein.

Enfin, les complexes AIM2 et AIM3 permettent de potentialiser l'effet pro-apoptotique de la radiothérapie dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et T47D, et dans la lignée mammaire saine MCF-10A. Les rayonnements ionisants de radiothérapie exercent leur activité anticancéreuse notamment en induisant la formation de lésions de l'ADN. L'effet radiopotentialisateur d'AIM2/3 pourrait également être associé à leur capacité à interagir avec l'ADN et à générer des lésions de ce dernier (**Figures 50 & 60**), qui s'additionneraient à ceux générées par les rayons ionisants. De plus, ces lésions pourraient résulter de l'action des espèces réactives de l'oxygène, dont le taux intracellulaire augmente dans les cellules MDA-MB231 dès 24h de traitement avec AIM2 et AIM3 (**Figure 49**). Ces résultats suggèrent donc que l'utilisation des complexes pourrait permettre d'un point de vue clinique d'améliorer la réponse des tumeurs mammaires à la radiothérapie.

Discussion générale

I. Le gène codant DDB2 comme biomarqueur dans le cancer du sein

L'amélioration des techniques de biologie moléculaire a permis d'identifier des signatures moléculaires propres à chaque tumeur (Cusnir and Cavalcante, 2012). Parmi ces signatures moléculaires, les biomarqueurs sont utilisés en cancérologie pour aider le diagnostic (biomarqueur de diagnostic), prévoir l'agressivité de la tumeur et/ou déterminer le risque de récurrence (biomarqueur de pronostic), et pour prédire la progression métastatique et/ou la réponse au traitement (biomarqueur prédictif) (Goossens *et al.*, 2015). Lors de la découverte d'un cancer du sein, le profil d'expression de 3 récepteurs hormonaux est systématiquement établi : le récepteur aux œstrogènes (ER α), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur HER2. Ces biomarqueurs permettent notamment d'établir le pronostic des tumeurs mammaires. Par exemple, les patientes dont les tumeurs mammaires expriment ER et PR (tumeurs ER+ PR+) ont un meilleur pronostic que les patients dont les tumeurs sont ER- PR- (Arpino *et al.*, 2003). De plus, en absence de traitement, la surexpression d'HER2 est associée à un mauvais pronostic pour les patientes, de par l'implication de la protéine dans le contrôle de la prolifération cellulaire (Press *et al.*, 1997). L'expression de ces marqueurs permet également de prédire la progression métastatique et/ou la réponse des tumeurs aux thérapies. Par exemple, l'expression de la protéine HER2 est prédictif d'un haut risque de progression métastatique de tumeurs mammaires (Ahmed, 2016), mais est également prédictif d'une meilleure réponse aux thérapies ciblées (Gajria and Chandarlapaty, 2011). Concernant le diagnostic des tumeurs mammaires, de plus en plus de recherches se tournent vers la potentielle détection d'ADN tumoral circulant (ctDNA pour circulating tumoral DNA) dans le plasma de patientes (Yu *et al.*, 2019). La présence d'une certaine concentration de ctDNA plasmique, ainsi que la présence de mutations géniques spécifiques (notamment au niveau du gène codant ER α) semble indiquer l'existence de tumeurs mammaires malignes. D'autres biomarqueurs, en plus des 3 récepteurs hormonaux cités, sont utilisés dans le cadre du cancer du sein, notamment le marqueur de prolifération Ki67. Par exemple, la surexpression de Ki67 est associée à une augmentation du risque de progression métastatique (Fasching *et al.*, 2011). En accord avec ces résultats, une forte expression de Ki67 est associée à un mauvais pronostic de tumeurs mammaires (Inwald *et al.*, 2013). Malgré le succès de l'utilisation de l'ensemble de ces biomarqueurs pour le diagnostic, l'établissement du

pronostic, et la prédiction métastatique des tumeurs mammaires, une partie des recherches menées actuellement se focalise sur la caractérisation de nouveaux biomarqueurs, dans le but d'améliorer le diagnostic et la prise en charge du cancer du sein.

La protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2), en plus de son rôle initial dans la réparation des lésions induites par les UVs, est impliquée dans la prolifération de cellules tumorales, leur progression métastatique, et leur réponse à différents traitements. Ce rôle joué par la protéine DDB2, au travers de sa capacité à réguler l'expression de gènes cibles, a été observé dans différents modèles de cancer, dont les cancers ovariens, colorectaux et prostatiques. Ces données *in vitro* ont poussé différentes équipes à étudier la valeur prédictive de la protéine DDB2 dans ces modèles tumoraux.

Dans un premier temps, Han *et al.* ont mis en évidence une diminution de l'expression du gène au cours de la carcinogenèse ovarienne (Han *et al.*, 2014), qui a également été observée dans notre étude. En effet, la comparaison du taux de transcrits codant DDB2 réalisée grâce à la plateforme Oncomine nous a permis d'observer une sous-expression du gène dans les tissus ovariens cancéreux par rapport à leur équivalent sain. Cette inhibition de l'expression de *ddb2* dans les tumeurs ovariennes pourrait permettre aux cellules tumorales ovariennes de conserver leur potentiel prolifératif. En effet, il a été montré qu'une forte expression du gène dans des cellules cancéreuses ovariennes induit une diminution de leur capacité proliférative en les sensibilisant à l'effet antiprolifératif du TGF β (Zhao *et al.*, 2015). L'étude de Han *et al.* a également permis de mettre en évidence une corrélation entre une forte expression de la protéine DDB2 et une survie globale améliorée de patientes atteintes de tumeurs ovariennes.

Par la suite, les travaux de Chen *et al.* indiquent que la protéine DDB2 est plus faiblement exprimée dans les tumeurs prostatiques par rapport aux tissus sains (Chen *et al.*, 2017), comme ce que nous avons observé au travers de la plateforme Oncomine. Par conséquent, DDB2 semble posséder un effet antitumoral limitant la carcinogenèse prostatique. Des études *in vitro* avaient montré que la protéine DDB2 est capable de cibler le récepteur aux androgènes (AR pour Androgen Receptor) permettant son ubiquitinylation par l'E3 Ubiquitine Ligase Cul4A, et conduisant à une dégradation du récepteur (Chang *et al.*, 2012). Ainsi, la sous-expression de *ddb2* dans les tissus prostatiques cancéreux comparés aux tissus sains pourrait induire une stabilisation du taux protéique d'AR, et conduire à une activation AR-dépendante de la prolifération tumorale. Les travaux de Chen *et al.* indiquent également qu'une forte

expression de la protéine DDB2 est associée à une meilleure survie globale des patients atteints de cancers prostatiques.

Concernant le cancer colorectal, des données contradictoires ont été obtenues par les équipes de Roy et Yang, qui avaient observé respectivement une expression de la protéine plus faible et plus forte dans les tumeurs colorectales par rapport aux tissus sains (Roy *et al.*, 2013) (Yang *et al.*, 2018). Nous avons également observé cette contradiction dans notre analyse. En effet, malgré nos critères de sélection, deux jeux de données sont ressortis de l'analyse : l'un montre une surexpression du gène dans les tumeurs colorectales, l'autre dans les tissus colorectaux sains. Ces données soulèvent la question du rôle pro-ou-anti-tumoral de DDB2 dans la carcinogenèse colorectale. Les données *in vitro* semblaient plutôt indiquer un effet antitumoral *via* 2 mécanismes : l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, et l'inhibition de leur capacité invasive. En effet, DDB2 est capable d'inhiber la voie de signalisation Wnt impliquée dans la stimulation de la prolifération cellulaire (Huang *et al.*, 2017b). La protéine est également capable d'inhiber la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules tumorales colorectales en inhibant l'expression de gènes inducteurs comme *Snail*, *ZEB1* et *VEGF* (Roy *et al.*, 2013). Dès lors, la diminution de l'expression de *ddb2* au cours de la carcinogenèse colorectale permettrait de stimuler la prolifération des cellules cancéreuses et de stimuler l'acquisition d'un pouvoir métastatique de ces cellules. Malgré tout, les travaux de Roy et Yang s'accordent sur une sous-expression de la protéine DDB2 dans les tumeurs colorectales métastatiques par rapport aux tumeurs non invasives. En accord avec ces résultats, une forte expression de la protéine est associée à une meilleure survie globale des patients atteints de cancers colorectaux.

L'ensemble de ces données permettent de mettre en évidence la valeur prédictive du niveau d'expression de DDB2 comme biomarqueur dans les cancers ovariens, prostatiques et colorectaux.

Des données *in vitro* et *in vivo* acquises par le laboratoire avaient permis d'identifier la protéine DDB2 comme un potentiel candidat dans la prédiction du devenir métastatique des tumeurs mammaires et de leur réponse à la chimiothérapie. En effet, les données ont mis en avant une expression différentielle de la protéine selon le statut métastatique des cellules tumorales mammaires. Ainsi, les cellules cancéreuses hautement invasives (MDA-MB231 et Hs578t) expriment faiblement voire pas du tout la protéine. Au contraire, dans les cellules

cancéreuses tumorales faiblement invasives (MCF-7 et T47D), une forte expression de la protéine est observée. Par ailleurs, la surexpression de DDB2 dans les cellules MDA-MB231 inhibe leur capacité invasive *in vitro* et leur capacité à former des métastases *in vivo* (Ennen *et al.*, 2013). De plus, la surexpression sensibilise les cellules à l'effet pro-apoptotique de deux agents de chimiothérapie (Doxorubicine et 5-Fluorouracile) (Thèse de Rémi Klotz, 2014). L'ensemble de ces données suggérait une potentielle utilisation clinique de DDB2 comme marqueur prédictif de la progression métastatique des tumeurs mammaires, et de leur réponse aux thérapies. Pour valider cet intérêt clinique, une analyse de différentes bases de données transcriptomiques a été réalisée.

Dans un premier temps, nos données indiquaient une sous-expression de *ddb2* dans les tissus tumoraux mammaires. Cette observation a été vérifiée dans d'autres jeux de données, et par le biais de 2 autres plateformes : BCIP et GEPIA. Cette diminution de l'expression de *ddb2* au cours de la tumorigenèse mammaire peut être due à des altérations géniques. L'outil cBioPortal a permis de révéler que le gène *ddb2* est très rarement altéré dans le cancer du sein. D'autres mécanismes de régulation, dont des mécanismes épigénétiques, pourraient expliquer cette diminution de l'expression de *ddb2* au cours de la tumorigenèse mammaire. Dans ce sens, des études préliminaires menées au laboratoire avaient montré l'implication des méthylations dans la régulation de l'expression des transcrits du gène *ddb2*. En effet, l'utilisation d'un agent déméthylant, la 5-azadésoxycytidine, permet de réinduire l'expression du gène dans les cellules MDA-MB231 qui n'expriment normalement pas ce-dernier. Pour autant, aucune hyperméthylation du promoteur du gène n'a été identifiée par séquençage après traitement au bisulfite. L'hypothèse de l'implication dans la régulation de *ddb2* de facteurs de transcription dont l'expression est sensible à la méthylation a été étudiée, sans que le(s) facteur(s) ne soi(en)t clairement identifié(s). Par conséquent, les perturbations du profil de méthylation qui accompagnent fréquemment la carcinogenèse pourraient permettre d'expliquer la diminution de l'expression de *ddb2* dans les tumeurs mammaires.

Par la suite, le niveau d'expression de *ddb2* a été évalué dans différentes sous-catégories de cancers du sein. Les résultats ont montré une diminution de l'expression de *ddb2* dans des tumeurs mammaires de haut grades histologiques et de haut stades pathologiques. Ces tumeurs étant de mauvais pronostic, il n'est pas surprenant d'observer qu'une forte expression du gène codant DDB2 est associée à une meilleure survie des patientes atteintes de cancer du sein. Ces

données permettent ainsi de souligner l'intérêt de l'étude du niveau d'expression de *ddb2* comme marqueur prédictif de la survie des patientes atteintes de tumeurs mammaires.

La survie globale de patients atteints de cancer est dictée par 3 paramètres principaux : la dissémination métastatique, la réponse au(x) traitement(s) et le risque de récurrence après traitement. Une étude de l'implication du niveau d'expression de *ddb2* sur ces 3 paramètres a été menée.

Les résultats ont mis en évidence une surexpression du gène dans les tumeurs mammaires non métastatiques par rapport aux tumeurs métastatiques. Ces résultats concernant le cancer du sein rejoignent ceux obtenus dans le cancer colorectal. Ensuite, une forte expression de *ddb2* permet d'augmenter la survie sans métastase de patientes atteintes de cancer du sein. Ces données suggèrent donc que DDB2 pourrait avoir des propriétés anti-métastatiques, ce qui vient confirmer les résultats expérimentaux acquis par le laboratoire. En effet, dans les cellules cancéreuses mammaires qui l'expriment, la protéine DDB2 est capable d'inhiber l'acquisition d'un pouvoir métastatique de 3 manières : en inhibant l'activité de la voie NF- κ B (Ennen *et al.*, 2013), en inhibant l'expression de *SOD2* (Minig *et al.*, 2009) et en inhibant la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, DDB2 favorise l'expression d'I κ B α , l'inhibiteur cytoplasmique de NF- κ B, aboutissant à une baisse de son activité (Ennen *et al.*, 2013). Ceci conduit à une baisse de l'expression des gènes cibles de NF- κ B impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire. De plus, la protéine DDB2, en inhibant l'expression de *SOD2*, induit une baisse de la quantité de peroxyde d'hydrogène connu pour stimuler la migration et l'invasion cellulaire (Minig *et al.*, 2009). Enfin, DDB2 entraîne une inhibition de l'expression de gènes inducteurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (Thèse de Claire Barbieux, 2015). L'inhibition de l'expression de DDB2 par ARN interférence dans les cellules tumorales mammaires qui l'expriment (les cellules MCF-7) est ainsi associée à une induction spontanée de la TEM. L'ensemble des observations *in silico* et expérimentales permettent donc de conclure que la faible expression de DDB2 pourrait être un nouveau marqueur prédictif de l'évolution métastatique des tumeurs mammaires.

Concernant l'implication de la protéine dans la réponse des tumeurs mammaires à la thérapie, il a été observé qu'une forte expression de *ddb2* était associée à une meilleure survie des patientes traitées par chimiothérapie adjuvante, la forme de chimiothérapie la plus couramment prescrite. Ces données viennent confirmer les résultats *in vitro* et *in vivo* obtenus

par le laboratoire qui indiquaient que la surexpression de DDB2 dans les cellules tumorales mammaires permettait de les sensibiliser à deux agents de chimiothérapie (Doxorubicine & 5-Fluorouracile) (Thèse de Rémi Klotz, 2014). Ce rôle chimiosensibilisant repose notamment sur la capacité de DDB2 à inhiber l'expression de *bcl2*. De plus, ces résultats indiquent qu'étudier le niveau d'expression de *ddb2* dans des tumeurs mammaires pourrait permettre de prédire leur réponse à la chimiothérapie adjuvante. Par ailleurs, l'expression de *ddb2* semble également être indicateur de la probabilité de récurrence après traitement. En effet, la survie sans récurrence de patientes atteintes de cancer du sein est améliorée dans le cas d'une forte expression du gène. En accord avec ces données, une surexpression du gène a été observée dans une cohorte de patientes présentant un faible risque de récurrence. Comme les cellules souches cancéreuses sont connues pour être impliquées dans les mécanismes de récurrence (Phi *et al.*, 2018), il est probable que la meilleure survie sans récurrence des patientes dont les tumeurs mammaires surexpriment DDB2 soit due à un effet de la protéine sur la population de cellules souches, comme ce qui a été montré dans le cancer ovarien (Han *et al.*, 2014). En effet, dans cette étude, la protéine DDB2 a été montrée comme capable de s'opposer à la dédifférenciation des cellules tumorales ovariennes en cellules souches par inhibition de l'expression de *ALDH1A1*, qui intervient dans la dédifférenciation cellulaire.

L'ensemble de ces travaux *in silico* n'a été réalisé que sur des données transcriptomiques. Concernant le taux protéique de DDB2 dans le cancer du sein, une étude antérieure menée au laboratoire en collaboration avec l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL-CHU de Brabois) n'a pas apporté de résultats concluants par manque de spécificité de l'anticorps utilisé. Ce manque de spécificité est également observé dans 2 études utilisant 2 anticorps différents (HPA058406 et CAB025912) (source : TheHumanProteinAtlas à l'adresse <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134574-DDB2/pathology/breast+cancer#Quantity>). En effet, 2 préparations histologiques sur 11 utilisant l'anticorps HPA058406 et 5 préparations sur 9 utilisant l'anticorps CAB025912 n'ont pas permis de détecter la protéine DDB2. Ainsi, pour renforcer l'intérêt clinique de l'ensemble de ces travaux *in silico*, il conviendra dans un premier temps d'identifier un anticorps spécifique permettant la visualisation de la protéine en histologie.

L'ensemble de ces résultats révèle l'intérêt clinique de DDB2 dans le cancer du sein. En effet, l'analyse de son expression pourrait à la fois permettre de prédire le risque de développer

des métastases, la réponse future des tumeurs aux thérapies, et le risque de récurrence après traitement.

II. Effet des complexes AIM2 et AIM3 sur la sénescence de cellules tumorales mammaires et leur réponse à différents traitements

Les études menées préalablement au laboratoire avaient mis en évidence la capacité des complexes AIM2 et AIM3 à induire un arrêt total de la prolifération cellulaire, avec une faible induction de l'apoptose, même après 144h de traitement (Thèse de Jie Li, 2018). L'hypothèse de l'induction de la sénescence cellulaire comme mécanisme antiprolifératif a ainsi été émise.

Dans un premier temps, des changements morphologiques (étalement des cellules et présence de longues extensions cytoplasmiques) accompagnant généralement l'entrée en sénescence ont été observés dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A traitées avec AIM2 et AIM3. En effet, Kim *et al.* ont également observé un aplatissement des cellules MDA-MB231 et l'apparition d'extensions cytoplasmiques lors de leur entrée en sénescence (Kim *et al.*, 2017). Le rôle joué par ces modifications morphologiques n'est pas clairement connu, mais il semblerait qu'elles permettent une meilleure adhésion au support. En effet, Cho *et al.* ont montré que l'inhibition de l'acquisition de ces caractéristiques morphologiques (par inhibition de l'expression de la protéine cavéoline-1 impliquée dans les mécanismes d'endocytose) entraîne une perte des points focaux d'adhésion et des fibres de stress d'actine (Cho *et al.*, 2004). Ces changements morphologiques sont d'autant plus marqués dans les cellules épithéliales MCF-7 et MCF-10A, qui acquièrent un phénotype fibroblastique sous traitement avec les complexes organométalliques, suggérant que les cellules auraient pu subir la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Pour autant, bien qu'un lien entre TEM et sénescence ait été mis en évidence, l'induction d'un de ces processus requiert l'inhibition de l'autre. En effet, la surexpression dans les cellules MCF-7 d'un facteur de transcription inducteur de la TEM, la protéine Twist, inhibe l'expression du gène codant p21 impliqué dans l'arrêt du cycle des cellules sénescents (Li *et al.*, 2009). De plus, la surexpression du gène codant RB, impliqué dans l'arrêt de la prolifération des cellules en sénescence, inhibe la TEM, en empêchant la diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine (Batsché *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que les changements morphologiques accompagnant l'entrée en sénescence de cellules épithéliales ne correspondent pas à une induction de la TEM. Ceci est d'ailleurs

conforté par l'observation que les cellules MDA-MB231, qui ont déjà subi la TEM et possèdent une morphologie mésenchymateuse, présentent également des modifications de leur phénotype en présence des complexes AIM2 et AIM3.

De plus, une augmentation de la granulosité des cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A a été observée dès 72h de traitement avec AIM2 et AIM3. L'augmentation de la granulosité au cours de la sénescence n'a pas, à l'heure actuelle, de raison démontrée. Les granulosités des cellules sénescents contiennent majoritairement des lysosomes riches en lipofuscine, un agrégat de protéines oxydées et de lipides s'accumulant dans les cellules vieillissantes (Kurz *et al.*, 2000). Cette augmentation de la masse lysosomale s'accompagne d'une augmentation de la quantité en enzymes lysosomales, dont la SA- β -Gal. Ainsi, l'augmentation de l'activité enzymatique de la SA- β -Gal pourrait être une conséquence de l'augmentation de la granulosité observée au cours de la sénescence. Ce lien entre augmentation de la granulosité et augmentation de l'activité de la SA- β -galactosidase dans les cellules traitées est croissante en fonction du temps de traitement des cellules. En effet, l'augmentation de la granulosité et de l'activité de la SA- β -galactosidase dans les cellules MDA-MB231 et MCF-10A ne deviennent significatives toutes les deux qu'au bout de 96h, alors que dans les cellules MCF-7, ces augmentations ont lieu dès 72h de traitement.

Enfin, une augmentation de la taille des cellules a été observée dans les cellules après 96h de traitement, sauf pour les cellules MCF-10A en présence d'AIM2. Cette augmentation de la taille des cellules est décrite comme s'accompagnant d'une augmentation de la concentration en protéines intracellulaires et de la masse mitochondriale totale, témoignant du maintien d'un métabolisme actif dans les cellules sénescents (De Cecco *et al.*, 2011). Cette caractéristique des cellules sénescents fait majoritairement intervenir la kinase mTOR (Carroll *et al.*, 2017). Au cours de la sénescence, l'activité mTOR est augmentée, comme le traduit l'augmentation de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, un marqueur de l'activité mTOR (Pospelova *et al.*, 2012). De plus, l'activation de mTOR est nécessaire pour l'activité du facteur de transcription TFEB qui régule l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse lysosomale (Peña-Llopis *et al.*, 2011). Dès lors, l'augmentation de la biogenèse lysosomale induite par mTOR pourrait être responsable à la fois de l'augmentation de la taille des cellules sénescents, mais aussi de l'augmentation de l'activité de l'enzyme lysosomale SA- β -galactosidase (Lee *et al.*, 2006).

De plus, l'observation des noyaux des cellules traitées avec AIM2/3 ne semble pas permettre d'observer de territoire condensé d'hétérochromatine pouvant correspondre aux

SAHF (Senescence-Associated Heterochromatine Foci). Cette observation est d'ailleurs soutenue par des travaux très préliminaires du laboratoire qui avait montré qu'un traitement de 24h avec AIM2 et AIM3 des cellules MCF-10A s'accompagne d'une augmentation de la forme triméthylée de l'histone H3K4 (H3K4me3) et des formes panméthylées de l'histone H3K9 qui correspondent tous deux à des modifications post-traductionnelles conduisant à une décompaction de la chromatine et à une expression génique. De plus, la forme triméthylée de l'histone H3K27, un marqueur d'hétérochromatine, ne semble pas affectée par les complexes AIM2/3. Ces résultats, bien que très préliminaires, tendent à montrer qu'AIM2/3 pourraient entraîner une décompaction de la chromatine, ce qui pourrait expliquer l'absence de foci SAHF. Cette décompaction pourrait d'ailleurs permettre l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, et donc dans l'induction de la sénescence. Cette absence de SAHF n'est pas une preuve s'opposant à la capacité de nos molécules à induire la sénescence, puisque la formation de SAHF n'accompagne pas toujours l'entrée en sénescence (Kosar *et al.*, 2011).

Afin de véritablement associer ces changements morphologiques à une induction de la sénescence, l'activité enzymatique de la SA- β -Galactosidase a été étudiée par cytométrie (sonde C12FDG) et par colorimétrie dans les cellules MDA-MB231, MCF-7 et MCF-10A.

Dans un premier temps, il a été observé qu'entre 5 et 20% des cellules non traitées sont marquées positivement pour la SA- β -Gal. Ces données, qui ont également été observés par d'autres équipes dans d'autres lignées cellulaires (Lee *et al.*, 2015)(Räsänen *et al.*, 2009)(Vannini *et al.*, 2014) mettent en évidence l'activité basale de l'enzyme dans des cellules non sénescents.

Ensuite, les deux techniques ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité SA- β -Gal à 96h de traitement avec AIM2 et AIM3 dans les cellules MDA-MB231 et MCF-7. Pour les cellules MCF-10A, les 2 marquages révèlent également une augmentation de l'activité enzymatique dès 96h avec la molécule AIM3. Concernant la molécule AIM2 dans la lignée saine, les deux techniques ont mis en évidence une absence d'induction de la sénescence, en association avec une absence d'augmentation de la taille des cellules observée en cytométrie en flux. Au cours de l'expérience de colorimétrie, les cellules MCF-10A traitées avec AIM2 étaient majoritairement SA- β -galactosidase positives mais EdU positives, suggérant que le marquage bleu ne correspondait pas à des cellules sénescents, mais à des cellules prolifératives. Les différents niveaux d'intensité de marquage de la SA-beta-Gal au cours des marquages colorimétriques ont été observés par d'autres équipes (Itahana *et al.*, 2007)(Piechota

et al., 2016). Pour pallier ce problème, Shlush *et al.* ont couplé les marquages colorimétriques à des analyses digitales des images, ce qui a permis d'établir un seuil précis d'intensité de marquage au-delà duquel il s'agit bien de sénescence (Shlush *et al.*, 2011).

Malgré l'augmentation du pourcentage de cellules positives sous traitement, ce pourcentage ne dépasse pas la barre des 50%, ce qui semble indiquer que 50% des cellules traitées ne sont pas en sénescence, alors qu'une inhibition complète de la prolifération avait été observée. Il convient de noter que ce pourcentage de cellules positives a été évalué de manière subjective dans les expériences de cytométrie et de colorimétrie. En effet, lors de la mesure de la fluorescence émise par la sonde C12FDG, la borne M1 a été appliquée de manière arbitraire à l'endroit où les courbes traitées ne se superposent plus aux courbes non traitées. Ce placement de borne peut avoir conduit à une sous-estimation du pourcentage de cellules positives, d'autant plus que l'intensité de fluorescence est exprimée en échelle logarithmique. Concernant les résultats de colorimétrie, les cellules marquées ont été comptabilisées à l'œil, ce qui a pu également conduire à une sous-estimation du pourcentage réel de cellules positives. Ces données suggèrent que l'utilisation de la SA- β -gal, bien qu'elle soit témoin d'une induction de sénescence, ne permet pas de quantifier précisément le nombre de cellules sénescents. Ainsi, la quantification de cellules sénescents semble requérir la quantification simultanée de différents marqueurs comme Ki67, γ -H2AX, HMGB1, SA- β -Gal ... (Biran *et al.*, 2017).

Malgré tout, nos résultats indiquent bien que les molécules AIM2 et AIM3 induisent la sénescence des lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et MCF-7. Quant à la lignée mammaire saine MCF-10A, seule la molécule AIM3 en est capable.

Différents mécanismes moléculaires permettent d'expliquer cette induction de la sénescence.

L'arrêt du cycle cellulaire caractéristique des cellules sénescents fait majoritairement intervenir l'inhibiteur du cycle p21. En effet, la surexpression du gène *CKDN1A* codant p21 induit une entrée en sénescence de différents modèles cellulaires (Shtutman *et al.*, 2017) (Kagawa *et al.*, 1999). L'analyse de son expression dans les cellules MDA-MB231, MCF-10A et MCF-7 traitées avec AIM2 et AIM3 a révélé une augmentation du taux de transcrits dès 24h, et une augmentation temps dépendant de son taux protéique devenant significative au bout de 72h.

p21 est responsable d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par interaction avec le complexe CDK4-cycline D aboutissant à une inhibition de la phosphorylation de Rb. Par

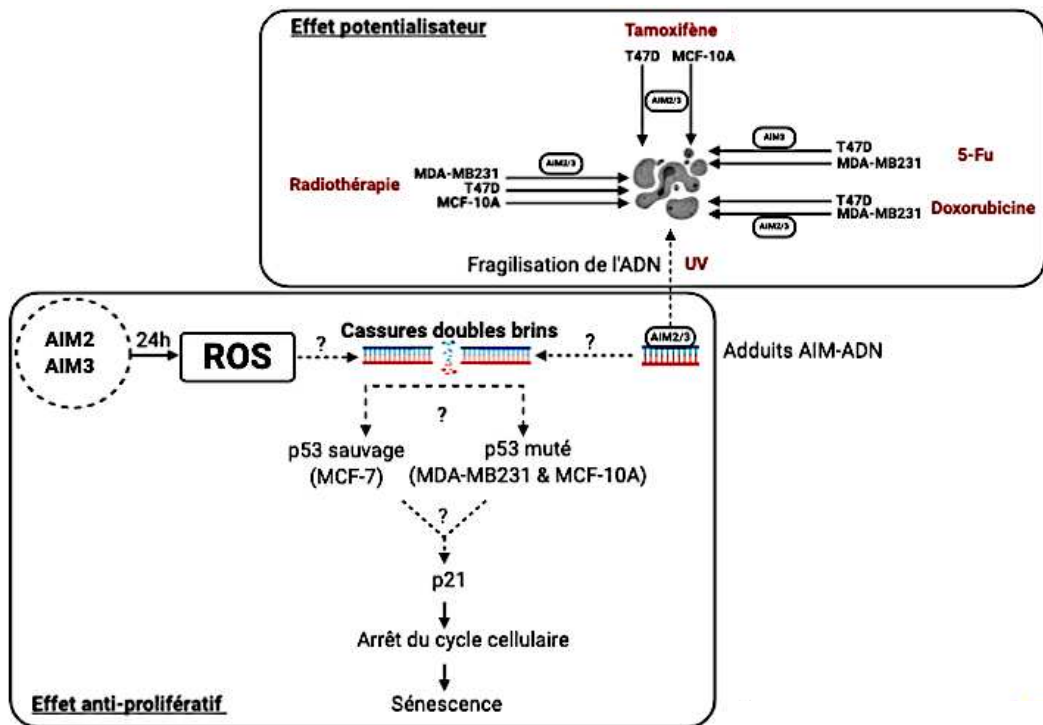


Figure 62. Représentation schématique des effets cellulaires des complexes AIM2 et AIM3 sur différentes lignées mammaires. Cette thèse a permis de mettre en évidence la capacité des complexes à induire la sénescence de différentes lignées mammaires. L'augmentation du niveau protéique de p21, participant à l'arrêt de la prolifération cellulaire, est potentiellement une réponse à la présence de cassures doubles brins mises en évidence dès 72h de traitement. Ces lésions pourraient être causées par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont une augmentation du taux intracellulaire a été observée à 24h de traitement. Indépendamment des ROS, les cassures doubles brins pourraient être la conséquence d'une réparation d'adduits AIM-ADN. Ces adduits pourraient potentiellement entraîner une fragilisation de la molécule d'ADN, à l'origine de la sensibilisation des cellule MDA-MB231 à la mort induite par les UVs. Ces données de sensibilisation nous ont conduits à étudier l'effet potentialisateur des complexes AIM2 et AIM3 face à différentes thérapies prescrites dans la prise en charge du cancer du sein : le Tamoxifène, la Doxorubicine, le 5-Fluorouracile (5-Fu) et la radiothérapie.

conséquent, l'induction de l'expression de *CDKN1A* dès 24h de traitement avec AIM2 et AIM3 peut être associée au blocage en phase G0/G1 que des expériences préliminaires avaient mis en lumière dans les cellules MCF-10A (Thèse de Jie Li, 2018). De plus, p21 est également capable d'induire un blocage du cycle en phase G2 (Hoferlin *et al.*, 2011) (Bunz *et al.*, 1998) (Niculescu *et al.*, 1998). Ainsi, l'induction de l'expression de p21 dans les cellules MDA-MB231 traitées avec AIM2 et AIM3 pourrait expliquer le blocage du cycle cellulaire observé en phase G2 dans ces cellules.

Pour déterminer l'influence de la voie p21 dans l'induction de la sénescence, il conviendra d'étudier l'effet d'une inhibition de son expression par ARN interférence dans nos lignées cellulaires. Dans ce sens, il a été montré que l'utilisation d'un siRNA dirigé contre l'ARNm de p21 est capable d'induire une diminution significative du nombre de cellules sénescents (Aliouat-Denis *et al.*, 2005).

Comme cité dans l'introduction, *CDKN1A* est activé majoritairement par p53, lui-même activé par phosphorylation sans que son taux d'ARNm ou son taux protéique ne soit affecté (Herbig *et al.*, 2004)(Campisi and D'Adda Di Fagagna, 2007)(Atadja *et al.*, 1995). Ces phosphorylations s'accompagnent d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 (Vaziri *et al.*, 1997). Parmi nos modèles cellulaires, seules les cellules MCF-7 expriment une forme sauvage de p53, ce qui n'est pas le cas pour les cellules MDA-MB231 et MCF-10A (**Figure 62**). Ceci suggère que p53 n'est pas impliquée dans l'induction de *CDKN1A* dans ces deux lignées cellulaires. Ces différences ont également été observées par l'équipe de Choi *et al.* En effet, dans cette étude, l'induction de l'expression de *CDKN1A* dans les cellules MCF-7 traitées au Taxol s'accompagnait d'une augmentation du taux protéique des formes non phosphorylées et phosphorylées de p53, alors qu'aucune modification du niveau d'expression de la protéine p53 n'avait été observée dans les cellules MDA-MB231, malgré l'augmentation du taux protéique de p21 (Choi and Yoo, 2012). Ceci suggère que l'expression de p21 peut être induite indépendamment de la protéine p53, comme ce qui a été montré dans de nombreux modèles de cellules en sénescence (Aliouat-Denis *et al.*, 2005)(Phalke *et al.*, 2012). En accord avec ces travaux, l'expression de p21 pourrait être induite par Sp1/3 (Gartel *et al.*, 2000), AP2 (Zeng *et al.*, 1997), STAT1 (Chin *et al.*, 1996) et C/EBP (Park *et al.*, 2000). Dans les cellules MCF-7, il conviendra donc d'étudier la phosphorylation de p53 afin de conclure quant à son implication dans l'activation de l'expression de *CDKN1A*. De plus, il n'est pas exclu que les formes mutées de p53 dans les cellules MDA-MB231 et MCF-10A puissent être toujours capables d'induire l'expression du gène codant p21. Par exemple, la surexpression d'une forme

mutée de *TP53* dans des cellules HCT116 p53^{-/-} a permis d'observer une induction de l'expression du gène codant p21 (Tran *et al.*, 2017). La capacité de p53 muté à induire le gène codant p21 repose entièrement sur la nature des mutations, notamment au niveau du site de fixation à l'ADN (Dridi *et al.*, 2003).

En plus de p21, les protéines p16 et p14, deux variants d'épissage du gène *CDKN2A*, sont fréquemment impliquées dans la sénescence cellulaire. Comme cité dans l'introduction, p16 est capable d'inhiber le complexe CDK4/6-cycline D et d'induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Quant à la protéine p14, elle est capable de stabiliser p53 et d'augmenter son activité transcriptionnelle. Des estimations ont révélé que le gène *CDKN2A* est le second gène le plus fréquemment muté dans les cancers après le gène codant p53 (Zhao *et al.*, 2016). Ainsi, une étude du profil génétique de lignées mammaires a révélé que les cellules MDA-MB231, MCF-10A et MCF-7 présentent des délétions homozygotes du gène *CDKN2A* (Jönsson *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que dans nos modèles cellulaires, l'induction de la sénescence ne fait pas intervenir p14 et p16, indiquant que la protéine p21 joue potentiellement un rôle majeur dans l'acquisition d'un phénotype de sénescence dans ces cellules. Il convient cependant de nuancer ces propos par l'observation de l'implication dans la sénescence d'autres voies, certes moins décrites. Ainsi, l'augmentation de l'expression d'un autre inhibiteur des CDK, p27, a été corrélée avec l'induction de la sénescence de fibroblastes murins (Collado *et al.*, 2000) et humains (Wagner *et al.*, 2001). Il semblerait d'ailleurs que p21 et p27 agissent de manière synergique pour l'induction de la sénescence (García-Fernández *et al.*, 2014). De plus, la voie p38/MAPK semble également intervenir dans l'induction de la sénescence. En effet, une activation de la voie a été observée dans des cellules en sénescence répliquative et prématurée (Iwasa *et al.*, 2003)(Wang *et al.*, 2002). La voie p38 serait activée dans le contexte d'une surexpression d'oncogènes, notamment de *RAS*, induisant une entrée en sénescence, plutôt que dans le contexte d'une sénescence induite par un stress (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2010).

Les voies p53/p21 et p16 induisant la sénescence sont activées majoritairement par le processus DDR (DNA-Damaged Repair). En effet, les lésions de l'ADN vont être reconnues par les kinases ATM/ATR qui activeront Chk1/2 à l'origine de la phosphorylation de p53 rendant la protéine active. Les lésions peuvent également directement activer le gène *CDKN2A* qui codent pour p14 et p16. Une activation des voies DDR est donc un inducteur de la

sénescence. De plus, le maintien d'une activation des voies DDR est indispensable au maintien du phénotype de sénescence (Fumagalli *et al.*, 2014). Des expériences de modélisation moléculaire avaient mis en avant la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à interagir avec l'ADN (Gattuso *et al.*, 2015), potentiellement à l'origine d'adduits de l'ADN dont la réparation pourrait entraîner l'apparition de cassures doubles brins (**Figure 62**). Pour tester la capacité des complexes à induire la formation de cassures doubles brins, des co-marquages de γ -H2AX (une forme de l'histone H2A apposée majoritairement au niveau de lésions de l'ADN) et de TP53BP1 (une protéine de la réparation de l'ADN) ont été réalisés. Les résultats ont montré une augmentation temps-dépendante du nombre de lésions dans les cellules MDA-MB231, ce nombre ne devenant significativement supérieur aux cellules non traitées qu'au bout de 72h de traitement avec AIM2 et AIM3. Cette augmentation est en corrélation avec l'augmentation du taux protéique de p21. Ainsi, l'induction de p21 pourrait être la conséquence de l'apparition accrue de dommages à l'ADN. Si ce lien est vérifié, cela signifierait que l'induction de la sénescence p21-dépendante est une réponse aux lésions provoquées par les complexes AIM2 et AIM3 (**Figure 62**). Pour établir concrètement ce lien, il est envisageable d'étudier l'effet de l'inhibition de l'expression de protéines de la réparation à la fois sur l'expression de p21 et sur l'induction de la sénescence. Dans ce sens, l'utilisation d'un inhibiteur de ATM/ATR, le composé CGK733, empêche complètement l'induction de la sénescence provoquée par l'etoposide dans les cellules HepG2 (Nagano *et al.*, 2016). L'un des effecteurs de DDR conduisant à la sénescence est p53. Or, comme cité précédemment, les cellules MDA-MB231 et MCF-10A expriment une forme mutée du gène. Pour autant, certaines formes mutées de la protéine gardent toujours leur capacité à induire la sénescence (Liu *et al.*, 2004). De plus, les cassures doubles brins sont présentes même jusqu'à 120h de traitement avec AIM2 et AIM3, ce qui pourrait participer au maintien de la sénescence au cours du temps. Il conviendra de déterminer si la présence des lésions de l'ADN est due à une production continue de lésions par AIM2/3 et/ou à une absence de réparation de ces lésions.

La formation des lésions de l'ADN observée dans les cellules MDA-MB231 pourrait également être la conséquence non pas de l'interaction AIM-ADN, mais de la production d'espèces réactives observées (**Figure 62**). L'hypothèse d'un impact des complexes AIM2/3 sur la production de ROS repose sur la capacité des ions Fe^{2+} à induire un stress oxydant (Migdal and Serres, 2011). La concentration intracellulaire en ROS a été étudiée par l'analyse de la fluorescence émise par deux sondes (DHE et MitoSox) qui a révélé une augmentation de

l'intensité de fluorescence dans les cellules MDA-MB231 traitées pendant 24h avec AIM2 et AIM3 par rapport aux cellules MDA-MB231 non traitées. De manière surprenante, le complexe Ru ne permet pas d'observer d'augmentation du niveau de ROS dans les cellules MDA-MB231. Or, les ions Ru^{2+} sont décrits comme bons inducteurs de ROS, mais à des doses 50 fois supérieures à celles employées dans nos travaux (Wan *et al.*, 2017). Concernant la molécule AIM1, les résultats montrent qu'elle induit une augmentation de la production de ROS avec la sonde MitoSox, mais pas avec la sonde DHE. Des cellules traitées à la Doxorubicine ont été utilisées comme contrôle positif de la production de ROS. Les résultats ont mis en évidence une induction de ROS par la molécule avec les deux sondes, bien que cette augmentation soit beaucoup plus marquée en présence de la sonde MitoSox. Dès lors, l'absence d'augmentation du taux intracellulaire en ROS induite par AIM1 en présence de la sonde DHE, en association avec la faible induction d'espèces réactives de l'oxygène par la Doxorubicine, soulève le besoin d'utiliser une 3^{ème} sonde témoin de la présence de ROS, comme la sonde H_2DCFDA . Ces expériences de cytométrie en flux ont permis de mettre en évidence l'importance de l'ion Fe^{2+} des molécules AIM1, AIM2 et AIM3 dans leur capacité à produire des ROS. Le mécanisme le mieux décrit de production de ROS par les ions Fe^{2+} repose sur la réaction de Fenton, au travers de laquelle les ions Fe^{2+} réagissent avec le peroxyde d'hydrogène pour former des ions Fe^{3+} et des radicaux hydroxyles. Il est admis que les ROS sont responsables de dommages à toutes les macromolécules biologiques, dont l'ADN. La réparation de ces lésions passe notamment par le recrutement de la protéine TP53BP1 et la phosphorylation de l'histone H2AX au niveau du site de lésions. Finalement, la réparation de ces lésions conduit à un arrêt du cycle cellulaire *via* l'activation des voies p53/p21 et/ou p16/pRB (Borodkina *et al.*, 2014). Ainsi, la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une production de ROS dans la lignée MDA-MB231 dès 24h de traitement pourrait être à l'origine des lésions de l'ADN observées dès 72h de traitement dans cette lignée, qui pourraient être à l'origine de l'augmentation du taux protéique de p21 observée dès 72h de traitement, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la sénescence (**Figure 62**). Pour véritablement faire le lien entre ROS, lésions, p21 et sénescence, il conviendrait de prétraiter les cellules mammaires avec AIM2 ou AIM3 en combinaison avec un agent antioxydant. L'impact de ce co-traitement sur l'apparition des foci de colocalisation γ -H2AX-TP53BP1, ainsi que sur l'induction de la sénescence, devra être étudié. La vérification de la relation entre production de ROS et induction de la sénescence permettrait de clairement établir un lien entre la structure des complexes (notamment de la présence de l'ion Fe^{2+} des complexes AIM2 et AIM3) et leur effet antiprolifératif *via* l'induction de la sénescence.

L'étude de l'effet d'un arrêt du traitement avec AIM2 et AIM3 des trois lignées cellulaires a mise en évidence une reprise de la prolifération uniquement dans le cas des cellules mammaires saines MCF-10A, associée à une sortie de l'état de sénescence induite par AIM3. Au contraire, les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 et MCF-7 n'étaient pas capables de sortir de cet état de sénescence, aboutissant au maintien de l'effet cytostatique des molécules AIM2/3 dans ces cellules. Ces différences entre cellules cancéreuses et cellules saines pourraient s'expliquer par la plus forte capacité proliférative des cellules MCF-10A, dont le temps de doublement est très inférieur à celui des cellules MDA-MB231 et MCF-7. Ainsi, il conviendra d'étudier l'état de sénescence et l'état prolifératif des cellules plusieurs jours après l'enlèvement des molécules AIM2/3 du milieu de culture.

Comme cité dans l'introduction, une étude a permis d'identifier deux caractéristiques des cellules capables de sortir de l'état de sénescence : leur polyploïdie et leur caractère souche (Wang *et al.*, 2013). En effet, l'étude de Wang *et al.* a montré que la réversibilité de la sénescence est associée à une augmentation de la polyploïdie. Parmi nos 3 lignées cellulaires, seule la lignée mammaire saine MCF-10A est diploïde (Qu *et al.*, 2015), alors que les cellules cancéreuses MDA-MB231 et MCF-17 sont polyploïdes (Choudhary *et al.*, 2016). Pour autant, les lignées MDA-MB231 et MCF-7 ne sont pas capables de sortir de leur état de sénescence, comme ce qui a été montré pour la lignée MCF-10A. Ces données suggèrent donc que les différences de base en termes de ploïdie entre nos lignées ne permettent pas d'expliquer les différences de réversibilité de la sénescence. Il conviendra cependant de comparer l'état de ploïdie des 3 lignées cellulaires traitées avec AIM2/3 dans le but de mettre en évidence de potentielles différences entre les cellules mammaires cancéreuses et saines. Toujours dans l'étude de Wang *et al.*, les auteurs ont également montré que la réversibilité de la sénescence est associée à l'expression de marqueurs de cellules souches. Dans le modèle du cancer du sein, ces marqueurs correspondent aux protéines de surface CD44 et CD24 (Ricardo *et al.*, 2011). Les cellules souches mammaires expriment ainsi fortement CD44 et faiblement CD24, et sont dites CD44+/CD24-. Des études comparant le pourcentage de cellules mammaires souches a révélé que 90% des cellules MDA-MB231 sont CD44+/CD24-, alors qu'aucune cellule MCF-7 ne l'était (Feng *et al.*, 2019). Quant à la lignée mammaire saine, environ 50% des cellules MCF-10A sont CD44+/CD24-. Ces données suggèrent que le caractère souche de nos lignées cellulaires ne semble pas être associé à leur capacité à sortir de l'état de sénescence. Il

conviendra cependant d'étudier l'expression des marqueurs CD44 et CD24 dans les trois lignées cellulaires traitées avec AIM2/3.

Une autre étude a révélé que des modifications épigénétiques peuvent conduire à une sortie de la sénescence. Plus précisément, la perte de la triméthylation de H3K9 par surexpression de deux enzymes H3K9 déméthylases (LSD1 et JMJD2c) permet une réversibilité de la sénescence de fibroblastes murins embryonnaires induite par la surexpression de *RAS* (Yu *et al.*, 2018). Cette étude fait le lien entre l'épigénétique et la réversibilité de la sénescence. Or, une déméthylation de l'ADN a été observée en présence de nos complexes. De plus, des données très préliminaires acquises au laboratoire indiquaient un impact des complexes AIM2/3 sur certaines modifications post-traductionnelles des histones dans les cellules MCF-10A. Ainsi, il conviendra de poursuivre cette étude en se focalisant sur H3K9me3 et de comparer les résultats entre la lignée mammaire saine MCF-10A, et les lignées cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7. Si des différences sont observées, il serait intéressant de moduler le niveau de H3K9me3 (par inhibition ou surexpression d'histones déméthylases), afin d'étudier l'impact sur la réversibilité de la sénescence cellulaire.

Enfin, une atténuation de la réponse DDR (Damaged-DNA Repair) a été associée à une sortie de la sénescence induite par une irradiation de fibroblastes murins embryonnaires (Chitikova *et al.*, 2014). L'étude a révélé que l'entrée en sénescence des cellules irradiées s'accompagne de la formation de foci nucléaires de colocalisation de γ -H2AX/TP53BP1. 20 jours après irradiation, une sortie de l'état de sénescence, se caractérisant par une reprise de la prolifération, a été observée. Cette réversibilité de la sénescence s'accompagnait d'une diminution du nombre de foci de co-localisation. Les mécanismes sous-jacents n'ont pas été étudiés par les auteurs, mais ces-derniers avancent l'hypothèse d'une réparation des lésions qui ne devient efficace qu'au bout de 20 jours post-irradiation. Dans notre cas, la réversibilité de la sénescence induite par AIM3 dans la lignée MCF-10A pourrait s'expliquer par une disparition des foci témoignant de cassures doubles brins par réparation des lésions. Dans ce sens, il conviendra de réaliser des co-marquages γ -H2AX/TP53BP1 après avoir retiré la molécule AIM3 du milieu de culture. Il serait également intéressant de réaliser les mêmes expériences dans les lignées cancéreuses MDA-MB231 et MCF-7. Si des différences entre les lignées cancéreuses et saines sont observées, ceci permettrait d'expliquer les différences de réversibilité de la sénescence.

Enfin, il est à noter que les cellules cancéreuses présentent plus de lésions de l'ADN que les cellules saines (Kiwerska and Szyfter, 2019), ce qui expliquerait leur difficulté à réacquies un potentiel prolifératif.

De manière surprenante, l'arrêt de la prolifération des cellules MCF-10A en présence de la molécule AIM2 ne s'accompagne pas d'une entrée en sénescence. En effet, les marquages fluorescents (C12FDG) et colorimétriques ont tous les deux montré une absence d'induction de la sénescence. Pour autant, dans ces cellules, une augmentation de la granulosité et de l'expression de p21 a été observée. Une des hypothèses est que l'arrêt de la prolifération cellulaire induite par AIM2 dans les cellules MCF-10A correspond à de la quiescence. Comme cité dans l'introduction, la quiescence correspond à un arrêt réversible du cycle cellulaire en phase G0. L'implication de la quiescence dans l'arrêt de la prolifération des cellules MCF-10A en réponse à AIM2 est soutenue par : 1) le blocage de leur cycle en phase G0/G1, et 2) la reprise de la prolifération cellulaire dès qu'AIM2 est retirée du milieu de culture. Il conviendra ainsi d'étudier l'expression de Ki67, un marqueur de prolifération absent dans la phase G0 dans le cas d'une entrée en quiescence. L'arrêt du cycle cellulaire caractéristique de la quiescence fait majoritairement intervenir l'inhibiteur du cycle p27 (Besson *et al.*, 2006). Pour autant, une étude de 2009 a révélé qu'une forte expression de p21 est indispensable pour l'induction et le maintien de la quiescence de différentes lignées cellulaires humaines après privation en nutriments (Perucca *et al.*, 2009). Ces données suggèrent que l'augmentation du taux d'ARNm et du taux protéique de p21 observée dans les cellules MCF-10A traitées avec AIM2 pourrait être associée à l'entrée en quiescence des cellules, à l'origine de l'inhibition de leur prolifération. Une autre hypothèse est que la molécule AIM2 induit une entrée en autophagie des cellules MCF-10A. L'autophagie est un processus par lequel la cellule dégrade une partie de son cytoplasme par ses propres lysosomes. Ce processus est régulé par mTOR capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de facteurs de transcription régulant l'autophagie (Schmeisser and Parker, 2019). Comme cité précédemment, l'activité de mTOR va, entre autres, aboutir à une augmentation de la masse lysosomale, indispensable au processus d'autophagie. Ces données pourraient expliquer pourquoi les cellules MCF-10A présentent une granulosité augmentée en présence d'AIM2, sans induction de la sénescence. L'autophagie présente des rôles discutables car elle aurait à la fois un rôle cytoprotecteur *via* sa capacité à induire un recyclage des molécules et organites endommagés, et un rôle cytotoxique. Ainsi, une entrée en autophagie pourrait expliquer l'arrêt de la prolifération cellulaire, sans augmentation

du nombre de cellules en phase sub-G1 et sans induction de la sénescence. Des expériences très préliminaires de transfection du plasmide GFP-LC3 permettant la mise en évidence la formation d'autophagosomes avaient montré l'émergence d'un marquage ponctiforme dès 72h de traitement avec AIM2. La piste de l'autophagie devra donc être approfondie par l'étude de l'expression des protéines Atg notamment.

L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier la sénescence comme un mécanisme expliquant l'arrêt de la prolifération des lignées mammaires à des temps longs. Cette sénescence s'accompagne d'une augmentation de l'expression de p21 et de l'émergence de cassures doubles brins qui pourraient résulter de la production de ROS observée. Indépendamment des espèces réactives de l'oxygène, les lésions pourraient être la conséquence de la réparation d'adduits AIM-ADN, qui pourraient fragiliser la molécule d'ADN. Dans ce sens, un prétraitement de 24h de la lignée MDA-MB231 avec la molécule AIM2 permet de sensibiliser les cellules à la mort induite par un agent responsable de dommages à l'ADN, les rayons ultraviolets. Cette sensibilisation pourrait s'expliquer par une fragilisation de la molécule d'ADN par les complexes AIM2/3, notamment au travers de la formation d'adduits AIM-ADN, et/ou par un impact des complexes sur les systèmes de réparation. Les quelques expériences connues pour mettre en évidence la formation *in vivo* d'adduits avec l'ADN nécessitent la connaissance du type d'adduits formés (Reddy, 2000). Ces données suggèrent le besoin de connaître le devenir intracellulaire des complexes AIM2 et AIM3 afin de déterminer la nature des adduits formés : le complexe reste-t-il entier, ou subit-il des clivages intracellulaires avant interaction avec l'ADN ? Cette expérience de sensibilisation aux UVs permet d'envisager une relation entre l'interaction des complexes avec l'ADN mise en évidence par modélisation moléculaire et les cassures doubles brins observées *in vitro*, et qui accompagnent l'induction de la sénescence. De plus, cette expérience nous a poussés à étudier les effets des complexes en combinaison avec d'autres traitements.

En effet, la grande majorité des protocoles de traitements anticancéreux actuels repose sur des combinaisons de molécules. Généralement, ces molécules sont cytotoxiques, et le but thérapeutique recherché est l'addition des effets cytotoxiques pour améliorer la réponse des cellules tumorales. Néanmoins, une nouvelle stratégie vise à combiner des agents cytostatiques et des agents cytotoxiques. En principe, les agents cytostatiques vont inhiber la prolifération des cellules tumorales, qui seront alors plus sensibles aux agents cytotoxiques (Ochoa and

Villasana, 2013). Cette thèse a permis de mettre en évidence une induction de la sénescence dès 96h de traitement avec les complexes organométalliques. Pour autant, l'arrêt de la prolifération induite par AIM2 et AIM3 s'opère dès 24h de traitement. De plus, une activité déméthylante dès 24h de traitement avec les complexes a été mise en évidence, potentiellement associée à une réinduction de l'expression de gènes impliqués dans la réponse cellulaire à différents traitements. Enfin, un effet sensibilisateur d'un prétraitement de 24h avec AIM2 de la lignée MDA-MB231 face à la mort induite par les UVs a été observée. L'ensemble de ces observations nous ont conduits à étudier l'effet sensibilisateur d'un prétraitement de 24h avec AIM2 ou AIM3 de différentes lignées mammaires face à des traitements utilisés classiquement dans la prise en charge du cancer du sein : le Tamoxifène, la Doxorubicine, le 5-Fluorouracile et la radiothérapie.

Le Tamoxifène est un agent d'hormonothérapie prescrit dans le cas de tumeurs mammaires hormonosensibles. Les cellules T47D expriment la cible du Tamoxifène, la protéine ER α , les rendant sensibles à l'effet pro-apoptotique de l'agent anticancéreux. L'analyse du clivage de PARP a permis de vérifier que les cellules sont sensibles à la dose de 50 μ M de Tamoxifène. De plus, nos résultats ont permis de mettre en évidence une synergie d'action entre AIM2/AIM3 et le Tamoxifène dans la lignée T47D, se traduisant par une potentialisation de l'effet pro-apoptotique de l'agent anticancéreux. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cet effet potentialisateur. Par exemple, le composé Verapamil, un inhibiteur des canaux calciques, est capable de favoriser l'interaction entre le Tamoxifène et sa cible, la protéine ER α , aboutissant à un effet potentialisateur (Gupta *et al.*, 1994). Un autre composé, le Nordamnacanthol (un antibiotique extrait des racines de la plante *Morinda elliptica*) exerce son activité potentialisatrice sur la lignée T47D *via* sa capacité à produire des ROS (Kallio *et al.*, 2005). Il est à noter que les doses de Tamoxifène employées dans ces 2 études sont respectivement 2 et 3 fois supérieures aux doses utilisées au cours de cette thèse, soulignant l'intérêt de nos combinaisons thérapeutiques. L'effet potentialisateur des complexes AIM2 et AIM3 pourrait ainsi passer par ces mécanismes. Notamment, la capacité des complexes à instaurer un stress oxydant dans la lignée MDA-MB231 souligne l'intérêt de réaliser la même étude dans la lignée T47D. De plus, pour clairement établir le lien entre production de ROS et effet potentialisateur, il sera intéressant de co-traiter des cellules T47D avec AIM2/3 et un agent antioxydant, comme la N-Acétylcystéine, et d'étudier l'influence de ce co-traitement sur l'effet potentialisateur des complexes.

Les cellules mammaires saines MCF-10A n'expriment pas la protéine ER α , les rendant hypothétiquement insensibles au Tamoxifène (Abukhdeir *et al.*, 2006). Pour autant, nos résultats mettent en évidence une sensibilité à l'agent d'hormonothérapie. Ces résultats vont dans le même sens que les travaux de Yaacob. *et al.*, qui montraient une entrée en apoptose des cellules MCF-10A traitées avec 15 μ M de Tamoxifène, dès 24h de traitement (Yaacob and Ismail, 2014). Une possible explication de cette sensibilité au Tamoxifène en absence de sa cible ER α repose sur le variant β du récepteur aux œstrogènes (ER β). En effet, de plus en plus de preuves tendent à montrer que l'expression d'ER β sensibilise les cellules cancéreuses mammaires à l'effet pro-apoptotique du Tamoxifène (Hodges-Gallagher *et al.*, 2008). Dès lors, la sensibilité observée des cellules MCF-10A face au Tamoxifène pourrait être médiée par le variant β du récepteur aux œstrogènes, dont l'expression est forte dans ces cellules (Treeck *et al.*, 2010). Par la suite, nos résultats ont montré que les complexes AIM2/3 permettent de sensibiliser les cellules MCF-10A à l'effet pro-apoptotique du Tamoxifène. Il est décrit que le Tamoxifène exerce son activité cytotoxique dans les cellules MCF-10A *via* sa capacité à induire la formation de lésions de l'ADN, mises en évidence par le test de comète (Yaacob and Ismail, 2014). Ainsi, l'effet potentialisateur face au Tamoxifène observé dans les cellules MCF-10A prétraitées avec nos complexes AIM2/3 pourrait faire intervenir la formation de lésions de l'ADN à la fois par les complexes organométalliques (comme montré dans les cellules MDA-MB231) et par le Tamoxifène. Pour soutenir cette hypothèse, il conviendra d'étudier l'effet d'AIM2/3 sur la formation de dommages à l'ADN dans les cellules MCF-10A. De plus, bien que les cellules MCF-10A sont présentées comme des cellules mammaires saines, elles possèdent une forte capacité proliférative qui ne reflète pas la prolifération de cellules mammaires saines *in vivo*. Par conséquent, les effets du Tamoxifène observés dans cette lignée pourrait être dus à leur prolifération excessive.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les cellules saines mammaires MCF-10A sont sensibilisées à l'effet pro-apoptotique du Tamoxifène par les complexes AIM2/3 (**Figure 62**), ce qui pourrait être à l'origine d'effets secondaires. Pour autant, ces complexes permettent d'améliorer la réponse des cellules tumorales mammaires T47D à l'agent d'hormonothérapie (**Figure 62**). Ainsi, il conviendra de décider si l'effet bénéfique apporté par ces complexes dans les tumeurs hormono-sensibles surpasse les effets secondaires potentiels.

Enfin, nos résultats ont mis en évidence une synergie d'action entre AIM2/3 et le Tamoxifène dans la lignée triple négative MDA-MB231, sans que cela ne se traduise par une potentialisation de l'effet pro-apoptotique de l'agent d'hormonothérapie. Cet effet synergique

pourrait s'expliquer par une inhibition combinée de la prolifération cellulaire induite à la fois par AIM2/3 et par le Tamoxifène. L'effet cytostatique du Tamoxifène dans les cellules MDA-MB231 a été étudié par Todorova *et al.*, qui ont mis en évidence un blocage en phase S associée à une inhibition de l'import en glutamine induite par le Tamoxifène (Todorova *et al.*, 2011). Pour confirmer l'effet cytostatique synergique d'AIM2/3 et du Tamoxifène, il conviendra de comparer le pourcentage de cellules en prolifération (par mesure de l'incorporation de l'EdU par exemple) dans les conditions « AIM », « Tamoxifène » et « AIM + Tamoxifène ». Ces expériences de potentialisation dans la lignée triple négative MDA-MB231 ont été réalisées en parallèle de l'étude de la réinduction génique induite par AIM2/3. En effet, une diminution du taux de 5-méthylcytosines a été observée en présence des complexes organométalliques, associée à une potentielle réinduction génique. Nous avons donc étudié le cas du gène codant la protéine ER α , puisque son expression est inhibée dans cette lignée par hyperméthylation de son promoteur (Prabhu *et al.*, 2012). En accord avec ces travaux, l'utilisation de l'agent déméthylant 5-azadésoxycytidine, en association avec l'inhibiteur d'Histones Acétyltransférases TSA (Trichostatine A), a permis la réinduction de l'expression du gène codant ER α dans les cellules triples négatives MDA-MB231, rendant les cellules sensibles au Tamoxifène (Ferguson *et al.*, 1995)(Sharma *et al.*, 2006). Nos résultats de PCR n'ont pas permis de mettre en évidence une réinduction de l'expression du gène codant ER α . La question du devenir des 5-méthylcytosines sous traitement avec AIM2 et AIM3 se pose. En effet, dans les mécanismes de déméthylation classique, les 5-méthylcytosines (5mC) sont converties en différents intermédiaires (5-hydroxyméthylcytosines, 5-carboxycytosines, 5-formylcytosines), qui seront reconnus par les systèmes de réparation de l'ADN, et remplacés par des cytosines non méthylées (Franchini *et al.*, 2012). Des analyses en spectrométrie de masse, qui ont permis de vérifier la diminution des 5mC sous traitement avec AIM2 et AIM3, n'ont cependant pas permis de détecter la présence de 5-hydroxyméthylcytosines. Ainsi, à l'heure actuelle, nous ne sommes pas capables d'associer la diminution du taux de 5mC avec une réinduction génique. L'incapacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une déméthylation complète du promoteur du gène codant ER α , et donc de réinduire son expression, pourrait permettre d'expliquer l'absence de restauration de la sensibilité des cellules MDA-MB231 au Tamoxifène, comme ce qui avait été observé par Sharma *et al.* en présence de 5-azadésoxycytidine (Sharma *et al.*, 2006).

Ces résultats concernant la lignée MDA-MB231 indiquent que les complexes AIM2 et AIM3 ne permettent pas de sensibiliser les cellules triples négatives au Tamoxifène.

Comme cité dans l'introduction, la Doxorubicine et le 5-Fu sont classiquement prescrits dans le cadre de la prise en charge thérapeutique de nombreux cancers, dont celui du sein. Cependant, leur utilisation clinique est fortement limitée par les effets secondaires observés. Dès lors, la caractérisation de composés permettant de potentialiser leurs effets anticancéreux permet d'envisager le recours à des doses plus faibles de chimiothérapie, et donc de réduire les effets secondaires. Nos résultats ont montré que les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB31 et T47D sont sensibles à la Doxorubicine, comme ce qui est décrit dans la littérature à des doses et des temps similaires à nos expériences (Marinello *et al.*, 2019)(Pichot *et al.*, 2009)(Smith *et al.*, 2006)(Wen *et al.*, 2018). De plus, les complexes AIM2 et AIM3 permettent de potentialiser l'effet pro-apoptotique de la Doxorubicine dans ces lignées cancéreuses. Plusieurs mécanismes d'action sont envisageables pour cet effet potentialisateur, comme une augmentation de l'accumulation intracellulaire en Doxorubicine. Ainsi, le Querceptin, un métabolite secondaire de type flavonoïde présent dans certaines plantes, sensibilise les cellules MDA-MB231 et T47D à l'effet cytotoxique de la Doxorubicine (dont les doses utilisées sont 40 fois supérieures à la dose utilisée dans nos travaux) par inhibition de l'expression du transporteur d'efflux ABC, aboutissant à une accumulation cytoplasmique accrue de l'agent de chimiothérapie (Li *et al.*, 2018). L'autofluorescence émise par la Doxorubicine pourrait être utilisée pour étudier une potentielle augmentation de la concentration intracellulaire en présence d'AIM2 et AIM3. De plus, la forme active de la Vitamine D (1,25-dihydroxyvitamine D3), permet de sensibiliser la lignée cancéreuse MCF-7 à l'effet cytotoxique de la Doxorubicine (utilisée à une dose 2 fois supérieure à celle utilisée au cours de cette thèse) en induisant une production accrue de ROS (Ravid *et al.*, 1999). Au vu de la capacité des molécules AIM2 et AIM3 à induire une production de ROS dès 24h de traitement dans la lignée MDA-MB231, il conviendra d'étudier le lien entre ROS et effet potentialisateur. Pour ce faire, l'effet d'un agent antioxydant devra être étudié. Concernant le 2^{ème} agent de chimiothérapie étudié, le 5-Fu, des différences de base en terme de sensibilité des cellules ont été observées. En effet, les cellules T47D semblent être sensibles à l'agent de chimiothérapie, ce qui n'est pas le cas des cellules MDA-MB231. Cette différence a également été observée dans une étude de 2013 qui corrélait ces différences de sensibilité au niveau d'expression des enzymes TS (Thymidilate Synthétase) et DPYD (Dihydropyrimidine Déshydrogénase), des cibles moléculaires du 5-Fu (Li *et al.*, 2013a). En effet, les cellules MDA-MB231 sont caractérisées par un faible taux protéique de TS et DPYD, associé à une insensibilité au 5-Fu, alors que les cellules T47D expriment

fortement les deux protéines et sont sensibles à l'agent de chimiothérapie. Ensuite, nos résultats ont montré que seule la molécule AIM3 permet de potentialiser l'effet cytotoxique du 5-Fu dans les lignées cancéreuses mammaires MDA-MB231 et T47D, mettant en évidence pour la 1^{ère} fois des différences en termes d'effets cellulaires entre les molécules AIM2 et AIM3. Le 5-Fu est un analogue de l'uracile nécessitant son incorporation dans l'ADN au cours de la phase S. L'analyse du cycle cellulaire des cellules MDA-MB231 traitées pendant 24h avec AIM2 et AIM3 avait mis en évidence une légère diminution du pourcentage de cellules en phase G0/G1, associée à une légère augmentation du nombre de cellules en phase G2/M (Thèse de Jie Li, 2018). Ainsi, malgré le fait qu'un prétraitement de 24h avec les complexes AIM2 et AIM3 induise un arrêt total de la prolifération cellulaire, le nombre de cellules en phase S, phase dans laquelle le 5-Fu exerce son activité cytotoxique, n'est que très faiblement modifié en présence des complexes par rapport aux cellules non traitées. Ces données permettent d'expliquer comment le 5-Fu peut induire une entrée en apoptose de cellules inhibées dans leur prolifération par un traitement avec AIM2 et AIM3. L'incorporation du 5-Fu au cours de la phase S va induire une inhibition de différentes enzymes, comme l'enzyme TS. Des inhibiteurs d'Histones Désacétylases (HDAC) permettent de sensibiliser la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB468 au 5-Fu au travers de leur capacité à induire une augmentation de l'expression de l'enzyme cible du 5-Fu, la protéine TS (Minegaki *et al.*, 2018). L'influence d'un traitement avec AIM2 et AIM3 sur l'expression de cibles du 5-Fu devra être étudiée.

Dans nos conditions, il ne semblerait pas que la Doxorubicine et le 5-Fu soient capables d'induire l'apoptose des cellules mammaires saines MCF-10A, comme ce qui est le cas dans les cellules cancéreuses MDA-MB231 et T47D. Cette absence d'effet cytotoxique a été vérifiée par l'observation d'une absence d'augmentation du nombre de cellules en phase sub-G1 en présence de Doxorubicine et de 5-Fu dans les cellules MCF-10A. L'insensibilité des cellules MCF-10A en présence de doses (50 ng/mL) et de temps de traitement (48h) de Doxorubicine similaires à nos expériences a été vérifiée dans une étude de 2018 (Wen *et al.*, 2018). De plus, le traitement des cellules MCF-10A avec 50 μ M de 5-Fu (la dose employée dans nos expériences) ne permet pas d'observer de diminution de la viabilité cellulaire même après 72h de traitement (Correia *et al.*, 2018). Enfin, la synergie d'action entre AIM2/3 et les agents de chimiothérapie ne se traduit pas par une potentialisation de l'effet pro-apoptotique de la Doxorubicine et du 5-Fu dans la lignée MCF-10A. Ainsi, tout comme les cellules MDA-MB231 traitées au Tamoxifène, cet effet synergique pourrait s'expliquer par une inhibition combinée de la prolifération cellulaire par AIM2/3 et les agents de chimiothérapie. L'effet cytostatique

de la Doxorubicine sur la lignée MCF-10A a été observée à des doses de 50 μ M après 72h de traitement (Staedler *et al.*, 2011). Une autre étude a confirmé cet effet cytostatique de la Doxorubicine, qui induit un blocage des cellules en phase G2/M (Guerriero *et al.*, 2017). Concernant le 5-Fu, un blocage en phase G0/G1 a été observée dans la lignée MCF-10A sans que la proportion de cellules en phase sub-G1 ne soit affectée (Vinod *et al.*, 2013). Notre étude du cycle cellulaire a confirmé ces résultats en mettant en évidence un blocage des cellules MCF-10A traitées à la Doxorubicine et au 5-Fu respectivement en phase G2/M et en phase G0/G1. Pour confirmer l'effet cytostatique synergique d'AIM2/3 et des agents de chimiothérapie, il conviendra de comparer le pourcentage de cellules en prolifération dans les conditions « AIM », « Doxorubicine/5-Fu » et « AIM + Doxorubicine/5-Fu ».

L'ensemble de ces résultats permettent de conclure que les complexes AIM2 et AIM3 sont capables de sensibiliser les cellules T47D et MCF-10A à la mort induite par le Tamoxifène (**Figure 62**), et les cellules MDA-MB231 et T47D à l'effet cytotoxique de la Doxorubicine (**Figure 62**). Quant au 5-Fu, seule la molécule AIM3 est capable de potentialiser son effet pro-apoptotique dans les lignées MDA-MB231 et T47D (**Figure 62**).

En plus de la chimiothérapie, la radiothérapie est fréquemment prescrite dans le traitement de certains cancers, dont celui du sein. Tout comme dans le cas de molécules anticancéreuses, son utilisation est associée à des effets secondaires. La caractérisation de composés capables de potentialiser l'effet de la radiothérapie permet également d'envisager une meilleure réponse à des doses faibles de rayonnements, limitant ainsi les effets secondaires. L'idée d'étudier la capacité radiopotentialisatrice des complexes AIM2 et AIM3 repose 1) sur l'observation des effets potentialisateurs face à des agents de chimiothérapie, et 2) sur la capacité des complexes à induire des dommages à l'ADN associée à une sensibilisation des cellules traitées face à la mort induite par des rayonnements ultraviolets. Les résultats ont montré que les complexes AIM2 et AIM3 permettent de sensibiliser les cellules MDA-MB231, T47D et MCF-10A à la mort induite par les radiations ionisantes (**Figure 62**). La radiothérapie exerce son effet cytotoxique par la génération de dommages de l'ADN de types oxydation de bases, cassures simples ou doubles brins. Les cassures doubles brins sont décrites comme composant majeur de l'effet cytotoxique de la radiothérapie. Or, l'étude de deux marqueurs des cassures doubles brins (γ -H2AX et TP53BP1) a révélé la capacité des complexes à produire des cassures doubles brins de l'ADN des cellules MDA-MB231 dès 72h de traitement. Pour autant, nos expériences de sensibilisation à la radiothérapie correspondaient à un prétraitement

avec AIM2/3 de 24h. Ceci suggère donc que la capacité de nos complexes à former des cassures doubles brins ne permet pas d'expliquer leur effet sensibilisateur dans les cellules MDA-MB231. Pour autant, il n'est pas exclu que les complexes AIM2/3 soient capables de produire d'autres types de lésions de l'ADN dès 24h de traitement, qui seraient à l'origine de la radiopotentialisation observée. Ainsi, comme cité précédemment, les cassures doubles brins mises en évidence pourraient être la conséquence d'une réparation d'adduits AIM-ADN qui pourraient apparaître dès 24h de traitement. Les rayons de radiothérapie peuvent générer directement des lésions de l'ADN par ionisation de la molécule, bien que ce phénomène soit minoritaire. En effet, la majorité des dommages à l'ADN est une conséquence indirecte de la production d'espèces réactives de l'oxygène produites par la radiolyse de l'eau (Kim *et al.*, 2019). Par conséquent, la radiosensibilisation observée à 24h de traitement avec AIM2/3 dans les cellules MDA-MB231 peut s'expliquer par leur capacité à augmenter la concentration intracellulaire de ROS dès 24h de traitement, qui s'additionneraient aux ROS produits par les rayons ionisants. Il reste à savoir si cette augmentation est due à une production accrue de ROS et/ou à une diminution des défenses anti-oxydantes. En effet, l'effet sensibilisateur du composé AMRI-59, un inhibiteur de l'activité de l'enzyme antioxydante peroxyredoxine, repose sur sa capacité à induire une augmentation de la quantité intracellulaire de ROS dans des cellules cancéreuses pulmonaires irradiées par des rayons de radiothérapie (Hong *et al.*, 2017). Concernant les lignées T47D et MCF-10A, il conviendra de déterminer l'effet des complexes AIM2 et AIM3 sur la quantité intracellulaire en ROS, comme ce qui a été fait pour les cellules MDA-MB231. Pour établir un lien entre ROS et radiopotentialisation, il serait intéressant dans un premier temps d'étudier l'effet d'un prétraitement de 2 μ M de la lignée MDA-MB231 avec le complexe Ru avant irradiation, puisque nos expériences ont montré que ce complexe n'est pas capable d'induire d'augmentation de la quantité intracellulaire en ROS dans la lignée MDA-MB231 à 24h de traitement. Mais pour clairement mettre en évidence l'importance des ROS dans cet effet sensibilisateur, il serait intéressant de réaliser des co-traitements des lignées MDA-MB231, T47D et MCF-10A avec un agent antioxydant, afin de diminuer la quantité intracellulaire en ROS, et d'étudier l'effet sur la capacité radiopotentialisatrice des complexes organométalliques.

Ces résultats suggèrent que ces complexes pourraient être employés en tant que radiosensibilisateur, comme la gemcitabine (Murphy *et al.*, 2008), le cisplatine (Boeckman *et al.*, 2005) et les dérivés fluoropyrimidines (McGinn *et al.*, 1996). La radiosensibilisation observée dans les cellules mammaires saines MCF-10A pourrait être évitée en clinique par

l'utilisation de nouvelles technologies de radiothérapie, comme la RCMI (Radiothérapie conformationnelle par modulation d'intensité). Cette technique consiste à discriminer avec précision la tumeur des tissus sains qui l'entourent, et de n'appliquer la radiothérapie qu'aux tissus cancéreux, en protégeant ainsi les tissus sains (Taylor and Powell, 2004).

Conclusion & perspectives

Malgré le doublement de l'incidence du cancer du sein depuis les années 1980, sa mortalité s'est stabilisée. Ces données encourageantes permettent de confirmer l'efficacité des nouvelles stratégies de dépistage précoce et de traitements des tumeurs mammaires. Pour autant, le cancer du sein reste l'une des pathologies les plus mortelles malgré ces progrès (INCa). Cette forte mortalité s'explique par 1) le manque de biomarqueurs permettant de prédire la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein, la progression métastatique et la réponse aux thérapies des tumeurs mammaires, ainsi que le risque de récidiver après traitement ; 2) les cas de résistance, soit innée soit acquise aux traitements ; 3) les effets secondaires souvent lourds des chimiothérapies conventionnelles et de la radiothérapie ; et enfin 4) le cas des tumeurs triples négatives, qui en plus d'être fortement invasives, répondent pas ou peu à la chimiothérapie conventionnelle. De plus, l'absence d'expression des récepteurs hormonaux empêche le recours à l'hormonothérapie, participant au mauvais pronostic de ce sous-type tumoral.

L'ensemble de ces limites souligne l'intérêt de poursuivre les recherches en cancérologie mammaire pour identifier de nouveaux marqueurs moléculaires prédictifs, et élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. De plus, la caractérisation de nouveaux agents capables d'induire une réponse des tumeurs mammaires triples négatives pourrait permettre d'améliorer le pronostic de ces tumeurs. C'est dans ce double axe de recherche que s'inscrivent les travaux du laboratoire.

Les résultats préliminaires du laboratoire avaient identifié la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) comme un bon candidat pour la prédiction du devenir métastatique des tumeurs mammaires, ainsi que de leur réponse aux agents de chimiothérapie. En effet, les expériences avaient montré que la protéine est différentiellement exprimée dans les cellules tumorales mammaires selon leur statut métastatique. Ainsi, les lignées mammaires cancéreuses faiblement agressives (MCF-7 et T47D) expriment fortement la protéine DDB2, qui participe à limiter l'acquisition des capacités invasives et migratrices des cellules. Au contraire, les lignées tumorales mammaires agressives (MDA-MB231 et Hs578t) expriment pas ou peu la protéine. La modulation de l'expression de DDB2 dans ces lignées agressives permet de

modifier leur capacité invasives et migratrices *in vitro* et *in vivo*, ainsi que leur sensibilité à des agents de chimiothérapie conventionnelle (Doxorubicine et 5-Fluorouracile).

Au vu de ces résultats, il apparaissait donc important de déterminer la valeur prédictive de la protéine DDB2 dans le cancer du sein. Dans ce sens, différentes bases de données transcriptomiques ont été utilisées. Dans un premier temps, l'étude *in silico* a révélé une diminution de l'expression du gène *ddb2* dans certains tissus cancéreux par rapport à leurs équivalents sains, dont les tissus mammaires, colorectaux, ovariens et prostatiques, ces résultats corroborant ceux déjà obtenus par d'autres équipes (Roy *et al.*, 2013)(Han *et al.*, 2014)(Chen *et al.*, 2017). Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la diminution de l'expression du gène au cours de la carcinogenèse mammaire, le statut mutationnel de *ddb2* a été étudié. Le gène ne semble être altéré que très rarement dans les tumeurs mammaires, suggérant l'intervention d'autres mécanismes que les mutations, comme l'épigénétique. La compréhension des mécanismes de régulation de l'expression du gène *ddb2* dans les cellules tumorales mammaires permet d'envisager sa réinduction, notamment dans les cellules cancéreuses triples négatives, dans le but de limiter leur capacité invasives et migratrices, et de les sensibiliser à la chimiothérapie. Ces effets permettraient alors d'améliorer le pronostic des tumeurs mammaires triples négatives.

Au sein des tumeurs mammaires, l'étude *in silico* a également révélé que le gène *ddb2* est différentiellement exprimé en fonction de l'agressivité des tumeurs. En effet, son expression, qui est maximale dans les tumeurs faiblement agressives non triples négatives (Luminal A et B), diminue dans les tumeurs mammaires triples négatives fortement agressives (Basal-Like et Normal-Like). En accord avec ces résultats, une forte expression de *ddb2* au sein des tumeurs mammaires est prédictive d'une meilleure survie globale, d'une meilleure survie sans métastase et d'une meilleure survie après chimiothérapie néo-adjuvante, confirmant les résultats acquis par le laboratoire. Enfin, une faible expression de *ddb2* permet également de prédire un risque accru de récurrence après traitement.

L'ensemble de ces résultats permettent de confirmer l'intérêt clinique du niveau d'expression du gène *ddb2* comme biomarqueur du pronostic des tumeurs mammaires, de leur progression métastatique, de leur réponse à la chimiothérapie, ainsi que du risque de rechute après traitement. L'intérêt clinique du gène codant DDB2 devra par la suite être validé au cours d'essais cliniques.

Un autre axe de recherche en cancérologie se concentre sur l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans cette recherche de nouveaux traitements, de plus en plus d'attention se tourne vers la famille des complexes organométalliques. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette 2^{ème} partie de thèse qui visait à étudier les effets cellulaires de complexes organométalliques dans des lignées mammaires. Différents complexes organométalliques ont été synthétisés, et des modélisations moléculaires ont révélé leur capacité à interagir avec la molécule d'ADN. Des études *in cellulo* avaient révélé que cette interaction était associée à une inhibition de la prolifération de cellules tumorales mammaires et d'une lignée mammaire saine, sans cytotoxicité apparente, même à des temps longs. L'hypothèse de la sénescence cellulaire comme mécanisme antiprolifératif a été émise. Ainsi, des changements morphologiques, comme l'acquisition d'une morphologie étendue avec des extensions cytoplasmiques, une augmentation de la taille et de la granulosité cellulaire, ainsi qu'une augmentation de la taille des noyaux, ont été observés sous traitement avec AIM2 et AIM3. Ces modifications phénotypiques, qui concernaient à la fois les lignées tumorales mammaires MDA-MB231 et MCF-7 et la lignée mammaire saine MCF-10A, accompagnent souvent une induction de la sénescence. L'analyse d'un marqueur de la sénescence, la SA- β -Galactosidase, a permis de confirmer une induction de la sénescence des lignées tumorales mammaires traitées avec AIM2 et AIM3, ainsi que de la lignée mammaire saine uniquement avec la molécule AIM3. Cette induction de la sénescence s'accompagnait d'une augmentation de l'expression du gène codant p21, un inhibiteur du cycle cellulaire. De plus, comme ce qui est décrit généralement pour les cellules sénescents, une augmentation de la quantité intracellulaire en espèces réactives de l'oxygène et l'apparition de lésions de l'ADN accompagnent cette entrée en sénescence dans la lignée MDA-MB231. Enfin, lorsque les molécules sont retirées du milieu de culture, seules les cellules mammaires saines sont capables de réacquérir un pouvoir prolifératif. Ces différences de la réversibilité de la prolifération entre lignées mammaires saines et cancéreuses ont été associées à la réversibilité de la sénescence induite par AIM3 dans les cellules mammaires saines. Cet état de sénescence est maintenu dans les cellules cancéreuses mammaires, aboutissant à un maintien de l'effet cytostatique d'AIM2/3 dans ces lignées. Ces résultats permettent d'identifier la sénescence comme mécanisme à l'origine de l'effet cytostatique des complexes AIM2 et AIM3 à des temps longs. De plus, l'induction de la sénescence est de plus en plus considérée comme une cible thérapeutique, de par l'inhibition de la prolifération cellulaire qui l'accompagne. Dès lors, une recherche active de composés capables d'induire la sénescence, prenant le nom de sénostatiques, est en cours. Nos complexes

AIM2 et AIM3 pourraient alors être utilisés en clinique comme agents sénostatiques pour s'opposer au développement de tumeurs mammaires. Pour autant, leur effet prosénescence concernerait également des cellules saines environnantes, à l'origine de possibles effets secondaires. Pour limiter ces effets néfastes, une stratégie envisageable est d'arrêter le traitement avec les molécules AIM2 et AIM3. Ceci aura pour effet de 1) maintenir l'inhibition de la prolifération au sein de la tumeur, et de 2) réinduire la prolifération des cellules mammaires saines environnantes. Les effets bénéfiques de la sénescence doivent cependant être nuancés par les effets délétères qu'elle peut présenter. En effet, le phénotype sécrétoire des cellules sénescents, appelé SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype), peut favoriser la transformation maligne de cellules saines environnantes et/ou favoriser la progression métastatique de cellules tumorales. Ainsi, il conviendra d'étudier l'influence d'une co-culture entre des cellules cancéreuses mammaires rendues sénescents par l'action des complexes AIM2 et AIM3, et des cellules mammaires saines ou des cellules cancéreuses non sénescents. Pour autant, ces effets délétères peuvent être limités *in vivo* par la capacité du SASP à recruter les cellules du système immunitaire qui se chargeront de l'élimination spécifique des cellules cancéreuses sénescents. Ainsi, il conviendra d'étudier le devenir de cellules cancéreuses mammaires rendues sénescents par l'action de nos complexes après injection dans des souris immunocompétentes. Ces expériences complémentaires permettront d'envisager l'utilisation clinique des molécules AIM2 et AIM3 comme agents sénostatiques permettant de limiter le développement de tumeurs mammaires dans un premier temps, puis permettent l'élimination spécifique des cellules cancéreuses sénescents dans un second temps.

L'inhibition de la prolifération cellulaire induite par les complexes AIM2 et AIM3 a été observée dès 24h de traitement. De plus, une diminution du taux de 5-méthylecytosines dès 1h de traitement avec AIM2/3 a été observée. Cette capacité déméthylante peut être associée à une potentielle réinduction de gènes dont l'expression est inhibée par hyperméthylation de leur promoteur, et qui pourraient influencer la réponse cellulaire aux traitements. Dans ce sens, une étude a montré que le recours à l'agent déméthylant 5-azadésoxycytidine dans le cas des lymphomes B diffus à grandes cellules permet de réinduire l'expression de 9 gènes, dont *SMAD1*, à l'origine d'une sensibilisation à la Doxorubicine (Clozel *et al.*, 2013). Enfin, un prétraitement de 24h avec AIM2 permet de sensibiliser les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB231 à la mort induite par les UVs. L'ensemble de ces données nous ont poussés à étudier l'effet potentialisateur des complexes AIM2 et AIM3 face à différents traitements

prescrits dans la prise en charge du cancer du sein. Au cours de cette thèse, l'effet sensibilisant des complexes nommés AIM2 et AIM3, a été démontré face :

1) A un agent d'hormonothérapie (Tamoxifène) dans les cellules tumorales mammaires ER α positives T47D et la lignée mammaire saine MCF-10A. Ces résultats indiquent que les molécules AIM2 et AIM3 pourraient être utilisées en clinique pour améliorer le traitement par hormonothérapie des tumeurs mammaires hormono-dépendantes, bien que cet effet toucherait potentiellement des cellules saines.

2) A deux agents de chimiothérapie conventionnelle (Doxorubicine & 5-Fluorouracile) uniquement dans les cellules tumorales mammaires, en épargnant la lignée mammaire saine MCF-10A. Ces expériences soulignent la potentielle utilisation des molécules AIM2 et AIM3 comme agents potentialisateurs de l'effet cytotoxique de la chimiothérapie conventionnelle, et ce uniquement au niveau de la tumeur. Ces molécules pourraient donc apporter une certaine spécificité de traitement au niveau de la tumeur, limitant les effets secondaires de la thérapie.

3) A la radiothérapie dans deux lignées cancéreuses mammaires et une lignée mammaire saine. Ces résultats indiquent que les molécules AIM2 et AIM3 pourraient correspondre à des nouveaux agents radiopotentialisateurs pour augmenter la sensibilité des tissus cancéreux mammaires à la radiothérapie. L'effet potentialisateur de ces molécules sur les cellules mammaires saines pourrait être empêché par les nouvelles techniques de radiothérapie, qui visent à irradier uniquement la tumeur.

Parmi ces effets potentialisateurs, ceux observés sur la lignée triple négative MDA-MB231 en présence de Doxorubicine, de 5-Fluorouracile et de rayons ionisants sont d'autant plus intéressants que peu d'options thérapeutiques sont actuellement disponibles pour ce type de tumeurs, ce qui participe à leur mauvais pronostic.

Avant d'envisager leur utilisation en clinique, il est nécessaire de poursuivre les recherches *in vitro* sur les mécanismes sous-jacents à l'effet sensibilisateur des complexes organométalliques AIM2 et AIM3. Différentes pistes ont été amenées au travers de cette thèse, comme l'implication des espèces réactives de l'oxygène induites par les complexes AIM2 et AIM3, ainsi que la déméthylation de l'ADN potentiellement associée à une réinduction de l'expression de gènes importants pour la sensibilité des cellules aux thérapies anticancéreuses. Ces études devront également être complétées par des études de la toxicité de ces molécules chez l'animal.

Les travaux de cette thèse tendent à répondre aux besoins actuels en cancérologie à la fois de nouveaux biomarqueurs de la progression du cancer du sein, mais également de nouvelles stratégies thérapeutiques comme 2^{ème} ligne de traitement dans le cas d'échec thérapeutique et/ou d'effets secondaires trop importants.

Références bibliographiques

A

Aan, G.J., Hairi, H.A., Makpol, S., Rahman, M.A., and Karsani, S.A. (2013). Differences in protein changes between stress-induced premature senescence and replicative senescence states. *Electrophoresis* 34, 2209–2217.

Abukhdeir, A.M., Blair, B.G., Brenner, K., Karakas, B., Konishi, H., Lim, J., Sahasranaman, V., Huang, Y., Keen, J., Davidson, N., *et al.* (2006). Physiologic estrogen receptor alpha signaling in non-tumorigenic human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 99, 23–33.

Ahmad, K., Khan, M.K.A., Baig, M.H., Imran, M., and Gupta, G.K. (2018). Role of Azoles in Cancer Prevention and Treatment: Present and Future Perspectives. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 18, 46–56.

Ahmed, A.R.H. (2016). HER2 expression is a strong independent predictor of nodal metastasis in breast cancer. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* 28, 219–227.

Aird, K.M., and Zhang, R. (2013). Detection of senescence-associated heterochromatin foci (SAHF). *Methods Mol. Biol.* 965, 185–196.

Al-Khalaf, H.H., Ghebeh, H., Inass, R., and Aboussekhra, A. (2018). Senescent Breast Luminal Cells Promote Carcinogenesis through Interleukin-8-Dependent Activation of Stromal Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 39.

Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13742–13747.

Alessio, E., and Messori, L. (2018). The deceptively similar ruthenium(III) drug candidates KP1019 and NAMI-A have different actions. What did we learn in the past 30 years? *Met. Dev. Action Anticancer Agents* 18, 141–170.

Aliouat-Denis, C.M., Dendouga, N., Van Den Wyngaert, I., Goehlmann, H., Steller, U., Van De Weyer, I., Van Slycken, N., Andries, L., Kass, S., Luyten, W., *et al.* (2005). p53-independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2. *Mol. Cancer Res.* 3, 627–634.

Allen, J.R., Armstrong, B.K., and Bannasch, P. (1978). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. to Humans. Vol. 17. Some N-Nitroso Compd. (365p.); S.

Almnaseer, Z.A., and Mourtada-Maarabouni, M. (2018). Long noncoding RNA MIAT

regulates apoptosis and the apoptotic response to chemotherapeutic agents in breast cancer cell lines. *Biosci. Rep.* 38.

Ameziane-El-Hassani, R., and Dupuy, C. (2017). Detection of reactive oxygen species in cells undergoing oncogene-induced senescence. *Methods Mol. Biol.* 1534, 139–145.

Andrews, N.C. (2000). Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat. Rev. Genet.* 1, 208–217.

Arora, S., Kothandapani, A., Tillison, K., Kalman-Maltese, V., and Patrick, S.M. (2010). Downregulation of XPF-ERCC1 enhances cisplatin efficacy in cancer cells. *DNA Repair (Amst)*. 9, 745–753.

Arpino, G. (2003). Progesterone Receptor Status Significantly Improves Outcome Prediction Over Estrogen Receptor Status Alone for Adjuvant Endocrine Therapy in Two Large Breast Cancer Databases. *Artic. J. Clin. Oncol.*

Atadja, P., Wong, H., Garkavtsev, I., Veillette, C., and Riabowol, K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8348–8352.

B

Bai, W., Wu, Y., Zhang, P., and Xi, Y. (2015). Correlations between expression levels of thymidylate synthase, thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase, and efficacy of 5-fluorouracil-based chemotherapy for advanced colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 12333–12345.

Bansode, P., Patil, P., Choudhari, P., Bhatia, M., Birajdar, A., Somasundaram, I., and Rashinkar, G. (2019). Anticancer activity and molecular docking studies of ferrocene tethered ionic liquids. *J. Mol. Liq.* 290.

Barakat, B.M., Wang, Q.-E., Han, C., Milum, K., Yin, D.-T., Zhao, Q., Wani, G., Arafa, E.-S.A., El-Mahdy, M.A., and Wani, A.A. (2010). Overexpression of DDB2 enhances the sensitivity of human ovarian cancer cells to cisplatin by augmenting cellular apoptosis. *Int. J. Cancer* 127, 977–988.

Barbieux (2015). Rôles de la protéine Damaged-DNA Binding 2 sur l'adhérence, les propriétés nanomécaniques et la voie du TGFβ1 dans les cellules tumorales mammaires.

Barbieux, C., Bacharouche, J., Soussen, C., Hupont, S., Razafitianamaharavo, A., Klotz, R., Pannequin, R., Brie, D., Bécuwe, P., Francius, G., *et al.* (2016). DDB2 (damaged-DNA binding 2) protein: a new modulator of nanomechanical properties and cell adhesion of breast cancer cells. *Nanoscale* 8.

Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., and Yeoh, K.W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.* 1.

Batsché, E., Muchardt, C., Behrens, J., Hurst, H.C., and Crémisi, C. (1998). RB and c-Myc

Activate Expression of the E-Cadherin Gene in Epithelial Cells through Interaction with Transcription Factor AP-2. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 3647–3658.

Beaver, J.A., Amiri-Kordestani, L., Charlab, R., Chen, W., Palmby, T., Tilley, A., Zirkelbach, J.F., Yu, J., Liu, Q., Zhao, L., *et al.* (2015). FDA approval: Palbociclib for the treatment of postmenopausal patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *21*, 4760–4766.

Bent, E.H., Gilbert, L.A., and Hemann, M.T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes Dev.* *30*, 1811–1821.

Bergamo, A., Gagliardi, R., Scarcia, V., Furlani, A., Alessio, E., Mestroni, G., and Sava, G. (1999). In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *289*, 559–564.

Bergamo, A., Masi, A., Peacock, A.F.A., Habtemariam, A., Sadler, P.J., and Sava, G. (2010). In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model. *J. Inorg. Biochem.* *104*, 79–86.

Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K.S., Kemp, C.J., and Roberts, J.M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev.* *20*, 47–64.

Bhat, R., Crowe, E.P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C.D., Garcia, F.U., Johnson, F.B., Trojanowski, J.Q., Sell, C., and Torres, C. (2012). Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS One* *7*, e45069.

Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., and Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell* *16*, 661–671.

Blagosklonny, M. V. (2003). Cell senescence and hypermitogenic arrest. *EMBO Rep.* *4*, 358–362.

Blagosklonny, M. V. (2011). Cell cycle arrest is not senescence. *Aging (Albany. NY)*. *3*, 94–101.

Boeckman, H.J., Trego, K.S., and Turchi, J.J. (2005). Cisplatin sensitizes cancer cells to ionizing radiation via inhibition of nonhomologous end joining. *Mol. Cancer Res.* *3*, 277–285.

Bojko, A., Czarnecka-Herok, J., Charzynska, A., Dabrowski, M., and Sikora, E. (2019). Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells* *8*, 1501.

Bokemeyer, C., Kollmannsberger, C., Harstrick, A., Beyer, J., Gerl, A., Casper, J., Metzner, B., Hartmann, J.T., Schmoll, H.J., and Kanz, L. (1999). Treatment of patients with cisplatin-refractory testicular germ-cell cancer. German Testicular Cancer Study Group (GTCSG). *Int J Cancer* *83*, 848–851.

Bommi, P. V., Ravindran, S., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (2018). DDB2 regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral/Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oncotarget* 9, 34708–34718.

Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., and Burova, E. (2014). Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany, NY)*. 6, 481–495.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 68, 394–424.

Bruyère, C., Mathieu, V., Vessières, A., Pigeon, P., Top, S., Jaouen, G., and Kiss, R. (2014). Ferrocifen derivatives that induce senescence in cancer cells: Selected examples. *J. Inorg. Biochem.* 141, 144–151.

Bunz, F., Dutriau, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science (80-)*. 282, 1497–1501.

Burchenal, J.H., Irani, G., Kern, K., Lokys, L., and Turkevich, J. (1980). 1,2-Diaminocyclohexane platinum derivatives of potential clinical value. *Recent Results Cancer Res.* 74, 146–155.

C

Campisi, J., and D’Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Cappetta, D., De Angelis, A., Sapio, L., Prezioso, L., Illiano, M., Quaini, F., Rossi, F., Berrino, L., Naviglio, S., and Urbanek, K. (2017). Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: A common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017.

Carroll, B., and Korolchuk, V.I. (2018). Nutrient sensing, growth and senescence. *FEBS J.* 285, 1948–1958.

Carroll, B., Nelson, G., Rabanal-Ruiz, Y., Kucheryavenko, O., Dunhill-Turner, N.A., Chesterman, C.C., Zahari, Q., Zhang, T., Conduit, S.E., Mitchell, C.A., *et al.* (2017). Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *J. Cell Biol.* 216, 1949–1957.

Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., and Moreira, P. (2009). Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. *Curr. Med. Chem.* 16, 3267–3285.

- De Cecco, M., Jeyapalan, J., Zhao, X., Tamamori-Adachi, M., and Sedivy, J.M. (2011). Nuclear protein accumulation in cellular senescence and organismal aging revealed with a novel single-cell resolution fluorescence microscopy assay. *Aging (Albany, NY)*. 3, 955–967.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., *et al.* (2012). The cBio Cancer Genomics Portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov.* 2, 401–404.
- Chakradeo, S., W. Elmore, L., and A. Gewirtz, D. (2015). Is Senescence Reversible? *Curr. Drug Targets* 17, 460–466.
- Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S.A., Salama, R., Carroll, T., *et al.* (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. *Mol. Cell* 47, 203–214.
- Chang, B.D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 59, 3761–3767.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., Feng, W., *et al.* (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* 22, 78–83.
- Chang, S.W., Su, C.H., Chen, H.H., Huang, C.W., Tsao, L.P., Tsao, Y.P., and Chen, S.L. (2012). DDB2 is a novel AR interacting protein and mediates AR ubiquitination/ degradation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 1952–1961.
- Chen, H.-M., Pan, C.-C., Tsai, C.-M., Hsu, W.-H., Yang, S.-H., and Yen, C.-C. (2015). Concomitant Primary Lung Cancer and Metastatic Pulmonary Colorectal Cancer that Responded to Gemcitabine/Cisplatin/Bevacizumab Combination Therapy. *J. Cancer Res. Pract.* 2, 76–82.
- Chen, H., Li, Y., and Tollefsbol, T.O. (2013). Cell senescence culturing methods. *Methods Mol. Biol.* 1048, 1–10.
- Chen, H.H., Fan, P., Chang, S.W., Tsao, Y.P., Huang, H.P., and Chen, S.L. (2017). NRIP/DCAF6 stabilizes the androgen receptor protein by displacing DDB2 from the CUL4A-DDB1 E3 ligase complex in prostate cancer. *Oncotarget* 8, 21501–21515.
- Chen, J. can, Zhang, Y., Jie, X. ming, She, J., Dongye, G. zhi, Zhong, Y., Deng, Y. yuan, Wang, J., Guo, B. yang, and Chen, L. mei (2019). Ruthenium(II) salicylate complexes inducing ROS-mediated apoptosis by targeting thioredoxin reductase. *J. Inorg. Biochem.* 193, 112–123.
- Chen, M.-B., Wu, X.-Y., Gu, J.-H., Guo, Q.-T., Shen, W.-X., and Lu, P.-H. (2011). Activation of AMP-activated protein kinase contributes to doxorubicin-induced cell death and apoptosis in cultured myocardial H9c2 cells. *Cell Biochem. Biophys.* 60, 311–322.
- Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., and Ames, B.N. (1998).

Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332, 43–50.

Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., *et al.* (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436, 725–730.

Chin, Y.E., Kitagawa, M., Su, W.C.S., You, Z.H., Iwamoto, Y., and Fu, X.Y. (1996). Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science* (80-.). 272, 719–722.

Chinta, S.J., Lieu, C.A., Demaria, M., Laberge, R.M., Campisi, J., and Andersen, J.K. (2013). Environmental stress, ageing and glial cell senescence: A novel mechanistic link to parkinson's disease? *J. Intern. Med.* 273, 429–436.

Chitikova, Z. V., Gordeev, S.A., Bykova, T. V., Zubova, S.G., Pospelov, V.A., and Pospelova, T. V. (2014). Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR downregulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle* 13, 1424–1439.

Cho, S., and Hwang, E.S. (2012). Status of mTOR activity may phenotypically differentiate senescence and quiescence. *Mol. Cells* 33, 597–604.

Cho, K.A., Sung, J.R., Yoon, S.O., Ji, H.P., Jung, W.L., Kim, H.P., Kyung, T.K., Ik, S.J., and Sang, C.P. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J. Biol. Chem.* 279, 42270–42278.

Choi, Y.H., and Yoo, Y.H. (2012). Taxol-induced growth arrest and apoptosis is associated with the upregulation of the Cdk inhibitor, p21WAF1/CIP1, in human breast cancer cells. In *Oncology Reports*, pp. 2163–2169.

Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 70, 440–446.

Choudhary, A., Zachek, B., Lera, R.F., Zasadil, L.M., Lasek, A., Denu, R.A., Kim, H., Kanugh, C., Laffin, J.J., Harter, J.M., *et al.* (2016). Identification of selective lead compounds for treatment of high-ploidy breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 15, 48–59.

Christopoulos, P.F., Msaouel, P., and Koutsilieris, M. (2015). The role of the insulin-like growth factor-1 system in breast cancer. *Mol. Cancer* 14.

Clozel, T., Yang, S.N., Elstrom, R.L., Tam, W., Martin, P., Kormaksson, M., Banerjee, S., Vasanthakumar, A., Culjkovic, B., Scott, D.W., *et al.* (2013). Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Discov.* 3, 1002–1019.

Collado, M., Medema, R.H., García-Cao, I., Dubuisson, M.L.N., Barradas, M., Glassford, J., Rivas, C., Burgering, B.M.T., Serrano, M., and Lam, E.W.F. (2000). Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway induces a senescence-like arrest mediated by p27(kip)1. *J. Biol. Chem.* 275, 21960–21968.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Nature, A.S., and 2005, U. (2010). Senescence in premalignant tumours. *Nature.Com* 1.

Cook, S.A., and Tinker, A. V. (2019). PARP Inhibitors and the Evolving Landscape of Ovarian Cancer Management: A Review. *BioDrugs*.

Coppe, J.P., Kauser, K., Campisi, J., and Beauséjour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.* 281, 29568–29574.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 99–118.

Correia, A., Silva, D., Correia, A., Vilanova, M., Gärtner, F., and Vale, N. (2018). Study of new therapeutic strategies to combat breast cancer using drug combinations. *Biomolecules* 8.

Costa, F.F., Paixão, V.A., Cavalher, F.P., Ribeiro, K.B., Cunha, I.W., Rinck, J.A., O'Hare, M., MacKay, A., Soares, F.A., Brentani, R.R., *et al.* (2006). SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 165, 135–143.

Cottin, Y., Touzery, C., Dalloz, F., Coudert, B., Toubreau, M., Riedinger, A., Louis, P., Wolf, J.E., and Brunotte, F. (1998). Comparison of epirubicin and doxorubicin cardiotoxicity induced by low doses: Evolution of the diastolic and systolic parameters studied by radionuclide angiography. *Clin. Cardiol.* 21, 665–670.

Cristofalo, V.J., and Pignolo, R.J. (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.* 73, 617–638.

Cusnir, M., and Cavalcante, L. (2012). Inter-tumor heterogeneity. *Hum. Vaccines Immunother.* 8, 1143–1145.

D, E, F

D'Adda Di Fagagna, F. (2008). Living on a break: Cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522.

Dai, W., Ma, W., Li, Q., Tao, Y., Ding, P., Zhu, R., and Jin, J. (2015). The 5'-UTR of DDB2 harbors an IRES element and upregulates translation during stress conditions. *Gene* 573, 57–63.

Dan, S., Tsunoda, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Zembutsu, H., Katagiri, T., Yamazaki, K., Nakamura, Y., and Yamori, T. (2002). An Integrated Database of Chemosensitivity to 55 Anticancer Drugs and Gene Expression Profiles of 39 Human Cancer Cell Lines 1.

Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364–378.

- Debacq-Chainiaux, F., Boilan, E., Le Moutier, J.D., Weemaels, G., and Toussaint, O. (2010). P38MAPK in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv. Exp. Med. Biol.* *694*, 126–137.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* *13*, 4429–4434.
- Desoize, B., and Madoulet, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *42*, 317–325.
- Ding, N., Bonham, E.M., Hannon, B.E., Amick, T.R., Baylin, S.B., and O'Hagan, H.M. (2016). Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage. *J. Mol. Cell Biol.* *8*, 244–254.
- Dixon, S.J., and Stockwell, B.R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 9–17.
- Dridi, W., Fetni, R., Lavoie, J., Poupon, M.F., and Drouin, R. (2003). The dominant-negative effect of p53 mutants and p21 induction in tetraploid G1 arrest depends on the type of p53 mutation and the nature of the stimulus. *Cancer Genet. Cytogenet.* *143*, 39–49.
- Druelle, C., Drullion, C., Deslé, J., Martin, N., Saas, L., Cormenier, J., Malaquin, N., Huot, L., Slomianny, C., Bouali, F., *et al.* (2016). ATF6a regulates morphological changes associated with senescence in human fibroblasts. *Oncotarget* *7*, 67699–67715.
- Duan, L., Fischer, A., Xu, Y., and Sun, L. (2009). Isolated seven-coordinate Ru(IV) dimer complex with [HOHOH]- bridging ligand as an intermediate for catalytic water oxidation. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 10397–10399.
- Dutta, S.W., Showalter, S.L., Showalter, T.N., Libby, B., and Trifiletti, D.M. (2017). Intraoperative radiation therapy for breast cancer patients: Current perspectives. *Breast Cancer Targets Ther.* *9*, 257–263.
- Elmore, L.W., Di, X., Dumur, C., Holt, S.E., and Gewirtz, D.A. (2005). Evasion of a single-step, chemotherapy-induced senescence in breast cancer cells: Implications for treatment response. *Clin. Cancer Res.* *11*, 2637–2643.
- Ennen, M., Klotz, R., Touche, N., Pinel, S., Barbieux, C., Besancenot, V., Brunner, E., Thiebaut, D., Jung, A.C., Ledrappier, S., *et al.* (2013). DDB2: a novel regulator of NF- κ B and breast tumor invasion. *Cancer Res.* *73*, 5040–5052.
- Fasching, P.A., Heusinger, K., Haeberle, L., Niklos, M., Hein, A., Bayer, C.M., Rauh, C., Schulz-Wendtland, R., Bani, M.R., Schrauder, M., *et al.* (2011). Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer* *11*, 486.
- Fayette, J., Molin, Y., Lavergne, E., Montbarbon, X., Racadot, S., Poupart, M., Ramade, A., Zrounba, P., Ceruse, P., and Pommier, P. (2015). Radiotherapy potentiation with weekly cisplatin compared to standard every 3 weeks cisplatin chemotherapy for locoregionally

- advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Drug Des. Devel. Ther.* *9*, 6203–6210.
- Fedele, M., Cerchia, L., and Chiappetta, G. (2017). The epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer: Focus on basal-like carcinomas. *Cancers (Basel)*. *9*.
- Feltes, B.C., and Bonatto, D. (2015). Overview of xeroderma pigmentosum proteins architecture, mutations and post-translational modifications. *Mutat. Res.* *763*, 306–320.
- Feng, L., Huang, S., An, G., Wang, G., Gu, S., and Zhao, X. (2019). Identification of new cancer stem cell markers and signaling pathways in HER-2-positive breast cancer by transcriptome sequencing. *Int. J. Oncol.* *55*, 1013–1018.
- Ferguson, A.T., Lapidus, R.G., Baylin, S.B., and Davidson, N.E. (1995). Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells Can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression. *Cancer Res.* *55*, 2279–2283.
- Fichtinger-Schepman, A.M.J., Van der Veer, J.L., Den Hartog, J.H.J., Lohman, P.H.M., and Reedijk, J. (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* *24*, 707–713.
- Finn, N.A., Findley, H.W., and Kemp, M.L. (2011). A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. *PLoS Comput. Biol.* *7*.
- Fomin, F.M., and Zaitseva, K.S. (2014). Mechanism of the oxidation of ferrocene and its derivatives with hydrogen peroxide: A new effect. *Russ. J. Phys. Chem. A* *88*, 466–470.
- Fonseca De Sousa, G., Rodrigues Wlodarczyk, S., and Monteiro, G. (2014). Carboplatin: molecular mechanisms of action associated with chemoresistance. *Brazilian J. Pharm. Sci.* *50*.
- Franchini, D.-M., Schmitz, K.-M., and Petersen-Mahrt, S.K. (2012). 5-Methylcytosine DNA Demethylation: More Than Losing a Methyl Group. *Annu. Rev. Genet.* *46*, 419–441.
- Friboulet, L., Olausson, K.A., Pignon, J.-P., Shepherd, F.A., Tsao, M.-S., Graziano, S., Kratzke, R., Douillard, J.-Y., Seymour, L., Pirker, R., *et al.* (2013). ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1101–1110.
- Fumagalli, M., Rossiello, F., Mondello, C., and D’Adda Di Fagagna, F. (2014). Stable cellular senescence is associated with persistent DDR activation. *PLoS One* *9*.
- Furuta, T., Ueda, T., Aune, G., Sarasin, A., Kraemer, K.H., and Pommier, Y. (2002). Transcription-coupled Nucleotide Excision Repair as a Determinant of Cisplatin Sensitivity of Human Cells. *Cancer Res.* *62*, 4899–4902.

G

- Gajria, D., and Chandarlapaty, S. (2011). HER2-amplified breast cancer: Mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* *11*, 263–

275.

Ganz, T., and Nemeth, E. (2011). The hepcidin-ferroportin system as a therapeutic target in anemias and iron overload disorders. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2011, 538–542.

Gao, J.J., and Swain, S.M. (2018). Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review. *Oncologist* 23, 556–565.

Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., *et al.* (2014). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal Complementary Data Sources and Analysis Options. *Sci Signal* 6, 1–20.

Gao, S., Alarcón, C., Sapkota, G., Rahman, S., Chen, P.Y., Goerner, N., Macias, M.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Massagué, J. (2009). Ubiquitin Ligase Nedd4L Targets Activated Smad2/3 to Limit TGF- β Signaling. *Mol. Cell* 36, 457–468.

García-Fernández, R.A., García-Palencia, P., Suarez, C., Sánchez, M.A., Gil-Gómez, G., Sánchez, B., Rollán, E., Martín-Caballero, J., and Flores, J.M. (2014). Cooperative role between p21cip1/waf1 and p27kip1 in premature senescence in glandular proliferative lesions in mice. *Histol. Histopathol.* 29, 397–406.

Gartel, A.L., Goufman, E., Najmabadi, F., and Tyner, A.L. (2000). Sp1 and sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line. *Oncogene* 19, 5182–5188.

Gattuso, H., Duchanois, T., Besancenot, V., Barbieux, C., Assfeld, X., Becuwe, P., Gros, P.C., Grandemange, S., and Monari, A. (2015). Interaction of Iron II Complexes with B-DNA. Insights from Molecular Modeling, Spectroscopy, and Cellular Biology. *Front. Chem.* 3, 67.

Germanas, J., and Pandya, A.G. (2002). Alkylating agents. *Dermatol. Ther.* 15, 317–324.

Ginestier, C., Wicinski, J., Cervera, N., Monville, F., Finetti, P., Bertucci, F., Wicha, M.S., Birnbaum, D., and Charafe-Jauffret, E. (2009). Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle* 8, 3297–3302.

Giordano, S.H. (2018). Breast cancer in men. *N. Engl. J. Med.* 378, 2311–2320.

Go, R.S., and Adjei, A.A. (1999). Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J. Clin. Oncol.* 17, 409–422.

Goel, A.K., Nandy, M., and Sharma, G. (2010). Cisplatin as neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer: Exciting early results. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* 31, 122–124.

Goossens, N., Nakagawa, S., Sun, X., and Hoshida, Y. (2015). Cancer biomarker discovery and validation. *Transl. Cancer Res.* 4, 256–269.

Gorgoulis, V., Adams, P.D., Alimonti, A., Bennett, D.C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., *et al.* (2019). Cellular Senescence: Defining a Path

Forward. *Cell* 179, 813–827.

Graziano, S., and Gonzalo, S. (2017). Mechanisms of oncogene-induced genomic instability. *Biophys. Chem.* 225, 49–57.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 415–445.

Grem, J.L. (2000). 5-Fluorouracil: Forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest. New Drugs* 18, 299–313.

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and De Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503–514.

Guerriero, E., Sorice, A., Capone, F., Stor Ti, G., Colonna, G., Ciliberto, G., and Costantini, S. (2017). Combining doxorubicin with a phenolic extract from flaxseed oil: Evaluation of the effect on two breast cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 50, 468–476.

Guillon, J., Petit, C., Toutain, B., Guette, C., Lelièvre, E., and Coqueret, O. (2019). Chemotherapy-induced senescence, an adaptive mechanism driving resistance and tumor heterogeneity. *Cell Cycle* 18, 2385–2397.

Guo, W., Pylayeva, Y., Pepe, A., Yoshioka, T., Muller, W.J., Inghirami, G., and Giancotti, F.G. (2006). $\beta 4$ Integrin Amplifies ErbB2 Signaling to Promote Mammary Tumorigenesis. *Cell* 126, 489–502.

Gupta, V., Kamath, N., Tkalcevic, G.T., and Singh, S. V. (1994). Potentiation of tamoxifen activity by verapamil in a human breast cancer cell line. *Biochem. Pharmacol.* 47, 1701–1704.

H

Habeshaw, J.A., Lister, T.A., Stansfeld, A.G., and Greaves, M.F. (1983). Correlation of transferrin receptor expression with histological class and outcome in non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 321, 498–501.

Hall, J.M., Zuppan, P.J., Anderson, L.A., Huey, B., Carter, C., and King, M.C. (1989). Oncogenes and human breast cancer. *Am. J. Hum. Genet.* 44, 577–584.

Han, C., Zhao, R., Liu, X., Srivastava, A., Gong, L., Mao, H., Qu, M., Zhao, W., Yu, J., and Wang, Q.-E. (2014). DDB2 Suppresses Tumorigenicity by Limiting the Cancer Stem Cell Population in Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Res.*

Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458–460.

Harrap, K.R. (1985). Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative. *Cancer Treat. Rev.* 12, 21–33.

- Hartinger, C.G., Jakupec, M. a, Zorbas-Seifried, S., Groessl, M., Egger, A., Berger, W., Zorbas, H., Dyson, P.J., and Keppler, B.K. (2008). KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem. Biodivers.* *5*, 2140–2155.
- Hasinoff, B.B. (1989). Self-reduction of the iron(III)-doxorubicin complex. *Free Radic. Biol. Med.* *7*, 583–593.
- Hayes, S., Shiyonov, P., Chen, X., and Raychaudhuri, P. (1998). DDB, a putative DNA repair protein, can function as a transcriptional partner of E2F1. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 240–249.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *25*, 585–621.
- Hayward, R.L., Schornagel, Q.C., Tente, R., Macpherson, J.S., Aird, R.E., Guichard, S., Habtemariam, A., Sadler, P., and Jodrell, D.I. (2005). Investigation of the role of Bax, p21/Waf1 and p53 as determinants of cellular responses in HCT116 colorectal cancer cells exposed to the novel cytotoxic ruthenium(II) organometallic agent, RM175. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *55*, 577–583.
- Heggie, G.D., Sommadossi, J.-P., Cross, D.S., Huster, W.J., and Diasio, R.B. (1987). Clinical Pharmacokinetics of 5-Fluorouracil and Its Metabolites in Plasma, Urine, and Bile.
- Helfenstein, S., Riesterer, O., Meier, U.R., Papachristofilou, A., Kasenda, B., Pless, M., and Rothschild, S.I. (2019). 3-weekly or weekly cisplatin concurrently with radiotherapy for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck – a multicentre, retrospective analysis. *Radiat. Oncol.* *14*, 32.
- Hennessy, B.T., Giordano, S., Broglio, K., Duan, Z., Trent, J., Buchholz, T.A., Babiera, G., Hortobagyi, G.N., and Valero, V. (2006). Biphasic metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast. *Ann. Oncol.* *17*, 605–613.
- Hennessy, B.T., Gonzalez-Angulo, A.M., Stemke-Hale, K., Gilcrease, M.Z., Krishnamurthy, S., Lee, J.S., Fridlyand, J., Sahin, A., Agarwal, R., Joy, C., *et al.* (2009). Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res.* *69*, 4116–4124.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell* *14*, 501–513.
- Herman, B., Gudrun, A., Potopalsky, A.I., Chroboczek, J., and Tcherniuk, S.O. (2013). Amitozyn Impairs Chromosome Segregation and Induces Apoptosis via Mitotic Checkpoint Activation. *PLoS One* *8*.
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., and Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr. Biol.* *27*, 2652-2660.e4.

- Herranz, N., and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* *128*, 1238–1246.
- Hevener, K.E., Verstak, T.A., Lutat, K.E., Riggsbee, D.L., and Mooney, J.W. (2018). Recent developments in topoisomerase-targeted cancer chemotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* *8*, 844–861.
- Hickson, L.T.J., Langhi Prata, L.G.P., Bobart, S.A., Evans, T.K., Giorgadze, N., Hashmi, S.K., Herrmann, S.M., Jensen, M.D., Jia, Q., Jordan, K.L., *et al.* (2019). Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine* *47*, 446–456.
- Hodges-Gallagher, L., Valentine, C.D., Bader, S. El, and Kushner, P.J. (2008). Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *109*, 241–250.
- Hoeflerlin, L.A., Oleinik, N. V., Krupenko, N.I., and Krupenko, S.A. (2011). Activation of p21-Dependent G1/G2 Arrest in the Absence of DNA Damage as an Antiapoptotic Response to Metabolic Stress. *Genes and Cancer* *2*, 889–899.
- Holzer, A.K., Manorek, G.H., and Howell, S.B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* *70*, 1390–1394.
- Hong, W.G., Kim, J.Y., Cho, J.H., Hwang, S.G., Song, J.Y., Lee, E.A., Chang, T.S., Um, H.D., and Park, J.K. (2017). AMRI-59 functions as a radiosensitizer via peroxiredoxin I-targeted ROS accumulation and apoptotic cell death induction. *Oncotarget* *8*, 114050–114064.
- Hong, Y., Yu, B., Sherman, M., Yuan, Y.C., Zhou, D., and Chen, S. (2007). Molecular basis for the aromatization reaction and exemestane-mediated irreversible inhibition of human aromatase. *Mol. Endocrinol.* *21*, 401–414.
- Horiguchi, J., Takei, H., Koibuchi, Y., Iijima, K., Ninomiya, J., Uchida, K., Ochiai, R., Yoshida, M., Yokoe, T., Iino, Y., *et al.* (2002). Prognostic significance of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in breast cancer. *Br. J. Cancer* *86*, 222–225.
- Hortobágyi, G.N. (1997). Anthrazykline in der Krebstherapie. *Drugs* *54*, 1–7.
- Hou, X.-M., Zhang, X.-H., Wei, K.-J., Ji, C., Dou, S.-X., Wang, W.-C., Li, M., and Wang, P.-Y. (2009). Cisplatin induces loop structures and condensation of single DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1400–1410.
- Huang, J.F., Wen, C.J., Zhao, G.Z., Dai, Y., Li, Y., Wu, L.X., and Zhou, H.H. (2018). Overexpression of ABCB4 contributes to acquired doxorubicin resistance in breast cancer cells in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *82*, 199–210.
- Huang, L., Liu, Q., Chen, S., and Shao, Z. (2017a). Cisplatin versus carboplatin in combination with paclitaxel as neoadjuvant regimen for triple negative breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* *10*, 5739–5744.
- Huang, S., Fantini, D., Merrill, B.J., Bagchi, S., Guzman, G., and Raychaudhuri, P. (2017b).

DDB2 is a novel regulator of Wnt signaling in colon cancer. *Cancer Res.* 77, 6562–6575.

Huang, Y., Nayak, S., Jankowitz, R., Davidson, N.E., and Oesterreich, S. (2011). Epigenetics in breast cancer: What's new? *Breast Cancer Res.* 13.

Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 424–428.

I, J, K

Inao, T., Iida, Y., Kotani, H., and Harada, M. (2019). Doxorubicin induces cellular senescence in human breast cancer cells and sensitizes them to cytotoxic T-lymphocytes. In *Cancer Research*, (American Association for Cancer Research (AACR)), pp. P4-06-28-P4-06–28.

Inoki, T., Yamagami, S., Inoki, Y., Tsuru, T., Hamamoto, T., Kagawa, Y., Mori, T., and Endo, H. (2004). Human DDB2 splicing variants are dominant negative inhibitors of UV-damaged DNA repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 1036–1043.

Inoue, T., Hibi, K., Nakayama, G., Komatsu, Y., Fukuoka, T., Kodera, Y., Ito, K., Akiyama, S., and Nakao, A. (2005). Expression level of thymidylate synthase is a good predictor of chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* 40, 143–147.

Inwald, E.C., Klinkhammer-Schalke, M., Hofstädter, F., Zeman, F., Koller, M., Gerstenhauer, M., and Ortmann, O. (2013). Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: Results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res. Treat.* 139, 539–552.

Ishida, S., Lee, J., Thiele, D.J., and Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 14298–14302.

Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: The senescence-associated β -galactosidase assay. *Methods Mol. Biol.* 371, 21–31.

Itoh, T., Cado, D., Kamide, R., and Linn, S. (2004). DDB2 gene disruption leads to skin tumors and resistance to apoptosis after exposure to ultraviolet light but not a chemical carcinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2052–2057.

Itokazu, M., Matsunaga, T., and Oshita, Y. (1995). Efficacy and safety of auranofin in patients with active early rheumatoid arthritis. *Clin. Ther.* 17, 60–73.

Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes to Cells* 8, 131–144.

Iyer, N.G., Özdag, H., and Caldas, C. (2004). p300/CBP and cancer. *Oncogene* 23, 4225–4231.

- Jackson, K., Yu, M.C., Arakawa, K., Fiala, E., Youn, B., Fiegl, H., Müller-Holzner, E., Widschwendter, M., and Ehrlich, M. (2004). DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* *3*, 1225–1231.
- Jaouen, G., Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., Quivy, J., Jin, L., and Croisy, A. (2000). The first organometallic antioestrogens and their antiproliferative effects. *Comptes Rendus l'Académie Des Sci. - Ser. IIC - Chem.* *3*, 89–93.
- Jia, P., Her, C., and Chai, W. (2015). DNA excision repair at telomeres. *DNA Repair (Amst)*. *36*, 137–145.
- Jiang, J., Mohan, N., Endo, Y., Shen, Y., and Wu, W.J. (2018). Type IIB DNA topoisomerase is downregulated by trastuzumab and doxorubicin to synergize cardiotoxicity. *Oncotarget* *9*, 6095–6108.
- Jiang, N., Wang, X., Yang, Y., and Dai, W. (2006). Advances in Mitotic Inhibitors for Cancer Treatment. *Mini-Reviews Med. Chem.* *6*, 885–895.
- Johnson, T.I., Costa, A.S.H., Ferguson, A.N., and Frezza, C. (2018). Fumarate hydratase loss promotes mitotic entry in the presence of DNA damage after ionising radiation. *Cell Death Dis.* *9*.
- Jönsson, G., Staaf, J., Olsson, E., Heidenblad, M., Vallon-Christersson, J., Osoegawa, K., De Jong, P., Oredsson, S., Ringnér, M., Höglund, M., *et al.* (2007). High-resolution genomic profiles of breast cancer cell lines assessed by tiling BAC array comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom. Cancer* *46*, 543–558.
- Jun, J. II, and Lau, L.F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* *12*, 676–685.
- Jung, S.H., Hwang, H.J., Kang, D., Park, H.A., Lee, H.C., Jeong, D., Lee, K., Park, H.J., Ko, Y.G., and Lee, J.S. (2019). mTOR kinase leads to PTEN-loss-induced cellular senescence by phosphorylating p53. *Oncogene* *38*, 1639–1650.
- Kagawa, S., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., Fukazawa, T., Sok-Joo, R., Roth, J.A., and Tanaka, N. (1999). Overexpression of the p21(sdi1) gene induces senescence-like state in human cancer cells: Implication for senescence-directed molecular therapy for cancer. *Cell Death Differ.* *6*, 765–772.
- Kakimoto, M., Uetake, H., Osanai, T., Shirota, Y., Takagi, Y., Takeshita, E., Toriya, Y., Danenberg, K., Danenberg, P. V., and Sugihara, K. (2005). Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase gene expression in breast cancer predicts 5-FU sensitivity by a histocultural drug sensitivity test. *Cancer Lett.* *223*, 103–111.
- Kalayda, G. V., Wagner, C.H., and Jaehde, U. (2012). Relevance of copper transporter 1 for cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *J. Inorg. Biochem.* *116*, 1–10.
- Kallio, A., Zheng, A., Dahllund, J., Heiskanen, K.M., and Härkönen, P. (2005). Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* *10*, 1395–1410.

Kapitza, S., Jakupec, M.A., Uhl, M., Keppler, B.K., and Marian, B. (2005). The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer Lett.* 226, 115–121.

Katanyoo, K., Tangjitgamol, S., Chongthanakorn, M., Tantivatana, T., Manusirivithaya, S., Rongsriyam, K., and Cholpaisal, A. (2011). Treatment outcomes of concurrent weekly carboplatin with radiation therapy in locally advanced cervical cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 123, 571–576.

Kater, B., Hunold, A., Schmalz, H.G., Kater, L., Bonitzki, B., Jesse, P., and Prokop, A. (2011). Iron containing anti-tumoral agents: Unexpected apoptosis-inducing activity of a ferrocene amino acid derivative. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 639–649.

Kattan, Z., Marchal, S., Brunner, E., Ramacci, C., Leroux, A., Merlin, J.L., Domenjoud, L., Dauça, M., and Becuwe, P. (2008). Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS One* 3, e2002.

Kedge, J.L., Nguyen, H. V., Khan, Z., Male, L., Hodges, N.J., Horswell, S.L., Mehellou, Y., Ismail, M.K., and Roberts, H. V. (2017). Organometallic Nucleoside Analogues: Effect of Hydroxyalkyl Linker Length on Cancer Cell Line Toxicity. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2017, 466–476.

Kim, Lee, Seo, Kim, Kim, Kim, Kang, Seong, Youn, and Youn (2019). Cellular Stress Responses in Radiotherapy. *Cells* 8, 1105.

Kim, S., Ding, W., Zhang, L., Tian, W., and Chen, S. (2014). Clinical response to sunitinib as a multitargeted tyrosine-kinase inhibitor (TKI) in solid cancers: A review of clinical trials. *Onco. Targets. Ther.* 7, 719–728.

Kim, Y.D., Jang, S.J., Lim, E.J., Ha, J.S., Shivakumar, S.B., Jeong, G.J., Rho, G.J., and Jeon, B.G. (2017). Induction of telomere shortening and cellular apoptosis by sodium meta-arsenite in human cancer cell lines. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. 21, 241–254.

Kiwerska, K., and Szyfter, K. (2019). DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J. Appl. Genet.* 60, 329–334.

Klotz, R. (2014). Rôle de la protéine Damaged-DNA Binding 2 dans la réponse des cellules tumorales mammaires aux agents thérapeutiques. Thèse de l'Université de Lorraine. Thèse.

Knox, R.J., Friedlos, F., Lydall, D.A., and Roberts, J.J. (1986). Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. *Cancer Res.* 46, 1972–1979.

Kondo, K., Noguchi, M., Mukai, K., Matsuno, Y., Sato, Y., Shimosato, Y., and Monden, Y. (1990). Transferrin receptor expression in adenocarcinoma of the lung as a histopathologic indicator of prognosis. *Chest* 97, 1367–1371.

Kondov, B., Milenkovic, Z., Kondov, G., Petrushevska, G., Basheska, N., Bogdanovska-

- Todorovska, M., Tolevska, N., and Ivkovski, L. (2018). Presentation of the molecular subtypes of breast cancer detected by immunohistochemistry in surgically treated patients. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* *6*, 961–967.
- Koo, B.H., Kim, Y., Je Cho, Y., and Kim, D.S. (2015). Distinct roles of transforming growth factor- β signaling and transforming growth factor- β receptor inhibitor SB431542 in the regulation of p21 expression. *Eur. J. Pharmacol.* *764*, 413–423.
- Köpf-Maier, P., Köpf, H., and Neuse, E.W. (1984). Ferricinium complexes: A new type of water-soluble antitumor agent. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *108*, 336–340.
- Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- And insult-dependent manner, and follow expression of p16ink4a. *Cell Cycle* *10*, 457–468.
- Kotsopoulos, J. (2018). BRCA Mutations and Breast Cancer Prevention. *Cancers (Basel)*. *10*, 524.
- Kratz, F., Keppler, B.K., Hartmann, M., Messori, L., and Berger, M.R. (1996). Comparison of the Antiproliferative Activity of Two Antitumour Ruthenium(III) Complexes With Their Apotransferrin and Transferrin-Bound Forms in a Human Colon Cancer Cell Line. *Met. Based. Drugs* *3*, 15–23.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12072–12077.
- Kubo, N., Noda, S.E., Takahashi, A., Yoshida, Y., Oike, T., Murata, K., Musha, A., Suzuki, Y., Ohno, T., Takahashi, T., *et al.* (2015). Radiosensitizing effect of carboplatin and paclitaxel to carbon-ion beam irradiation in the non-small-cell lung cancer cell line H460. *J. Radiat. Res.* *56*, 229–238.
- Kumar, V., and Chambon, P. (1988). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* *55*, 145–156.
- Kuo, Y.-M., Gybina, A.A., Pyatskowitz, J.W., Gitschier, J., and Prohaska, J.R. (2006). Copper Transport Protein (Ctr1) Levels in Mice Are Tissue Specific and Dependent on Copper Status. *J. Nutr.* *136*, 21–26.
- Kuperwasser, C., Chavarria, T., Wu, M., Magrane, G., Gray, J.W., Carey, L., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4966–4971.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated β -galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113*, 3613–3622.
- Kute, T., Stehle, J.R., Ornelles, D., Walker, N., Delbono, O., and Vaughn, J.P. (2012). Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC

against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology* 1, 810–821.

Kwon, S.J. (2005). Management of side effects of 5-FU based chemotherapy. *Korean J. Clin. Oncol.* 1, 51–58.

Kwon, S.M., Hong, S.M., Lee, Y.K., Min, S., and Yoon, G. (2019). Metabolic features and regulation in cell senescence. *BMB Rep.* 52, 5–12.

L

Laberge, R.M., Awad, P., Campisi, J., and Desprez, P.Y. (2012). Epithelial-mesenchymal transition induced by senescent fibroblasts. *Cancer Microenviron.* 5, 39–44.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell* 5, 187–195.

Lee, J., Park, S., and Roh, S. (2015). Transdifferentiation of mouse adipose-derived stromal cells into acinar cells of the submandibular gland using a co-culture system. *Exp. Cell Res.* 334, 160–172.

Lee, Y.H., Kang, B.S., and Bae, Y.S. (2014). Premature senescence in human breast cancer and colon cancer cells by tamoxifen-mediated reactive oxygen species generation. *Life Sci.* 97, 116–122.

Leontieva, O. V., and Blagosklonny, M. V. (2013). CDK4/6-inhibiting drug substitutes for p21 and p16 in senescence: Duration of cell cycle arrest and MTOR activity determine geroconversion. *Cell Cycle* 12, 3063–3069.

Leung, L.K., and Wang, T.T.Y. (1999). Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res. Treat.* 55, 73–83.

Lewis, M.G., Dafonseca, S., Chomont, N., Palamara, A.T., Tardugno, M., Mai, A., Collins, M., Wagner, W.L., Yalley-Ogunro, J., Greenhouse, J., *et al.* (2011). Gold drug auranofin restricts the viral reservoir in the monkey AIDS model and induces containment of viral load following ART suspension. *AIDS* 25, 1347–1356.

Li, Q.Q., Xu, J. Da, Wang, W.J., Cao, X.X., Chen, Q., Tang, F., Chen, Z.Q., Liu, X.P., and Xu, Z. De (2009). Twist1-mediated adriamycin-induced epithelial-mesenchymal transition relates to multidrug resistance and invasive potential in breast cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 2657–2665.

Li, S., Yuan, S., Zhao, Q., Wang, B., Wang, X., and Li, K. (2018). Quercetin enhances chemotherapeutic effect of doxorubicin against human breast cancer cells while reducing toxic side effects of it. *Biomed. Pharmacother.* 100, 441–447.

- Li, X., Kong, X., Kong, X., Wang, Y., Yan, S., and Yang, Q. (2013a). 53BP1 Sensitizes Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil. *PLoS One* 8.
- Li, Y., Ma, H.L., Han, L., Liu, W.Y., Zhao, B.X., Zhang, S.L., and Miao, J.Y. (2013b). Novel ferrocenyl derivatives exert anti-cancer effect in human lung cancer cells in vitro via inducing G 1 -phase arrest and senescence. *Acta Pharmacol. Sin.* 34, 960–968.
- Liang, K., Lu, Y., Jin, W., Ang, K.K., Milas, L., and Fan, Z. (2003). Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol. Cancer Ther.* 2, 1113–1120.
- Lie, J. (2018). Mise en évidence de l'activité biologique de nouveaux complexes de fer : potentiels agents anticancéreux. Thèse de l'Université de Lorraine.
- Lim, Y.C., Kang, H.J., Kim, Y.S., and Choi, E.C. (2012). All-trans-retinoic acid inhibits growth of head and neck cancer stem cells by suppression of Wnt/ β -catenin pathway. *Eur. J. Cancer* 48, 3310–3318.
- Liu, D., and Hornsby, P.J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 67, 3117–3126.
- Liu, C., Vyas, A., Kassab, M.A., Singh, A.K., and Yu, X. (2017). The role of poly ADP-ribosylation in the first wave of DNA damage response. *Nucleic Acids Res.* 45, 8129–8141.
- Liu, G., Parant, J.M., Lang, G., Chau, P., Chavez-Reyes, A., El-Naggar, A.K., Multani, A., Chang, S., and Lozano, G. (2004). Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat. Genet.* 36, 63–68.
- Liu, J., Lin, M., Zhang, C., Wang, D., Feng, Z., and Hu, W. (2012). TAp63 γ enhances nucleotide excision repair through transcriptional regulation of DNA repair genes. *DNA Repair (Amst)*. 11, 167–176.
- Lokich, J., and Anderson, N. (1998). Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature. *Ann. Oncol.* 9, 13–21.
- López-Lázaro, M. (2007). Excessive superoxide anion generation plays a key role in carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 120, 1378–1380.
- Lund, R.J., Huhtinen, K., Salmi, J., Rantala, J., Nguyen, E. V., Moulder, R., Goodlett, D.R., Lahesmaa, R., and Carpén, O. (2017). DNA methylation and Transcriptome Changes Associated with Cisplatin Resistance in Ovarian Cancer. *Sci. Rep.* 7.
- Luo, M., and Guan, J.L. (2010). Focal adhesion kinase: A prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett.* 289, 127–139.

M

- Malavolta, M., Pierpaoli, E., Giacconi, R., Costarelli, L., Piacenza, F., Basso, A., Cardelli, M., and Provinciali, M. (2016). Pleiotropic Effects of Tocotrienols and Quercetin on Cellular Senescence: Introducing the Perspective of Senolytic Effects of Phytochemicals. *Curr. Drug Targets* 17, 447–459.
- Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J. (2013). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32, 303–315.
- Marcu, L., Van Doorn, T., and Olver, I. (2003). Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer: A review of their cooperation. *Acta Oncol. (Madr).* 42, 315–325.
- Marinello, P.C., Panis, C., Silva, T.N.X., Binato, R., Abdelhay, E., Rodrigues, J.A., Mencialha, A.L., Lopes, N.M.D., Luiz, R.C., Cecchini, R., *et al.* (2019). Metformin prevention of doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 involves oxidative stress generation and modulation of cell adaptation genes. *Sci. Rep.* 9, 1–11.
- Matsuno, Y., Hyodo, M., Fujimori, H., Shimizu, A., and Yoshioka, K.I. (2018). Sensitization of cancer cells to radiation and topoisomerase I inhibitor camptothecin using inhibitors of PARP and other signaling molecules. *Cancers (Basel).* 10.
- McCann, K.E., and Hurvitz, S.A. (2018). Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer. *Drugs Context* 7.
- McGinn, C.J., Shewach, D.S., and Lawrence, T.S. (1996). Radiosensitizing nucleosides. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1193–1203.
- Melanson, B.D., Cabrita, M.A., Bose, R., Hamill, J.D., Pan, E., Brochu, C., Marcellus, K.A., Zhao, T.T., Holcik, M., and McKay, B.C. (2013). A novel cis-acting element from the 3'UTR of DNA damage-binding protein 2 mRNA links transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucleic Acids Res.* 41, 5692–5703.
- Miar, A., Hevia, D., Muñoz-Cimadevilla, H., Astudillo, A., Velasco, J., Sainz, R.M., and Mayo, J.C. (2015). Manganese superoxide dismutase (SOD2/MnSOD)/catalase and SOD2/GPx1 ratios as biomarkers for tumor progression and metastasis in prostate, colon, and lung cancer. *Free Radic. Biol. Med.* 85, 45–55.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garré, M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638–642.
- Micetich, K.C., Barnes, D., and Erickson, L.C. (1985). A comparative study of the cytotoxicity and DNA-damaging effects of cis-(diammino)(1,1-cyclobutanedicarboxylato)-platinum(II) and cis-diamminedichloroplatinum(II) on L1210 cells. *Cancer Res.* 45, 4043–4047.
- Michaud, K., Solomon, D.A., Oermann, E., Kim, J.S., Zhong, W.Z., Prados, M.D., Ozawa, T., James, C.D., and Waldman, T. (2010). Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4

and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res.* 70, 3228–3238.

Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Medecine/Sciences* 27, 405–412.

Miklán, Z., Szabó, R., Zsoldos-Mády, V., Reményi, J., Bánóczy, Z., and Hudecz, F. (2007). New ferrocene containing peptide conjugates: Synthesis and effect on human leukemia (HL-60) cells. *Biopolymers* 88, 108–114.

Milczarek, M., Wiktorska, K., Mielczarek, L., Koronkiewicz, M., Dąbrowska, A., Lubelska, K., Matosiuk, D., and Chilmonezyk, Z. (2018). Autophagic cell death and premature senescence: New mechanism of 5-fluorouracil and sulforaphane synergistic anticancer effect in MDA-MB-231 triple negative breast cancer cell line. *Food Chem. Toxicol.* 111, 1–8.

Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., Ishida, Y., Yoshida, H., and Komuro, I. (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: Role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* 105, 1541–1544.

Minegaki, T., Suzuki, A., Mori, M., Tsuji, S., Yamamoto, S., Watanabe, A., Tsuzuki, T., Tsunoda, T., Yamamoto, A., Tsujimoto, M., *et al.* (2018). Histone deacetylase inhibitors sensitize 5-fluorouracil-resistant MDA-MB-468 breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Oncol. Lett.* 16, 6202–6208.

Minig, V., Kattan, Z., van Beeumen, J., Brunner, E., and Becuwe, P. (2009). Identification of DDB2 protein as a transcriptional regulator of constitutive SOD2 gene expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 284, 14165–14176.

Miret, S., Simpson, R.J., and McKie, A.T. (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 283–301.

Mirzayans, R., Andrais, B., Hansen, G., and Murray, D. (2012). Role of p16 INK4A in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochem. Res. Int.* 2012.

Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Haneda, S., *et al.* (2010). 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers (Basel)*. 2, 1717–1730.

Mizuno, H., Kitada, K., Nakai, K., and Sarai, A. (2009). PrognoScan: A new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Med. Genomics* 2.

Momenimovahed, Z., and Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther. Volume 11*, 151–164.

Montgomery, J.S., Balch, C., Mand, M., Kim, Y.-S., Paik, H.H., Kim, S., Huang, T.H.-M., and Nephew, K.P. (2006). Alterations in DNA methylation patterns associated with onset of chemotherapy resistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 66.

Morantes, C.Y.A.-, Meléndez, E., Singh, S.P., and Ramírez-VickUSA, J.E. (2012).

Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines. *J. Cancer Sci. Ther.* *04*, 1–5.

Muggia, F.M., Bonetti, A., Hoeschele, J.D., Rozenzweig, M., and Howell, S.B. (2015). Platinum antitumor complexes: 50 Years since Barnett Rosenberg's discovery. *J. Clin. Oncol.* *33*, 4219–4226.

Murphy, J.D., Lucas, D.R., Somnay, Y.R., Hamstra, D.A., and Ray, M.E. (2008). Gemcitabine-mediated radiosensitization of human soft tissue sarcoma. *Transl. Oncol.* *1*, 50–56.

N, O

Nagano, T., Nakano, M., Nakashima, A., Onishi, K., Yamao, S., Enari, M., Kikkawa, U., and Kamada, S. (2016). Identification of cellular senescence-specific genes by comparative transcriptomics. *Sci. Rep.* *6*, 1–13.

Nagy, Á., Lánckzy, A., Menyhárt, O., and Gyorffy, B. (2018). Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci. Rep.* *8*.

Nakamura, A.J., Rao, V.A., Pommier, Y., and Bonner, W.M. (2010). The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle* *9*, 389–397.

Napolitano, G., and Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* *129*, 2475–2481.

Nguyen, H. V., Sallustrau, A., Balzarini, J., Bedford, M.R., Eden, J.C., Georgousi, N., Hodges, N.J., Kedge, J., Mehellou, Y., Tselepis, C., *et al.* (2014). Organometallic nucleoside analogues with ferrocenyl linker groups: Synthesis and cancer cell line studies. *J. Med. Chem.* *57*, 5817–5822.

Nichols, A.F., Itoh, T., Graham, J.A., Liu, W., Yamaizumi, M., and Linn, S. (2000). Human damage-specific DNA-binding protein p48. Characterization of XPE mutations and regulation following UV irradiation. *J. Biol. Chem.* *275*, 21422–21428.

Nichols, A.F., Itoh, T., Zolezzi, F., Hutsell, S., and Linn, S. (2003). Basal transcriptional regulation of human damage-specific DNA-binding protein genes DDB1 and DDB2 by Sp1, E2F, N-myrc and NF1 elements. *Nucleic Acids Res.* *31*, 562–569.

Niculescu, A.B., Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C., and Reed, S.I. (1998). Effects of p21 Cip1/Waf1 at Both the G 1 /S and the G 2 /M Cell Cycle Transitions: pRb Is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication . *Mol. Cell. Biol.* *18*, 629–643.

Nwabo Kamdje, A.H., Seke Etet, P.F., Vecchio, L., Muller, J.M., Krampera, M., and Lukong, K.E. (2014). Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell. Signal.* *26*, 2843–2856.

- O'Hagan, H.M., Mohammad, H.P., and Baylin, S.B. (2008). Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet.* *4*.
- Ochoa, G., and Villasana, M. (2013). Population-based optimization of cytostatic/cytotoxic combination cancer chemotherapy. *Soft Comput.* *17*, 913–924.
- Oktem, G., Ayla, S., Seckin, I., Tanriverdi, G., Cengiz, M., Eser, M., and Soner, B.C. (2011). Doxorubicin induced nephrotoxicity: Protective effect of nicotinamide. *Int. J. Cell Biol.*
- Oliveira, A.M., Ross, J.S., and Fletcher, J.A. (2005). Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am. J. Clin. Pathol.* *124 Suppl*, S16-28.
- Orr, F.W., and Wang, H.H. (2001). Tumor cell interactions with the microvasculature: A rate-limiting step in metastasis. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* *10*, 357–381.
- Osella, D., Ferrali, M., Zanello, P., Laschi, F., Fontani, M., Nervi, C., and Cavigliolo, G. (2000). On the mechanism of the antitumor activity of ferrocenium derivatives. *Inorganica Chim. Acta* *306*, 42–48.
- Ottaviano, Y.L., Issa, J.P., Pari, F.F., Smith, H.S., Baylin, S.B., and Davidson, N.E. (1994). Methylation of the Estrogen Receptor Gene CpG Island Marks Loss of Estrogen Receptor Expression in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* *54*, 2552–2555.
- Ou, Y.H., Chung, P.H., Sun, T.P., and Shieh, S.Y. (2005). p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Mol. Biol. Cell* *16*, 1684–1695.
- Oun, R., Moussa, Y.E., and Wheate, N.J. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalt. Trans.* *47*, 6645–6653.

P

- Pabla, N., Murphy, R.F., Liu, K., and Dong, Z. (2009). The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *296*, F505.
- Park, B.H., and Vogelstein, B. (2003). The INK4A Locus and the p16 INK4A and p19 ARF Genes.
- Park, J.S., Qiao, L., Gilfor, D., Yan Yang, M., Hylemon, P.B., Benz, C., Darlington, G., Firestone, G., Fisher, P.B., and Dent, P. (2000). A role for both ets and C/EBP transcription factors and mRNA stabilization in the MAPK-dependent increase in p21 Cip-1/WAF1/mda6 protein levels in primary hepatocytes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 2915–2932.
- Patel, A.G., and Kaufmann, S.H. (2012). How does doxorubicin work? *Elife* *2012*.

- Pelillo, C., Mollica, H., Eble, J.A., Grosche, J., Herzog, L., Codan, B., Sava, G., and Bergamo, A. (2016). Inhibition of adhesion, migration and of $\alpha 5\beta 1$ integrin in the HCT-116 colorectal cancer cells treated with the ruthenium drug NAMI-A. *J. Inorg. Biochem.* *160*, 225–235.
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubin-De-Celis, S., Schwartz, J.C., Wolff, N.C., Tran, T.A.T., Zou, L., Xie, X.J., Corey, D.R., and Brugarolas, J. (2011). Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *EMBO J.* *30*, 3242–3258.
- Pentheroudakis, G., Razis, E., Athanassiadis, A., Pavlidis, N., and Fountzilias, G. (2006). Paclitaxel-carboplatin combination chemotherapy in advanced breast cancer: Accumulating evidence for synergy, efficacy, and safety. *Med. Oncol.* *23*, 147–160.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S.S., Ress, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., *et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.
- Perucca, P., Cazzalini, O., Madine, M., Savio, M., Laskey, R.A., Vannini, V., Prosperi, E., and Stivala, L.A. (2009). Loss of p21CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence. *Cell Cycle* *8*, 105–114.
- Petricevic, B., Laengle, J., Singer, J., Sachet, M., Fazekas, J., Steger, G., Bartsch, R., Jensen-Jarolim, E., and Bergmann, M. (2013). Trastuzumab mediates antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and phagocytosis to the same extent in both adjuvant and metastatic HER2/neu breast cancer patients. *J. Transl. Med.* *11*.
- Pfister, S., Rea, S., Taipale, M., Mendrzyk, F., Straub, B., Ittrich, C., Thuerigen, O., Sinn, H.P., Akhtar, A., and Lichter, P. (2008). The histone acetyltransferase hMOF is frequently downregulated in primary breast carcinoma and medulloblastoma and constitutes a biomarker for clinical outcome in medulloblastoma. *Int. J. Cancer* *122*, 1207–1213.
- Phalke, S., Mzoughi, S., Bezzi, M., Jennifer, N., Mok, W.C., Low, D.H.P., Thike, A.A., Kuznetsov, V.A., Tan, P.H., Voorhoeve, P.M., *et al.* (2012). p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by PRMT6. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9534–9542.
- Phi, L.T.H., Sari, I.N., Yang, Y.G., Lee, S.H., Jun, N., Kim, K.S., Lee, Y.K., and Kwon, H.Y. (2018). Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.*
- Pichot, C.S., Hartig, S.M., Xia, L., Arvanitis, C., Monisvais, D., Lee, F.Y., Frost, J.A., and Corey, S.J. (2009). Dasatinib synergizes with doxorubicin to block growth, migration, and invasion of breast cancer cells. *Br. J. Cancer* *101*, 38–47.
- Piechota, M., Sunderland, P., Wysocka, A., Nalberczak, M., Sliwinska, M.A., Radwanska, K., and Sikora, E. (2016). Is senescence-associated β -galactosidase a marker of neuronal senescence? *Oncotarget* *7*, 81099–81109.
- Pil, P., and Lippard, S.J. (2002). Cisplatin and Related Drugs. In *Encyclopedia of Cancer*, (Elsevier), pp. 525–543.
- Plażuk, D., Zakrzewski, J., Salmain, M., Błaż, A., Rychlik, B., Strzelczyk, P., Bujacz, A., and

- Bujacz, G. (2013). Ferrocene–Biotin Conjugates Targeting Cancer Cells: Synthesis, Interaction with Avidin, Cytotoxic Properties and the Crystal Structure of the Complex of Avidin with a Biotin–Linker–Ferrocene Conjugate. *Organometallics* 32, 5774–5783.
- Pluim, D., Van Waardenburg, R.C.A.M., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H.M. (2004). Cytotoxicity of the organic ruthenium anticancer drug Nami-A is correlated with DNA binding in four different human tumor cell lines. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 54, 71–78.
- Popova, L. V., Babin, V.N., Belousov, Y.A., Nekrasov, Y.S., Snegireva, A.E., Borodina, N.P., Shaposhnikova, G.M., Bychenko, O.B., Raevskii, P.M., Morozova, N.B., *et al.* (1993). Antitumor effects of binuclear ferrocene derivatives. *Appl. Organomet. Chem.* 7, 85–94.
- Pospelova, T. V., Demidenko, Z.N., Bukreeva, E.I., Pospelov, V.A., Gudkov, A. V., and Blagosklonny, M. V. (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle* 8, 4112–4118.
- Pospelova, T. V., Leontieva, O. V., Bykova, T. V., Zubova, S.G., Pospelov, V.A., and Blagosklonny, M. V. (2012). Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle* 11, 2402–2407.
- Prabhu, J.S., Wahi, K., Korlimarla, A., Correa, M., Manjunath, S., Raman, N., Srinath, B.S., and Sridhar, T.S. (2012). The epigenetic silencing of the estrogen receptor (ER) by hypermethylation of the ESR1 promoter is seen predominantly in triple-negative breast cancers in Indian women. *Tumor Biol.* 33, 315–323.
- Press, M.F., Bernstein, L., Thomas, P.A., Meisner, L.F., Zhou, J.Y., Ma, Y., Hung, G., Robinson, R.A., Harris, C., El-Naggar, A., *et al.* (1997). HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: Poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 15, 2894–2904.
- Price, J.S., Waters, J.G., Darrah, C., Pennington, C., Edwards, D.R., Donell, S.T., and Clark, I.M. (2002). The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell* 1, 57–65.
- Prutki, M., Poljak-Blazi, M., Jakopovic, M., Tomas, D., Stipancic, I., and Zarkovic, N. (2006). Altered iron metabolism, transferrin receptor 1 and ferritin in patients with colon cancer. *Cancer Lett.* 238, 188–196.
- Pucci, C., Martinelli, C., and Ciofani, G. (2019). Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedalscience* 13.

Q, R

- Qiao, S., Guo, W., Liao, L., Wang, L., Wang, Z., Zhang, R., Xu, D., Zhang, Y., Pan, Y., Wang, Z., *et al.* (2015). DDB2 is involved in ubiquitination and degradation of PAQR3 and regulates tumorigenesis of gastric cancer cells. *Biochem. J.* 469, 469–480.
- Qin, S., Schulte, B.A., and Wang, G.Y. (2018). Role of senescence induction in cancer

treatment. *World J. Clin. Oncol.* *9*, 180–187.

Qu, Y., Han, B., Yu, Y., Yao, W., Bose, S., Karlan, B.Y., Giuliano, A.E., and Cui, X. (2015). Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. *PLoS One* *10*.

Rademaker-Lakhai, J.M., Bongard, D. Van Den, and Pluim, D. (2004). A Phase I and Pharmacological Study with Imidazolium- trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a Novel Ruthenium Anticancer Agent. *Clin. Cancer Res.* *10*, 3717–3727.

Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S., Baehner, F., Dabbs, D.J., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R., *et al.* (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer Res.* *12*, 207.

Ralhan, R., and Kaur, J. (2007). Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* *17*, 1061–1075.

Rapić-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D.C., Levine, A.S., and Stefanini, M. (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 1507–1522.

Räsänen, K., Virtanen, I., Salmenperä, P., Grenman, R., and Vaheri, A. (2009). Differences in the nemosis response of normal and cancer-associated fibroblasts from patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* *4*.

Ravid, A., Rucker, D., Machlenkin, A., Rotem, C., Hochman, A., Kessler-Ickson, G., Liberman, U.A., and Koren, R. (1999). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* *59*, 862–867.

Razmik Mirzayans, D.M. (2013). Role of Therapy-Induced Cellular Senescence in Tumor Cells and its Modification in Radiotherapy: The Good, The Bad and The Ugly. *J. Nucl. Med. Radiat. Ther.* *s6*, 1–7.

Reddy, M.V. (2000). Methods for testing compounds for DNA adduct formation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* *32*, 256–263.

Redig, A.J., and Mcallister, S.S. (2013). Breast cancer as a systemic disease: A view of metastasis. *J. Intern. Med.* *274*, 113–126.

Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., and Chinnaiyan, A.M. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* *6*, 1–6.

Rhodes, D.R., Kalyana-Sundaram, S., Mahavisno, V., Varambally, R., Yu, J., Briggs, B.B., Barrette, T.R., Anstet, M.J., Kincead-Beal, C., Kulkarni, P., *et al.* (2007). Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* *9*, 166–180.

Ricardo, S., Vieira, A.F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J.F., Milanezi,

- F., Schmitt, F., and Paredes, J. (2011). Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: Expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J. Clin. Pathol.* *64*, 937–944.
- Riley, C.M. (1988). Bioanalysis of cisplatin analogues - a selective review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* *6*, 669–676.
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* *10*, 853–858.
- Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.Y.J., and Wu, D.Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* *65*, 2795–2803.
- Robson, M.E., Tung, N., Conte, P., Im, S.A., Senkus, E., Xu, B., Masuda, N., Delaloge, S., Li, W., Armstrong, A., *et al.* (2019). OlympiAD final overall survival and tolerability results: Olaparib versus chemotherapy treatment of physician's choice in patients with a germline BRCA mutation and HER2-negative metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* *30*, 558–566.
- Rosen, L.S., Jacobs, I.A., and Burkes, R.L. (2017). Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target. Oncol.* *12*, 599–610.
- Roy, N., Bommi, P. V, Bhat, U.G., Bhattacharjee, S., Elangovan, I., Li, J., Patra, K.C., Kopanja, D., Blunier, Adam, R., Bagchi, S., *et al.* (2013). DDB2 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colon cancer. *Cancer Res.* *73*, 3771–3782.
- Ruiz-Saenz, A., Dreyer, C., Campbell, M.R., Steri, V., Gulizia, N., and Moasser, M.M. (2018). HER2 amplification in tumors activates PI3K/Akt signaling independent of HER3. *Cancer Res.* *78*, 3645–3658.
- Rutman, R.J., Cantarow, A., and Paschkis, K.E. (1954). Studies in 2-Acetylaminofluorene Carcinogenesis: III. The Utilization of Uracil-2-C14 by Preneoplastic Rat Liver and Rat Hepatoma. *Cancer Res.* *14*, 119–123.

S

- Sabisz, M., and Skladanowski, A. (2009). Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: Implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle* *8*, 3208–3217.
- Saleh, T., Tyutyunyk-Massey, L., and Gewirtz, D.A. (2019). Tumor cell escape from therapy-induced senescence as a model of disease recurrence after dormancy. *Cancer Res.* *79*, 1044–1046.
- Salotti, J., and Johnson, P.F. (2019). Regulation of senescence and the SASP by the transcription factor C/EBP β . *Exp. Gerontol.* *128*, 110752.

Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., and Chodosh, L.A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* *9*, 493–505.

Sasaki, M., Kajiya, H., Ozeki, S., Okabe, K., and Ikebe, T. (2014). Reactive oxygen species promotes cellular senescence in normal human epidermal keratinocytes through epigenetic regulation of p16INK4a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *452*, 622–628.

Sava, G., and Bergamo, A. (2000). Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *Int. J. Oncol.* *17*, 353–365.

Sava, G., Pacor, S., Bergamo, A., Cocchietto, M., Mestroni, G., and Alessio, E. (1995). Effects of ruthenium complexes on experimental tumors: irrelevance of cytotoxicity for metastasis inhibition. *Chem. Biol. Interact.* *95*, 109–126.

Sava, G., Alessio, E., Bergamo, A., and Mestroni, G. (1999). Sulfoxide Ruthenium Complexes: Non-Toxic Tools for the Selective Treatment of Solid Tumour Metastases. In *Metallopharmaceuticals I*, (Springer Berlin Heidelberg), pp. 143–169.

Scheeff, E.D., Briggs, J.M., and Howell, S.B. (1999). Molecular modeling of the intrastrand guanine-guanine DNA adducts produced by cisplatin and oxaliplatin. *Mol. Pharmacol.* *56*, 633–643.

Schluga, P., Hartinger, C.G., Egger, A., Reisner, E., Galanski, M., Jakupec, M.A., and Keppler, B.K. (2006). Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalt. Trans.* *6*, 1796–1802.

Schmeisser, K., and Parker, J.A. (2019). Pleiotropic effects of mTOR and autophagy during development and aging. *Front. Cell Dev. Biol.* *7*, 192.

Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* *109*, 335–346.

Schwarze, S.R., Fu, V.X., Desotelle, J.A., Kenowski, M.L., and Jarrard, D.F. (2005). The identification of senescence-specific genes during the induction of senescence in prostate cancer cells. *Neoplasia* *7*, 816–823.

Scolaro, C., Bergamo, A., Brescacin, L., Delfino, R., Cocchietto, M., Laurency, G., Geldbach, T.J., Sava, G., and Dyson, P.J. (2005). In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.* *48*, 4161–4171.

Scott, J.M., and Molloy, A.M. (2012). The discovery of vitamin B12. *Ann. Nutr. Metab.* *61*, 239–245.

Scrima, A., Koníčková, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thomä, N.H. (2008). Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1-DDB2 Complex. *Cell* *135*, 1213–1223.

Seelig, M.H., Berger, M.R., and Keppler, B.K. (1992). Antineoplastic activity of three

ruthenium derivatives against chemically induced colorectal carcinoma in rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *118*, 195–200.

Seignez, C., Martin, A., Rollet, C.E., Racœur, C., Scagliarini, A., Jeannin, J.F., Bettaieb, A., and Paul, C. (2014). Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget* *5*, 11442–11451.

Serrano, M. (2010). Shifting senescence into quiescence by turning up p53. *Cell Cycle* *9*, 4256–4257.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* *88*, 593–602.

Seymour, G.J., Walsh, M.D., Lavin, M.F., Strutton, G., and Gardiner, R.A. (1987). Transerrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas. *Urol. Res.* *15*, 341–344.

Shang, S., Hua, F., and Hu, Z.W. (2017). The regulation of β -catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. *Oncotarget* *8*, 33972–33989.

Sharma, D., Saxena, N.K., Davidson, N.E., and Vertino, P.M. (2006). Restoration of tamoxifen sensitivity in estrogen receptor-negative breast cancer cells: Tamoxifen-bound reactivated ER recruits distinctive corepressor complexes. *Cancer Res.* *66*, 6370–6378.

Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: An unsettled case. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 663–673.

Shi, Y., Fan, X., Deng, H., Brezski, R.J., Rycyzyn, M., Jordan, R.E., Strohl, W.R., Zou, Q., Zhang, N., and An, Z. (2015). Trastuzumab Triggers Phagocytic Killing of High HER2 Cancer Cells In Vitro and In Vivo by Interaction with Fc γ Receptors on Macrophages. *J. Immunol.* *194*, 4379–4386.

Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R.W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S.P., Chiao, E., *et al.* (2009). Downregulation of miRNA-200c Links Breast Cancer Stem Cells with Normal Stem Cells. *Cell* *138*, 592–603.

Shlush, L.I., Itzkovitz, S., Cohen, A., Rutenberg, A., Berkovitz, R., Yehezkel, S., Shahar, H., Selig, S., and Skorecki, K. (2011). Quantitative digital in situ senescence-associated β -galactosidase assay. *BMC Cell Biol.* *12*, 16.

Shtutman, M., Chang, B.D., Schools, G.P., and Broude, E. V. (2017). Cellular model of p21-induced senescence. *Methods Mol. Biol.* *1534*, 31–39.

Simenel, A.A., Morozova, E.A., Snegur, L. V., Zykova, S.I., Kachala, V. V., Ostrovskaya, L.A., Bluchterova, N. V., and Fomina, M.M. (2009). Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo. *Appl. Organomet. Chem.* *23*, 219–224.

Sinani, D., Adle, D.J., Kim, H., and Lee, J. (2007). Distinct mechanisms for Ctr1-mediated copper and cisplatin transport. *J. Biol. Chem.* *282*, 26775–26785.

Smith, L., Watson, M.B., O’kane, S.L., Drew, P.J., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2006). The

analysis of doxorubicin resistance in human breast cancer cells using antibody microarrays. *Mol Cancer Ther* 5, 2115–2135.

Snegur, L. V., Simenel, A.A., Nekrasov, Y.S., Morozova, E.A., Starikova, Z.A., Peregudova, S.M., Kuzmenko, Y. V., Babin, V.N., Ostrovskaya, L.A., Bluchterova, N. V., *et al.* (2004). Synthesis, structure and redox potentials of biologically active ferrocenylalkyl azoles. *J. Organomet. Chem.* 689, 2473–2479.

Snegur, L. V., Nekrasov, Y.S., Sergeeva, N.S., Zhilina, Z. V., Gumenyuk, V. V, Starikova, Z.A., Simenel, A.A., Morozova, N.B., Sviridova, I.K., and Babin, V.N. (2008). Ferrocenylalkyl azoles: bioactivity, synthesis, structure. *Appl. Organomet. Chem.* 22, 139–147.

Sobin, and Gospodarowicz (1987). *TNM Classification of Malignant Tumours.*

Sone, H., and Kagawa, Y. (2005). Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia* 48, 58–67.

Song, I.-S., Savaraj, N., Siddik, Z.H., Liu, P., Wei, Y., Wu, C.J., and Kuo, M.T. (2004). Role of human copper transporter Ctrl in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells. *Mol. Cancer Ther.* 3, 1543–1549.

Srdic-Rajic, T., Santibañez, J.F., Kanjer, K., Tisma-Miletic, N., Cavic, M., Galun, D., Jevric, M., Kardum, N., Konic-Ristic, A., and Zoranovic, T. (2017). Iscador Qu inhibits doxorubicin-induced senescence of MCF7 cells. *Sci. Rep.* 7, 1–12.

Staedler, D., Idrizi, E., Kenzaoui, B.H., and Juillerat-Jeanneret, L. (2011). Drug combinations with quercetin: Doxorubicin plus quercetin in human breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 68, 1161–1172.

Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p21 and p16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.

Stopper, H., Schmitt, E., Gregor, C., Mueller, S.O., and Fischer, W.H. (2003). Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells. *Mutagenesis* 18, 243–247.

Stoyanova, T., Roy, N., Kopanja, D., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (2009). DDB2 (damaged-DNA binding protein 2) in nucleotide excision repair and DNA damage response. *Cell Cycle* 8, 4067–4071.

Strieter, R.M., Burdick, M.D., Mestas, J., Gomperts, B., Keane, M.P., and Belperio, J.A. (2006). Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 42, 768–778.

T, U

Tacar, O., Sriamornsak, P., and Dass, C.R. (2013). Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 157–170.

- Tajima, S., and Koda, K. (2015). Dedifferentiation-like progression of breast carcinoma: report of a case showing transition from luminal-type carcinoma to triple-negative carcinoma with myoepithelial features. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 2117–2122.
- Takimoto, R., MacLachlan, T.K., Dicker, D.T., Niitsu, Y., Mori, T., and El-Deiry, W.S. (2002). BRCA1 transcriptionally regulates damaged DNA binding protein (DDB2) in the DNA repair response following UV-irradiation. *Cancer Biol. Ther.* *1*, 177–186.
- Tamura, H., and Miwa, M. (1997). DNA Cleaving Activity and Cytotoxic Activity of Ferricenium Cations. *Chem. Lett.* *26*, 1177–1178.
- Tan, T., and Chu, G. (2002). p53 Binds and Activates the Xeroderma Pigmentosum DDB2 Gene in Humans but Not Mice. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3247–3254.
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., and Zhang, Z. (2017). GEPIA: A web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* *45*, W98–W102.
- Taylor, A., and Powell, M.E.B. (2004). Intensity-modulated radiotherapy - What is it? *Cancer Imaging* *4*, 68–73.
- Thorn, C.F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E., and Altman, R.B. (2011). Doxorubicin pathways: Pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* *21*, 440–446.
- Tinker, A. V., Bhagat, K., Swenerton, K.D., and Hoskins, P.J. (2005). Carboplatin and paclitaxel for advanced and recurrent cervical carcinoma: The British Columbia Cancer Agency experience. *Gynecol. Oncol.* *98*, 54–58.
- Tiwari, M. (2012). Antimetabolites: Established cancer therapy. *J. Cancer Res. Ther.* *8*, 510–519.
- Todorova, V.K., Kaufmann, Y., Luo, S., and Klimberg, V.S. (2011). Tamoxifen and raloxifene suppress the proliferation of estrogen receptor-negative cells through inhibition of glutamine uptake. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *67*, 285–291.
- Tonik, S.E., Shindelman, J.E., and Sussman, H.H. (1986). Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *7*, 71–76.
- Top, S., Tang, J., Vessières, A., Carrez, D., Provot, C., and Jaouen, G. (1996). Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics. *Chem. Commun.* 955–956.
- Top, S., Vessières, A., Leclercq, G., Quivy, J., Tang, J., Vaissermann, J., Huché, M., and Jaouen, G. (2003). Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Dependent and Hormone-Independent Breast Cancer Cell Lines. *Chem. - A Eur. J.* *9*, 5223–5236.

- Toso, A., Revandkar, A., DiMitri, D., Guccini, I., Proietti, M., Sarti, M., Pinton, S., Zhang, J., Kalathur, M., Civenni, G., *et al.* (2014). Enhancing chemotherapy efficacy in pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep.* *9*, 75–89.
- Tran, T.Q., Lowman, X.H., Reid, M.A., Mendez-Dorantes, C., Pan, M., Yang, Y., and Kong, M. (2017). Tumor-associated mutant p53 promotes cancer cell survival upon glutamine deprivation through p21 induction. *Oncogene* *36*, 1991–2001.
- Treeck, O., Lattrich, C., Springwald, A., and Ortmann, O. (2010). Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res. Treat.* *120*, 557–565.
- Trishkina, E.A., Gershanovich, M.L., Pavlov, K.A., Danova, L.A., and Labkovskiĭ, B.M. (1983). [Comparative evaluation of the results of mono- and polychemotherapy of disseminated forms of breast cancer using the CMFVP program and anthracycline antibiotics (carminomycin and adriamycin)]. *Antibiotiki* *28*, 853–858.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., *et al.* (2010). Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat. Biotechnol.* *28*, 1248–1250.
- Ummat, A., Rechkoblit, O., Jain, R., Roy Choudhury, J., Johnson, R.E., Silverstein, T.D., Buku, A., Lone, S., Prakash, L., Prakash, S., *et al.* (2012). Structural basis for cisplatin DNA damage tolerance by human polymerase η during cancer chemotherapy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 628–632.

V, W

- Vacca, A., Bruno, M., Boccarelli, A., Coluccia, M., Ribatti, D., Bergamo, A., Garbisa, S., Sartor, L., and Sava, G. (2002). Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A. *4*, 993–998.
- Valcourt, J.R., Lemons, J.M.S., Haley, E.M., Kojima, M., Demuren, O.O., and Collier, H.A. (2012). Staying alive: Metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle* *11*, 1680–1696.
- Vannini, E., Panighini, A., Cerri, C., Fabbri, A., Lisi, S., Pracucci, E., Benedetto, N., Vannozzi, R., Fiorentini, C., Caleo, M., *et al.* (2014). The bacterial protein toxin, cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) provides long-term survival in a murine glioma model. *BMC Cancer* *14*.
- Varchetta, S., Gibelli, N., Oliviero, B., Nardini, E., Gennari, R., Gatti, G., Silva, L.S., Villani, L., Tagliabue, E., Ménard, S., *et al.* (2007). Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res.* *67*, 11991–11999.
- Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier,

G.G., and Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* *16*, 6018–6033.

Venitt, S. (1996). Mechanisms of Spontaneous Human Cancers.

Vessières, A., Corbet, C., Heldt, J.M., Lories, N., Jouy, N., Laïos, I., Leclercq, G., Jaouen, G., and Toillon, R.A. (2010). A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines. *J. Inorg. Biochem.* *104*, 503–511.

Vinod, B.S., Antony, J., Nair, H.H., Puliyappadamba, V.T., Saikia, M., Shyam Narayanan, S., Bevin, A., and John Anto, R. (2013). Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil. *Cell Death Dis.* *4*, e505–e505.

Wagner, J., Damaschke, N., Yang, B., Truong, M., Guenther, C., McCormick, J., Huang, W., and Jarrard, D. (2015). Overexpression of the novel senescence marker β -galactosidase (GLB1) in prostate cancer predicts reduced PSA recurrence. *PLoS One* *10*.

Wagner, M., Hampel, B., Hütter, E., Pfister, G., Krek, W., Zwerschke, W., and Jansen-Dürr, P. (2001). Metabolic stabilization of p27 in senescent fibroblasts correlates with reduced expression of the F-box protein Skp2. *Exp. Gerontol.* *37*, 41–55.

Wan, D., Tang, B., Wang, Y.J., Guo, B.H., Yin, H., Yi, Q.Y., and Liu, Y.J. (2017). Synthesis and anticancer properties of ruthenium (II) complexes as potent apoptosis inducers through mitochondrial disruption. *Eur. J. Med. Chem.* *139*, 180–190.

Wang, Q., Wu, P.C., Dong, D.Z., Ivanova, I., Chu, E., Zeliadt, S., Vesselle, H., and Wu, D.Y. (2013). Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Int. J. Cancer* *132*, 1505–1515.

Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., and Sun, P. (2002). Sequential Activation of the MEK-Extracellular Signal-Regulated Kinase and MKK3/6-p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediates Oncogenic ras-Induced Premature Senescence. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3389–3403.

Wang, X., Wong, S.C.H., Pan, J., Tsao, S.W., Fung, K.H.Y., Kwong, D.L.W., Sham, J.S.T., and Nicholls, J.M. (1998). Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res.* *58*, 5019–5022.

Wang, Y., Sun, B., Han, B., and Hu, M. (2018). New ferrocene modified retinoic acid with enhanced efficacy against melanoma cells: Via GSH depletion. *RSC Adv.* *8*, 27740–27745.

Wang, Z., Liang, S., Lian, X., Liu, L., Zhao, S., Xuan, Q., Guo, L., Liu, H., Yang, Y., Dong, T., *et al.* (2015). Identification of proteins responsible for adriamycin resistance in breast cancer cells using proteomics analysis. *Sci. Rep.* *5*, 1–11.

Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational Modifications of p53 in Replicative Senescence Overlapping but

Distinct from Those Induced by DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 2803–2808.

Welsh, C., Day, R., McGurk, C., Masters, J.R.W., Wood, R.D., and Köberle, B. (2004). Reduced levels of XPA, ERCC1 and XPF DNA repair proteins in testis tumor cell lines. *Int. J. Cancer* *110*, 352–361.

Wen, C., Wu, L., Fu, L., Wang, B., and Zhou, H. (2017). Unifying mechanism in the initiation of breast cancer by metabolism of estrogen (Review). *Mol. Med. Rep.* *16*, 1001–1006.

Wen, S. hsuan, Su, S. chiang, Liou, B. huang, Lin, C. hao, and Lee, K. rong (2018). Sulbactam-enhanced cytotoxicity of doxorubicin in breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* *18*.

Wlassoff, W.A., Albright, C.D., Sivashinski, M.S., Ivanova, A., Appelbaum, J.G., and Salganik, R.I. (2007). Hydrogen peroxide overproduced in breast cancer cells can serve as an anticancer prodrug generating apoptosis-stimulating hydroxyl radicals under the effect of tamoxifen-ferrocene conjugate. *J. Pharm. Pharmacol.* *59*, 1549–1553.

Wohlhueter, R.M., McIvor, R.S., and Plagemann, P.G.W. (1980). Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.* *104*, 309–319.

Wyatt, M.D., and Wilson, D.M. (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 788–799.

X, Y, Z

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656–660.

Yaacob, N.S., and Ismail, N.F. (2014). Comparison of cytotoxicity and genotoxicity of 4-hydroxytamoxifen in combination with Tualang honey in MCF-7 and MCF-10A cells. *BMC Complement. Altern. Med.* *14*, 106.

Yamakoshi, K., Takahashi, A., Hirota, F., Nakayama, R., Ishimaru, N., Kubo, Y., Mann, D.J., Ohmura, M., Hirao, A., Saya, H., *et al.* (2009). Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J. Cell Biol.* *186*, 393–407.

Yang, H., Liu, J., Jing, J., Wang, Z., Li, Y., Gou, K., Feng, X., Yuan, Y., and Xing, C. (2018). Expression of DDB2 Protein in the Initiation, Progression, and Prognosis of Colorectal Cancer. *Dig. Dis. Sci.* *63*, 2959–2968.

Yang, T., Chen, M., Chen, T., and Thakur, A. (2015). Expression of the copper transporters hCtr1, ATP7A and ATP7B is associated with the response to chemotherapy and survival time in patients with resected non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* *10*, 2584–2590.

Yeary, R.A. (1969). Chronic toxicity of dicyclopentadienyliron (ferrocene) in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *15*, 666–676.

- Yilmaz, U., Polat, G., Anar, C., and Halilcolar, H. (2011). Carboplatin plus etoposide for extensive stage small-cell lung cancer: An experience with AUC 6 doses of carboplatin. *Indian J. Cancer* 48, 454–459.
- Yu, D., Tong, Y., Guo, X., Feng, L., Jiang, Z., Ying, S., Jia, J., Fang, Y., Yu, M., Xia, H., *et al.* (2019). Diagnostic value of concentration of circulating cell-free DNA in breast cancer: A meta-analysis. *Front. Oncol.* 9.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., *et al.* (2007). let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* 131, 1109–1123.
- Yu, Y., Schleich, K., Yue, B., Ji, S., Lohneis, P., Kemper, K., Silvis, M.R., Qutob, N., van Rooijen, E., Werner-Klein, M., *et al.* (2018). Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *Cancer Cell* 33, 322–336.e8.
- Yu, Z., Sun, J., Zhen, J., Zhang, Q., and Yang, Q. (2005). Thymidylate synthase predicts for clinical outcome in invasive breast cancer. *Histol. Histopathol.* 20, 871–878.
- Zeng, Y.X., Somasundaram, K., and El-Deiry, W.S. (1997). AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21(WAF1/CIP1) expression. *Nat. Genet.* 15, 78–82.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci †. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2343–2358.
- Zhao, R., Han, C., Eisenhauer, E., Kroger, J., Zhao, W., Yu, J., Selvendiran, K., Liu, X., Wani, A.A., and Wang, Q.-E. (2014). DNA damage-binding complex recruits HDAC1 to repress Bcl-2 transcription in human ovarian cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 12, 370–380.
- Zhao, R., Cui, T., Han, C., Zhang, X., He, J., Srivastava, A.K., Yu, J., Wani, A.A., and Wang, Q.-E. (2015). DDB2 modulates TGF- β signal transduction in human ovarian cancer cells by downregulating NEDD4L. *Nucleic Acids Res.* 43, 7838–7849.
- Zhao, R., Choi, B.Y., Lee, M.H., Bode, A.M., and Dong, Z. (2016). Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. *EBioMedicine* 8, 30–39.
- Zhou, B., Li, J., Feng, B.-J., Ouyang, Y., Liu, Y.-N., and Zhou, F. (2012). Syntheses and in vitro antitumor activities of ferrocene-conjugated Arg-Gly-Asp peptides. *J. Inorg. Biochem.* 116, 19–25.
- Zhu, Y., Doornebal, E.J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L.J., Robbins, P.D., Tchkonja, T., and Kirkland, J.L. (2017). New agents that target senescent cells: The flavone, fisetin, and the BCL-XL inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany, NY)*. 9, 1–9.

CURRICULUM VITAE

Florian CORNU

Doctorant en Sciences de la Vie et du Vivant

PARCOURS UNIVERSITAIRE

- 2017-2020** **Préparation d'un Doctorat en Sciences de la Vie et du Vivant – Université de Lorraine** (France), travaux dirigés par le Dr. Stéphanie Grandemange et le Dr. Antonio Monari
- 2020** **Diplôme universitaire Formation des Investigateurs en Essais Cliniques – Université de Strasbourg** (France)
- 2015-2017** **Master BioSciences et Ingénierie de la Santé – Université de Lorraine** (France)
- Spécialité Biotechnologies Moléculaires et BioIngénierie – Physiopathologies et Thérapeutiques
 - Parcours Aspects Moléculaires Intégrés de la Physiopathologie
- 2012-2015** **Licence Sciences de la Vie et du Vivant – Université de Lorraine** (France)
- Parcours Biologie Cellulaire

ACTIVITE DE RECHERCHE

- 2017-2020** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine** (France) – **Doctorant**
- « *Validation in silico de la valeur prédictive du gène codant la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) et caractérisation in vitro des effets de complexes organométalliques dans des modèles du cancer du sein* »
- Membres du jury :*
- | | | |
|--------------------|--------------------------------|--------------|
| Mme M. DONTENWILL | Directeur de recherche UMR7021 | Rapporteur |
| Mr E. HERVOUET | Chercheur UMR1098 | Rapporteur |
| Mr P. REBOUL | Professeur UMR7365 | Examinateur |
| Mme S. GRANDEMANGE | Chercheur UMR7039 | Directeur |
| Mr A. MONARI | Chercheur UMR7019 | Co-directeur |
- 2017** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine** (France) – **Master 2^{ème} année**
- « *Étude de la régulation transcriptionnelle du gène codant la protéine DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) dans des cellules tumorales mammaires* », travaux dirigés par le Dr. Stéphanie Grandemange
- 2016** **Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), CNRS UMR7039 – Université de Lorraine** (France) – **Master 1^{ère} année**

- « Étude de l'influence de la protéine DDB2 (*Damaged-DNA Binding 2* dans la transition épithélio-mésenchymateuse de cellules tumorales mammaires », travaux dirigés par le Dr. Stéphanie Grandemange

Communications

- F. Cornu, V. Besancenot, E. Brunner, A. Monari, S. Grandemange : « *Study of the cellular effects of iron-based organometallic compounds on breast cell lines* », Journée de rentrée de l'École Doctorale BioSE, 2018 (communication orale)
- F. Cornu, V. Besancenot, E. Brunner, P. Becuwe, S. Grandemange : « *Etude de la régulation transcriptionnelle du gène codant DDB2 (Damaged-DNA Binding 2 dans des cellules tumorales mammaires* », 4^{ème} Journée d'Echange en Cancérologie de Lorraine, 2017 (communication orale)

Publication

- F. Cornu, J. Lie, V. Besancenot, E. Brunner, A. Monari, S. Grandemange : « *Study of DDB2 (Damaged-DNA Binding 2) gene regulation : a new biomarker for and chemosensitivity of breast cancer cells* », 2020 (à venir)

ACTIVITES PEDAGOGIQUES

2017-2020 **Doctorant contractuel Chargé d'Enseignements – Université de Lorraine** (France), 192 heures d'enseignements (64 heures par an)

- Licence 1^{ère} année : TP Histologie (28h) + TP Méthodologie du travail universitaire (21h)
- Licence 2^{ème} année : TP Biologie du sang (12h)
- Licence 3^{ème} année : TP Gel d'activité (48h) + TP Immunocytofluorescence (16h) + TD Expérimentation en Biologie Cellulaire (18h) + TP Culture Cellulaire (30h)
- Master 1^{ère} année : TP Expérimentation en Biologie Cellulaire (46h)

Formation d'initiation à la pédagogie (1 semaine)

Participation à l'encadrement d'étudiant : Annaïck Airoldi, 1^{ère} année de Master BioSciences et Ingénierie de la Santé, parcours Biologie Cellulaire et Physiologie, 2019, « *Effets cellulaires de complexes organométalliques à base de Fer sur des cellules cancéreuses mammaires résistantes aux thérapies aux thérapies anticancéreuses conventionnelles* »

Le cancer du sein, malgré de nettes améliorations dans son diagnostic et sa prise en charge thérapeutique, reste la 1^{ère} cause de décès chez les femmes. Différents paramètres permettent d'expliquer cette forte mortalité, tels que le manque actuel de biomarqueurs permettant de prédire la progression de la maladie. Des données préliminaires acquises par le laboratoire ont permis d'identifier la protéine DDB2 (Damaged-DNA binding 2) comme potentiel candidat pour la prédiction de la progression du cancer du sein. Une analyse *in silico* de bases de données transcriptomiques a permis de valider le rôle prédictif du gène codant DDB2 pour la progression métastatique des tumeurs mammaires, leur réponse à la chimiothérapie adjuvante, et le risque de récurrence post-traitement.

De plus, les cas de résistances aux thérapies, et les lourds effets secondaires soulignent le besoin actuel de nouvelles alternatives thérapeutiques. Le succès du cisplatine dans le traitement de nombreux cancers, dont celui du sein, a attiré l'attention des recherches sur les complexes organométalliques. C'est dans ce cadre que s'inscrit une autre partie des recherches du laboratoire qui étudie les effets cellulaires de complexes organométalliques à base de fer dans le modèle du cancer du sein. Des études préliminaires avaient mis en évidence la capacité de 2 complexes à base de Fer, appelés AIM2 et AIM3, à induire une inhibition de la prolifération de lignées cancéreuses mammaires (MDA-MB231 et T47D) et d'une lignée mammaire saine (MCF-10A). Cet effet cytostatique, qui s'étend jusqu'à 120h de traitement avec seulement 30% de cellules en phase sub-G1, a été associé avec une induction de la sénescence. De plus, nos résultats ont montré que cette sénescence est réversible uniquement dans la lignée mammaire saine, mais pas dans les lignées cancéreuses mammaires. Enfin, les résultats de cette thèse ont permis de mettre en évidence un effet potentialisateur des complexes face au Tamoxifène, à la Doxorubicine, au 5-Fluorouracile et à la radiothérapie dès 24h de prétraitement de différentes lignées mammaires. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation clinique des complexes AIM2 et AIM3 comme agent potentialisateur de la mort induite par différents traitements, mais également comme agents sénostatiques (induisant la sénescence) pour réduire le volume tumoral avant chirurgie.

Mots clés: cancer du sein, biomarqueurs, DDB2, complexes organométalliques, chimio-et-radiosensibilisateur, sénescence.

Breast cancer still remains the first cause of death in women, despite the improvement in its diagnostic and treatments. Many factors may explain this high mortality, such as the lack of biomarkers for the progression of breast cancer. Preliminary data acquired by the laboratory has identified the DDB2 (DNA-Damaged Binding 2) protein as a potential candidate for the prediction of breast cancer progression. In this work, an *in silico* analysis of several transcriptomic databases validated the predictive value of the *ddb2* gene in the metastatic progression of breast tumors, their response to adjuvant chemotherapy, and the risk of relapse post-treatment.

Moreover, cases of resistance against treatment, and the severe side effects highlights the need of new therapeutic alternatives. The success of cisplatin in the treatment of different cancers, including breast cancer, drew the attention of research to the organometallic family. In that extend, the laboratory is studying cellular effects of new iron-based organometallic compounds on breast cell lines. Preliminary data have revealed the anti-proliferative effect of two iron-based organometallic compounds, named AIM2 and AIM3, on 2 breast cancer cell lines (MDA-MB231 and T47D), and on 1 normal mammary breast cell line (MCF-10A). This cytostatic effect, which extend up to 120h of treatment with only 30% of cells in the sub-G1 compartment, has been associated with the induction of senescence. Moreover, our data showed that this senescence is reversible only in the normal mammary cell line, and not in the cancer cells. Finally, our work showed that a 24h pretreatment of different cell lines with our compounds lead to a chemo-and-radiopotentialisation effect. This work suggests the possible clinical use of AIM2 and AIM3 as chemo-and-radiosensitizers, as well as senostatic agents (senescence inductors).

Key words: breast cancer, biomarkers, DDB2, organometallic compounds, chimio-and-radiosensitizers, senescence.