

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiii
REMERCIEMENTS .....	xvii
AVANT-PROPOS .....	xix
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION .....	1
SECTION I : ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE CANCER DU POUMON : .....	1
1 Notions de base sur le cancer : cycle cellulaire et apoptose :.....	1
1.1 Généralités sur le cancer : .....	1
1.2 Notions de base sur le cycle cellulaire et dérèglements associés au cancer:.....	2
1.3 Notion de base sur l'apoptose et dérèglements associés au cancer: .....	5
2 Le cancer du poumon : .....	7
2.1 Données statistiques :.....	7
2.2 Symptomatologie du cancer du poumon :.....	8
2.3 Classification du cancer du poumon : .....	8
2.3.1 Le cancer du poumon à petites cellules :.....	8
2.3.2 Le cancer du poumon non-à-petites cellules :.....	9
2.3.2.1 L'adénocarcinome du poumon :.....	9
2.3.2.2 Le carcinome à grandes cellules :.....	9
2.3.2.3 Le carcinome épidermoïde : .....	10
2.4 Altérations moléculaires et génétiques relatives au cancer du poumon :.....	10
2.4.1 Les oncogènes et les voies de stimulation de la croissance :.....	10
2.4.1.1 La signalisation via le récepteur au facteur de croissance épidermique : .....	11
2.4.1.2 La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK : .....	11
2.4.1.3 Le gène MYC :.....	12
2.4.1.4 La protéine de fusion EML4-ALK : .....	12
2.4.1.5 La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR : .....	13
2.4.1.6 Les oncogènes SOX2 et NKX2-1 : .....	14

2.4.2	Les gènes suppresseurs de tumeurs et les voies d'inhibition de la croissance :....	14
2.4.2.1	La voie de signalisation P53 :.....	15
2.4.2.2	La voie de signalisation CDKN2A/RB :.....	15
2.4.2.3	Les gènes FHIT, RASSF1A, SEMA3B et TUSC2 :.....	16
2.4.2.4	Le gène STK11 :.....	16
2.4.3	La stimulation de l'angiogenèse :.....	16
2.4.4	L'activation de la télomérase :.....	17
2.5	Stratégies thérapeutiques actuelles de traitement du CPNPC :.....	17
2.5.1	La chirurgie :.....	17
2.5.2	La radiothérapie :.....	18
2.5.3	La chimiothérapie :.....	18
2.5.3.1	Classification des agents anticancéreux :.....	18
2.5.3.2	Agents anticancéreux usuels et potentiel des produits naturels en chimiothérapie du CPNPC:.....	19
2.5.3.3	La thérapie ciblée :.....	23
SECTION II ÉTUDE DE SAM68 DANS DIVERS PROCESSUS BIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS SUBSÉQUENTES DANS LE CANCER CHEZ L'HOMME.....		25
1	Généralités concernant SAM68 :.....	25
1.1	Affiliation de la protéine :.....	25
1.2	Localisation subcellulaire :.....	25
1.3	Structure de SAM68, et modifications post-traductionnelles associées:.....	26
2	Rôles de SAM68 dans divers processus biologiques :.....	28
2.1	SAM68 : mitose et régulation du cycle cellulaire :.....	29
2.2	SAM68 et mortalité cellulaire: apoptose et survie cellulaire :.....	31
2.3	Régulation des fonctions de SAM68 par les différentes modifications post-traductionnelles affectant la protéine :.....	33
2.3.1	Régulation des fonctions de SAM68 par tyrosine-phosphorylation :.....	33
2.3.2	Régulation des fonctions de SAM68 par sérine et thréonine phosphorylation :.....	34
2.3.3	Régulation des fonctions de SAM68 par méthylation :.....	34
2.3.4	Régulation des fonctions de SAM68 par acétylation et sumoylation :.....	35
3	Implication de SAM68 dans le cancer chez l'Homme :.....	36
3.1	Rôles de SAM68 dans le cas du cancer de la prostate :.....	36
3.2	Rôles de SAM68 dans le cancer du sein :.....	38

3.3	Rôles de SAM68 dans les leucémies et carcinomes thyroïdiens : .....	41
3.4	Rôles de SAM68 dans le cancer du poumon non-à-petites cellules : .....	42
	CHAPITRE 2 PROBLÉMATIQUE ET HYPOTHÈSE DU MÉMOIRE .....	43
	CHAPITRE 3 ANTITUMOR ACTIVITY OF <i>HELLEBORUS CAUCASICUS</i> ENRICHED EXTRACT AGAINST LUNG CANCER AND STUDY OF MECHANISM OF ACTION .....	45
	RÉSUMÉ: .....	45
	Antitumor activity of <i>Helleborus caucasicus</i> enriched extract against lung cancer and study of mechanism of action.....	47
	KEYWORDS.....	47
	ABSTRACT.....	47
	INTRODUCTION .....	48
	MATERIALS AND METHODS .....	50
	Extraction procedure.....	50
	Cell culture.....	50
	Cytotoxicity assay .....	50
	Cell cycle distribution analysis by flow cytometry.....	51
	Cell viability assay .....	51
	Flow cytometric assessment of cell death using Annexin V-FITC assay .....	52
	Morphological cell assessment by hematoxylin and eosin staining.....	52
	RNA extraction, total RNA quantification and transcriptome analysis .....	53
	<i>In vivo</i> drug antitumoral activity and toxicity study .....	53
	Statistical analysis .....	54
	RESULTS AND DISCUSSION .....	54
	Evaluation of cytotoxic activity of <i>H. caucasicus</i> enriched extract against normal and lung cancer cell lines. ....	54
	Evaluation of the mechanism of action of the <i>H. caucasicus</i> enriched extract on A549 human lung adenocarcinoma cells.....	55
	Effect of <i>H. caucasicus</i> enriched extract on the cell cycle distribution. ....	55
	A549 cell death assessment .....	56
	Effect of the <i>H. caucasicus</i> enriched extract on the transcriptome of A549 cells .....	58
	Antitumor activity of the <i>H. caucasicus</i> enriched extract against Lewis lung cancer bearing mice .....	60
	CONCLUSION.....	61
	REFERENCES .....	62

CHAPITRE 4 ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'EXTRAIT SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SAM68, SOUS SA FORME NATIVE.....	75
1 Introduction : .....	75
2 Matériels et Méthodes : .....	77
2.1 Anticorps primaires et secondaires : .....	77
2.2 Lignée utilisée et culture cellulaire : .....	77
2.3 Stimulation des A549 et évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type <i>Western</i> : .....	78
2.4 Stimulation des A549 et évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type <i>Western</i> : .....	79
2.5 Contrôle des charges par évaluation des niveaux de $\beta$ -Actine après détachement des anticorps des membranes: .....	81
3 Résultats : .....	82
3.1 Évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type <i>Western</i> dans un modèle de lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain:.....	82
3.2 Évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type <i>Western</i> dans un modèle de lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain: .....	85
4 Discussion : .....	88
CHAPITRE 5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES DU PROJET .....	91
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	97
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	99

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie du CPNPC.....	18
Tableau 2: Cytotoxic activity of <i>H. caucasicus</i> enriched extract against normal and lung cancer cell lines.....	68
Tableau 3: Differentially expressed transcripts of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with 2.5 µg/mL of <i>H. caucasicus</i> enriched extract.....	72
Tableau 4: Composition du tampon de Laemmli 2X.....	78
Tableau 5: Composition du tampon de lyse hypotonique.....	80



## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Étapes et acteurs principaux du cycle cellulaire [12].	3
Figure 2: Principales voies de l'apoptose cellulaire (figure modifiée [43]).	5
Figure 3: La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK [77].	12
Figure 4: La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR [77].	14
Figure 5 : Les voies de signalisation P53 et RB [77].	15
Figure 6 : Localisation de SAM68 dans les SNBs [147].	26
Figure 7: Représentation structurale schématique de SAM68 [86].	28
Figure 8: Représentation schématique des rôles possibles joués par SAM68 à différents niveaux subcellulaires [145].	30
Figure 9: Représentation schématique de l'implication de SAM68 dans la voie de signalisation du TNF- $\alpha$ [106].	32
Figure 10: Représentation schématique des évènements d'épissage alternatif relatifs à l'apoptose, la prolifération, l'adhésion et l'invasion cellulaire induits par SAM68 dans le cas du cancer [214].	38
Figure 11: Représentation schématique de la cascade de signalisation impliquant BRL/SAM68/ERK5 relative à l'activation du récepteur Met par HGF, et des évènements cellulaires qui en découlent [219].	40
Figure 12 : Représentation schématique des interventions possibles de SAM68 dans différentes interactions protéines-protéines et régulation conséquente de la transcription d'évènements cancer-spécifiques [214].	41
Figure 13: <i>Cell cycle analysis of A549 human lung adenocarcinoma cells following treatment with H. caucasicus enriched extract.</i>	69
Figure 14: <i>Analysis of A549 cells viability and induction of apoptosis by H. caucasicus enriched extract.</i>	70
Figure 15: <i>Apoptotic cells revealed by hematoxylin and eosin staining in A549 cells.</i>	71
Figure 16: <i>Evaluation of antitumor activity of H. caucasicus extract against Lewis lung cancer bearing mice.</i>	73
Figure 17: <i>Evaluation of toxicity of H. caucasicus enriched extract in Lewis lung cancer bearing mice.</i>	74

Figure 18:Principales étapes de l'immunobuvardage de type *Western* menant à la détection de protéines d'intérêt [230].....76

Figure 19: Principe de détection de protéine d'intérêt par immunobuvardage de type *Western* [231].....76

Figure 20: Évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, A549.....84

Figure 21: Évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, A549. ....87

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique.  
AKT: *v-akt murine thymoma viral oncogene*.  
ALK: *Anaplastic Lymphoma Kinase*.  
ANKRD1: *Ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)*.  
ANOVA: *ANalysis Of VAriance*.  
Apaf1: *Apoptotic peptidase activating factor 1*.  
AR: *Androgen receptor*.  
ARN: Acide ribonucléique.  
BRAF: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*.  
BRK: *Breast tumor kinase*.  
Caspase: *CysteinyI-aspartate-cleaving protease*.  
CAD: *Caspase activated DNase*.  
CBP: *CREB-binding protein*.  
Cdc2: *Cell division cycle protein 2 homolog*.  
CDKN2A: *Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A*.  
CDKs: *Cyclin-Dependent Kinase*.  
cIAP: *cellular inhibitor of apoptosis protein*.  
CKI: *Cancer-Dependent kinase inhibitor*.  
CPNPC: Cancer du poumon non-à-petites cellules.  
CPPC: Cancer du poumon à petites cellules.  
DISC: *Death-inducing signaling complex*.  
DMEM: *Dulbecco's Minimal Essential Medium*.  
DMSO: Diméthylsulfoxyde.  
E2F3: *E2F transcription factor 3*.  
ECL: *Enhanced chemiluminescent*.  
EGFR: *Epidermal growth factor receptor*.  
EML4: *Echinoderm Microtubule-associated protein like-4*.  
ERBB2: *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*.  
ERK1/2: *Extracellular regulated kinases 1 and 2*.

FADD: *Fas-Associated protein with Death Domain*.

Fas-L: Ligand de Fas.

Fas-R : Récepteur au Fas.

FHIT: *Fragile Histidin Triad*.

FLIP: *FLICE-like inhibitory protein*.

FOXO3: *Forkhead box O3*.

GRB2: *Growth factor receptor-bound protein 2*.

GSG: GRP33/SAM68/GLD-1.

HGF: *Human Growth Factor*.

HPC: *Human pulp cell*.

IC50: *half maximal inhibitory concentration*.

IKK: *I $\kappa$ B kinase*.

KH: *hnRNP-K homology*.

KHDRBS1: *KH Domain Containing RNA Binding Signal Transduction associated 1*.

KRAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*.

LASÈVE: Laboratoire d'Analyse et de Séparation des essences Végétales.

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*.

MLL-EEN: *Myeloïd Lymphoïd Leukemia-Extra Eleven Nineteen*.

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*.

MYC: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*.

NCK: *Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*.

NKX2-1: *NK2 homeobox1*.

NLS: *Nuclear localization Signal*.

NSCLC: *Non-small-cell lung cancer*.

PBS: *Phosphate Buffered saline*.

PI3K: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*.

PIK3CB: *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta*.

PIK3R1: *Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)*.

PM: Poids moléculaire.

PRMT1: *Protein arginine N-methyltransferase 1*.

pRb: *Retinoblastoma protein*.

PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog.*

PVDF: Polyfluorure de vinylidène.

qRT-PCR : Real-Time Quantitative Reverse Transcription.

RASSF1: *Ras association (RAIGDS/AF-6).*

RASSF1A: *Ras association (RaIGDS/AF-6) domain family member 1.*

RB: *Retinoblastoma.*

RET/PTC2: *Rearranged During Transfection/Protein phosphatase type 2C.*

RIPK1: *Receptor-interacting protein kinase 1.*

RPMI 16-40: *Roswell Park Memorial Institute 1640.*

SAM68: *Src-associated during mitosis, 68kDa.*

SCLC: *Small-cell lung cancer.*

SD: *Standard Deviation.*

SDS: *Dodécylsulfate de sodium.*

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis.*

SEMA3B: *Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B.*

SFKs: *Src Family Kinases.*

SH3: *Src homology 3.*

SIRT1: *Sirtuin 1.*

SLM: *SAM-like mammalian proteins.*

SNB: *SUMO-1 Nuclear Body.*

SOS1: *Son of sevenless homolog 1 (Drosophila).*

SOX2: *Sex determining region Y-box2.*

SQ: *Subcutaneously.*

STAR: *Signal transducer and activator of RNA.*

STAT3: *Signal Transducer and Activator of Transcription 3.*

STAT5: *Signal Transducer and Activator of Transcription 5.*

STK11: *Serine/threonine kinase 11.*

TAB: *TGF-  $\beta$ - activated kinase 1/MAP3K7 binding protein.*

TAK1: *TGF-  $\beta$ -activated kinase 1.*

TCR: *T Cell Receptor.*

TITF1: *homeobox transcription factor TTF1.*

TNF: *Tumor necrosis factor.*

TP53: *Tumor Protein p53.*

TRADD: *TNFR1-associated death domain protein.*

TRAF2: *TNFR-associated factor 2.*

TUSC2: *Tumor Suppressor Candidate 2.*

v5: *variable exon 5.*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor.*

ZAP70: *Zeta-chain-associated protein kinase.*

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Jean Legault et mon codirecteur de recherche, le Dr. André Pichette, pour avoir accepté de me confier ce projet de recherche passionnant ainsi que pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire.

Je souhaiterais également remercier le Dr. Caroline Gilbert, pour m'avoir supervisée et accueillie dans son laboratoire à l'occasion du stage effectué à l'été 2013. Ce sont ses conseils qui m'ont permis d'acquérir une méthode de travail précise et efficace ainsi que de développer mes capacités d'analyse. Mon séjour dans son laboratoire a permis de confirmer ma volonté de devenir chercheuse dans un avenir proche.

Je tiens également à remercier les membres du laboratoire de bio-activité LASÈVE de l'UQAC, Karl Lalancette et Catherine Dussault, ainsi que les membres du laboratoire Gepromic, Vanessa Tremblay-Vaillancourt et Anne-Marie Madore, pour leurs conseils avisés tout au long de ce projet de recherche.

Je souhaiterais également remercier le département des sciences de la santé et le programme de Maîtrise en médecine expérimentale de l'UQAC pour les bourses qu'ils m'ont octroyées et qui m'ont permis de réaliser cette maîtrise.

Ensuite, j'aimerais remercier mes amis, particulièrement, Manu, Thanh, Clara, et ma petite sœur, Agnès, qui ont su se montrer patients, motivants et surtout présents au cours des deux années écoulées. C'est grâce à leur soutien et à leurs encouragements, que j'ai pu mener et achever cette maîtrise. Je souhaite enfin dédier ce mémoire à mes parents, tout particulièrement à ma mère, que je ne remercierai jamais assez et sans lesquels je n'aurais jamais pu réaliser cette maîtrise. Ce sont vos nombreuses qualités, votre confiance, votre soutien inconditionnel qui m'ont permis de traverser les deux années écoulées avec succès.



## AVANT-PROPOS

Le mémoire présenté ici est constitué de cinq chapitres. La section 1 du chapitre 1 introduit quelques notions élémentaires de biologie cellulaire concernant le cancer afin d'assurer la compréhension du mémoire. La section 1 du chapitre 1 fait également état des connaissances actuelles concernant le cancer du poumon et plus particulièrement, le cancer du poumon non-à-petites cellules. La section 2 du chapitre 1 fait état des connaissances actuelles à propos de la protéine SAM68, de son implication dans divers processus biologiques et dans le cancer chez l'humain. Le chapitre 2 renseigne sur la problématique et les objectifs du projet de recherche. Le chapitre 3, présenté sous forme d'article scientifique, rapporte : i) l'évaluation *in vitro* de l'activité cytotoxique de l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* sur plusieurs modèles de cellules cancéreuses de poumon et de fibroblastes normaux de poumon; ii) l'évaluation *in vivo* de l'activité anti-tumorale de l'extrait sur des souris porteuses de tumeur de poumon LLC1; iii) l'évaluation du potentiel pro-apoptotique de l'extrait; ainsi que son effet sur le cycle cellulaire et le transcriptome. Le chapitre 4, rédigé sous une forme classique, présente les résultats de l'évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression et la localisation subcellulaire de la protéine SAM68, sur un modèle cellulaire d'adénocarcinome de poumon. Le chapitre 5 consiste en une discussion générale des chapitres 3 et 4 permettant de corréler entre eux, les résultats issus de chacune des deux études et de tirer une conclusion générale ainsi que les perspectives du projet présenté.

Les expérimentations relatives au chapitre 3 ont été effectuées par moi-même au laboratoire LASÈVE de l'UQAC, sous la supervision du Docteur Jean Legault qui a conçu le profil méthodologique de l'étude et la codirection du Docteur André Pichette. L'extraction relative à l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* étudié dans ce mémoire a été réalisée par Balla Sylla, stagiaire post-doctoral, et le Docteur Vakhtang Mshvildadze. Le manuscrit d'article présenté au chapitre 3 a été réalisé par moi-même et révisé par le Docteur Jean Legault et le Docteur André Pichette. Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées par le Docteur Alexandre Brunet, au laboratoire de cytométrie en flux du Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval et les analyses relatives au transcriptome ont été effectuées au Centre d'Innovation Génome Québec à l'université McGill. Les expérimentations relatives au chapitre 4 ont été effectuées par moi-même au Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université Laval sous la supervision du Docteur Caroline Gilbert.



# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

## SECTION I : ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE CANCER DU POUMON :

### 1 Notions de base sur le cancer : cycle cellulaire et apoptose :

#### 1.1 Généralités sur le cancer :

Le cancer est une maladie génétique non héréditaire [1] pour laquelle certaines cellules d'un organisme adoptent un comportement anormal caractérisé par une indépendance vis-à-vis des signaux qui stimulent la prolifération cellulaire, une insensibilité aux signaux et mécanismes antiprolifératifs, une capacité proliférative illimitée (croissance infinie), la disparition du phénomène d'apoptose, une capacité anormale à induire l'angiogenèse et l'acquisition d'un pouvoir invasif aboutissant à la production de tumeurs malignes [2, 3]. Ces tumeurs malignes ont tendance à envahir les tissus sains avoisinants, formant alors des « métastases » ou tumeurs secondaires létales.

Le cancer est un évènement pathologique relativement rare. En effet, d'un point de vue génétique, les cellules constitutives d'une tumeur cancéreuse dérivent presque toujours de la prolifération incontrôlée d'une cellule unique aberrante [1]. Le processus de cancérisation comporte une succession d'altérations génétiques qui peuvent être causées par des agents chimiques carcinogènes (ex : amiante, aflatoxine, parabène, etc...), des radiations ionisantes ou encore divers virus tumoraux à ARN (Acide Ribonucléique) ou à ADN (Acide déoxyribonucléique) tel que le virus de l'Epstein-Barr associé au lymphome de Burkitt [1, 4]. Ces altérations génétiques survenant au sein de l'ADN d'une cellule somatique confèrent alors à cette dernière des propriétés particulières, telles que décrites plus haut.

D'un point de vue cellulaire, les cellules cancéreuses possèdent généralement des exigences métaboliques différentes de celles de leurs homologues saines. En effet, en raison de l'hypoxie de l'environnement tumoral, les cellules cancéreuses développent un métabolisme plus glycolytique qu'oxydatif [5, 6]. Au niveau nucléaire, les cellules cancéreuses possèdent un nombre anormal de

chromosomes, ce qui les démarque des cellules saines qui comportent 22 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels [1]. Ce phénomène est appelé aneuploïdie.

L'accumulation de toutes ces caractéristiques aberrantes conduit au développement de la maladie la plus fréquemment développée au monde puisque le cancer touche aujourd'hui 25 millions d'individus dans le monde [7].

## **1.2 Notions de base sur le cycle cellulaire et dérèglements associés au cancer:**

Comme mentionné précédemment, les cellules cancéreuses résultent de l'accumulation de mutations. Ces mutations se traduisent par une signalisation mitogénique constitutive et une réponse aux signaux anti-mitogènes défectueuse [8, 9]. Ces deux éléments conduisent alors à une prolifération cellulaire aberrante. La plupart des tumeurs présentent également une instabilité génomique qui aboutit à des mutations supplémentaires conduisant à une instabilité chromosomique [10, 11]. La prolifération cellulaire aberrante, l'instabilité génomique et chromosomique spécifiques des cellules cancéreuses résultent en fait de dysfonctionnements du cycle cellulaire [12]. Le cycle cellulaire a pour but de contrôler la prolifération et d'assurer l'intégrité génétique d'une cellule dite « normale ». Ce cycle cellulaire est lui-même contrôlé par de nombreux mécanismes permettant d'assurer une division cellulaire correcte ou mitose. La division cellulaire est divisée en deux étapes qui permettent la réplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes répliqués au sein des deux cellules filles séparées [12]. Ces deux étapes sont la mitose, qui désigne le processus de division au sein du noyau, et l'interphase qui désigne une période située entre deux mitoses, au cours de laquelle la cellule croît [12].

Comme présenté à la figure 1, l'interphase inclut trois phases :  $G_1$ , S et  $G_2$  [13]. La phase  $G_1$  permet la préparation de la cellule à la synthèse de son ADN [12]. La phase S consiste à la réplication de l'ADN et la phase  $G_2$  permet la préparation de la cellule à la mitose [12]. Avant la réplication de l'ADN, les cellules en phase  $G_1$  peuvent entrer dans une phase de quiescence appelée phase  $G_0$  [12]. La transition d'une phase du cycle cellulaire à une autre est sous la dépendance de protéines-clés appelées kinases dépendantes des cyclines (CDK, *Cyclin-dependent kinase*) dont l'activation a lieu à des moments spécifiques du cycle cellulaire [14]. Pour assurer la progression ordonnée du cycle cellulaire, les CDKs requièrent la liaison à des protéines régulatrices appelées cyclines, avec lesquelles elles forment des complexes [12].

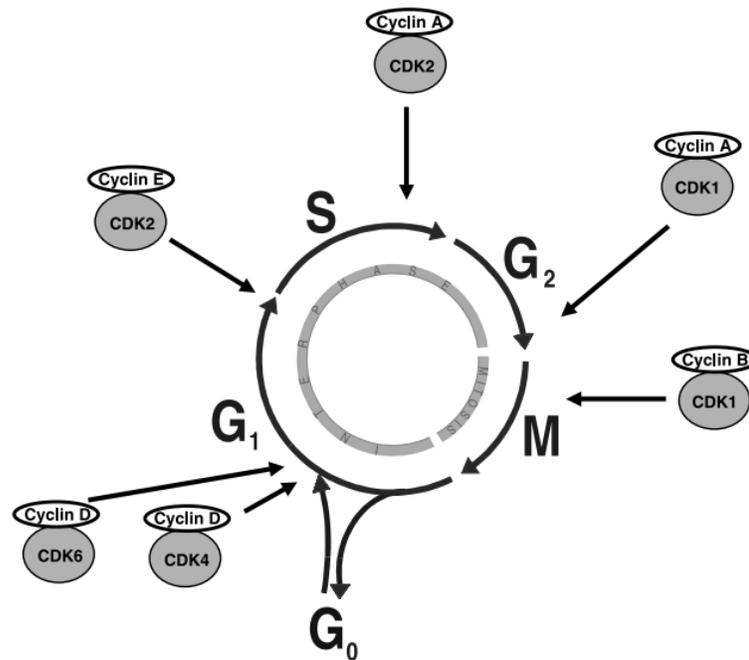


Figure 1: Étapes et acteurs principaux du cycle cellulaire [12].

En premier lieu, les cyclines D1, D2 et D3 détectent les signaux mitogènes [15]. Ces cyclines se lient et activent les CDK4 et CDK6 au cours de la phase G<sub>1</sub> [15]. Les complexes ainsi formés permettent l'entrée en phase G<sub>1</sub> [15]. À la fin de la phase G<sub>1</sub>, les cyclines E1 et E2 se lient et activent les CDK2 [16]. Les complexes ainsi formés permettent alors la transition de la phase G<sub>1</sub> à la phase S [16]. À la fin de la phase S, les cyclines A2 se lient aux CDK2 permettant ainsi la transition de la phase S vers la phase G<sub>2</sub> [17, 18]. De même, à la fin de la phase G<sub>2</sub>, les cyclines de type A se lient et activent les CDK1 ce qui permet l'entrée de la cellule en mitose [19]. Au cours de la rupture de l'enveloppe nucléaire, les cyclines de type A sont dégradées ce qui permet la formation de complexes entre les CDK1 et les cyclines du type B. Ces complexes permettent alors à la cellule d'accomplir la mitose [20].

En plus de leur liaison aux cyclines, l'activité des CDK est régulée par phosphorylation et déphosphorylation [12]. Le complexe CAK (*Cdk-activating kinase*) formé par les cyclines H et les CDK7, agit comme une kinase activatrice des CDK1 et CDK4 qu'il phosphoryle permettant ainsi d'augmenter la liaison de ces dernières aux cyclines A, B et D [21, 22]. Les phosphatases Cdc25 activent également les CDK1, CDK2 et CDK6 par déphosphorylation [23]. D'autre part, les kinases

inhibitrices Wee1 et Myt1 phosphorylent les CDK1 au niveau des tyrosine-14 et/ou thréonine-15, ce qui aboutit à l'inhibition des CDK1 [12]. D'autres protéines peuvent contrer l'activité des CDK, les inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (CKI, *Cyclin-dependent kinase inhibitor*) [12]. Les CKI appartenant à la famille INK4 incluant p15, p16, p18 et p19, inactivent spécifiquement les CDK4 et CDK6 par formation de complexes, prévenant ainsi la liaison des CDK aux cyclines [24]. Les CKI appartenant à la famille Cip/Kip incluant p21, p27 et p57, inhibent les complexes CDK-cyclines de la phase G<sub>1</sub> et les complexes formés par les CDK1-cyclines B [25-28].

La progression normale du cycle cellulaire et la qualité du matériel génétique de la cellule sont sous la dépendance de points de contrôle et de restriction localisés à plusieurs niveaux du cycle cellulaire [12]. Ces points de contrôles permettent de détecter des anomalies éventuelles au cours de la synthèse de l'ADN ou de la ségrégation des chromosomes [12]. L'activation de ces points de contrôles induit un arrêt du cycle cellulaire en modulant l'activité des CDK, ce qui permet la réparation des défauts détectés et leur transmission subséquente aux cellules filles [14].

Le point de restriction R, localisé entre la phase G<sub>1</sub>-précoce et la phase G<sub>1</sub>-tardive est défini comme un point de non-retour suivant lequel la cellule est obligée d'entrer dans le cycle cellulaire et proliférer indépendamment de signaux mitogènes [29]. L'intégrité de l'ADN est contrôlée avant l'entrée en phase S, au niveau du point de contrôle G<sub>1</sub>-S. À ce niveau, les complexes CDK4/6-cyclines D phosphorylent la protéine Rb (pRb, *Retinoblastoma protein*) qui permet le relargage de facteurs de transcription parmi lesquels l'E2F, assurant ainsi la transition de la phase G<sub>1</sub> à la phase S [30-32]. De plus, les dommages éventuels de l'ADN détectés au point de contrôle G<sub>1</sub>-S induisent un arrêt du cycle grâce à la protéine p53 [33]. Cette dernière stimule la transcription de plusieurs gènes qui inhibent l'activité des CDK, permettant de bloquer le cycle cellulaire et de prévenir la réplication d'ADN endommagé [34, 35]. Ainsi, une fois ce point de contrôle passé, la cellule est autorisée à répliquer son ADN et entre donc en phase S. Le contrôle de l'intégrité de l'ADN répliqué a lieu au point de contrôle G<sub>2</sub>-M à l'issue duquel la cellule est autorisée à entrer en mitose ou non [12]. Enfin, au niveau de la phase M, le point de contrôle du fuseau permet la vérification de l'alignement des chromosomes formés le long du fuseau mitotique [36]. Si les dommages causés à l'ADN ne sont malgré tout pas réparés, la cellule entre en sénescence ou est orientée vers la mort cellulaire par apoptose [14].

Dans le cas du cancer, des mutations affectent l'expression des gènes des principaux acteurs du cycle cellulaire à savoir, les CDK, les cyclines, les enzymes activant les CDK, les CKI et les protéines agissant au niveau des points de contrôle [12, 37, 38]. De plus, l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur pRb et p53 aboutissent au disfonctionnement des protéines qui normalement, inhibent la progression du cycle cellulaire [39, 40]. Ainsi, l'ADN altérée est transmis aux cellules filles, les mutations génétiques s'accumulent et la prolifération des cellules devient incontrôlée.

### 1.3 Notion de base sur l'apoptose et dérèglements associés au cancer:

Comme mentionné à la section 1.1), le cancer se caractérise entre autres, par la disparition du phénomène d'apoptose. En conditions physiologiques, l'apoptose permet normalement d'éliminer une cellule lorsque les dommages causés à l'ADN sont irréparables [41]. Il s'agit du type de mort cellulaire programmée le plus fréquent [42]. C'est un processus finement régulé pouvant être induit par deux principales voies de signalisation, comme schématisé à la figure 2. À titre d'information, il existe une troisième voie de signalisation pouvant induire l'apoptose, la voie perforine/granzyme, impliquée dans la cytotoxicité médiée par les lymphocytes T, mais cette dernière ne sera pas abordée ici.

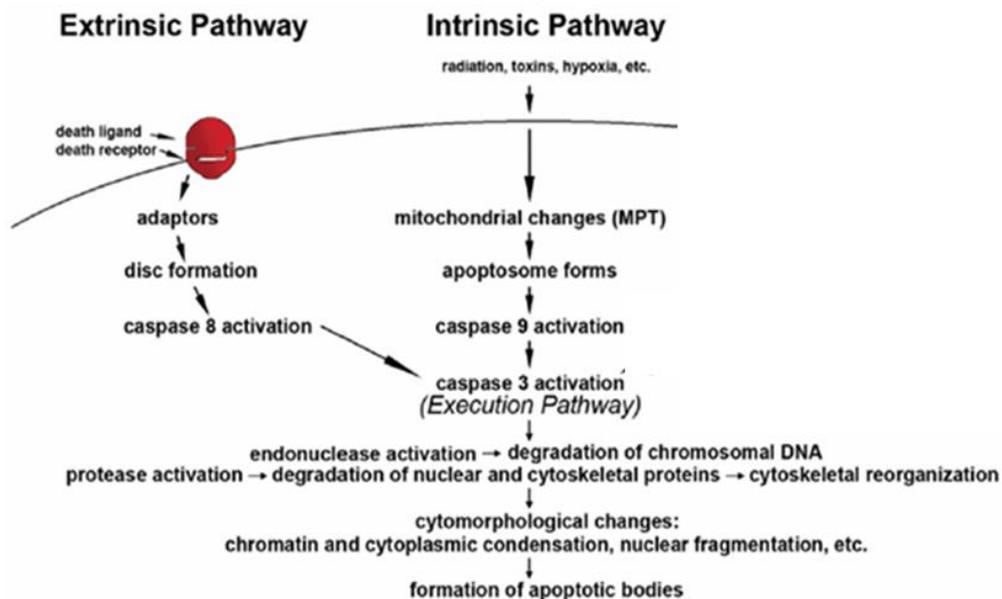


Figure 2: Principales voies de l'apoptose cellulaire (figure modifiée [43]).

La voie de signalisation extrinsèque ou voie des récepteurs de mort est déclenchée par la liaison de récepteurs transmembranaires appartenant à la famille du TNF (*Tumor necrosis factor*) avec leurs ligands extracellulaires [44]. Les ligands et récepteurs de morts associés les mieux caractérisés incluent le ligand Fas (Fas-L) et le récepteur au Fas (Fas-R) aussi pour la suite, cet exemple sera choisi comme modèle d'explication [43]. Suite à un stimulus de mort, Fas-L se lie au Fas-R et les deux éléments forment un complexe. Le complexe recrute alors une protéine contenant un domaine de mort, FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), qui s'associe avec une pro-enzyme inactive, la pro-caspase 8 [45]. Cette association constitue le complexe DISC (*Death-inducing signaling complex*) et permet l'activation auto-catalytique de la pro-caspase 8 [46]. Lorsque la caspase 8 est activée, la phase effectrice de l'apoptose est déclenchée.

La voie de signalisation intrinsèque ou voie mitochondriale est déclenchée par des stimuli aussi divers que des radiations, une situation d'hypoxie ou encore l'absence de certains facteurs de croissance [43]. Ces stimuli induisent des changements de perméabilité de la membrane mitochondriale avec ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries [47]. Il y a alors relargage de protéines pro-apoptotiques dans le cytosol cellulaire parmi lesquelles, le cytochrome c [48]. Le cytochrome c se lie et active alors Apaf1 (*Apoptotic peptidase activating factor 1*) et la pro-caspase 9, formant ainsi un apoptosome. Lorsque la caspase 9 est activée, la phase effectrice de l'apoptose est déclenchée [49].

L'induction de l'une ou l'autre des voies de signalisation de l'apoptose aboutit dans les deux cas à l'activation de caspases effectrices dont la caspase 3, considérée comme la plus importante [42]. La caspase 3 active spécifiquement l'endonucléase CAD (*Caspase Activated DNase*) capable de dégrader l'ADN nucléaire ce qui permet *in fine*, la condensation de la chromatine, le réarrangement du cytosquelette cellulaire et la désintégration de la cellule en corps apoptotiques [50].

Comme décrit à la section 1.2), le cancer est un exemple pathologique dans lequel les mécanismes normaux de régulation du cycle cellulaire présentent des dysfonctionnements, résultant en une prolifération cellulaire aberrante et/ou une diminution dans l'élimination des cellules ayant accumulé des aberrations [51]. La suppression de l'apoptose est donc un événement-clé de la carcinogénèse au cours de laquelle les cellules cancéreuses utilisent de nombreux mécanismes moléculaires leur

permettant d'échapper à ce processus de mort cellulaire programmée [52]. À titre d'exemple, certains de ces mécanismes incluent la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 ou encore la régulation à la baisse de protéines pro-apoptotiques comme Bax [43]. D'autres mécanismes encore, incluent l'expression d'un récepteur au Fas non-fonctionnel ou bien l'expression d'un récepteur au Fas soluble, qui séquestre le ligand Fas, en empêchant ainsi la liaison avec le Fas-R transmembranaire [53, 54].

## **2 Le cancer du poumon :**

### **2.1 Données statistiques :**

On estime que 191 300 cas de cancer (à l'exclusion de 81300 cas de cancer de la peau autre que le mélanome) et 76 600 décès causés par cette maladie sont survenus au Canada en 2014 [55]. Plus de la moitié (52%) des cas de cancer nouvellement diagnostiqués sont des cancers du poumon, des cancers colorectaux, des cancers de la prostate et des cancers du sein [55]. Plus du quart (27%) de tous les décès par cancer sont attribuables au cancer du poumon, plaçant ce dernier, en première position en termes de fréquence de décès imputables à la maladie [55]. Il est également considéré que 27% des décès dits « prématurés » par cancer sont attribuables au cancer du poumon et ce, pour les deux sexes [55]. L'incidence et la mortalité du cancer du poumon normalisées selon l'âge, le sexe et la population varient au Canada selon les provinces. C'est en effet au Québec que l'on trouve le plus fort taux d'incidence du cancer du poumon [55]. Le cancer du poumon est de plus responsable de la mort de deux fois plus de femmes au Québec que le cancer du sein et plus de quatre fois plus d'hommes que le cancer de la prostate [55]. Il semble que la moitié de tous les cas de cancer du poumon soient diagnostiqués chez les personnes âgées de 70 ans et plus, tant chez les hommes que chez les femmes [55]. Il est estimé que parmi les individus ayant développé un cancer du poumon, seulement 17% survivent après 5 ans [55].

Le tabagisme direct est responsable du développement de plus de 85% des cas de cancer du poumon [56]. Les 15% restants sont causés par des facteurs environnementaux (exposition au radon, pollution atmosphérique), des facteurs associés au mode de vie (alimentation, fumée secondaire) ou encore par des facteurs en relation avec l'activité professionnelle (exposition à

l'amiante, au charbon ou à la silice) [57]. L'hérédité familiale soit, les prédispositions génétiques, et la contraction antérieure de pneumopathies peuvent également être à l'origine de cette forme de cancer [57].

## **2.2 Symptomatologie du cancer du poumon :**

Les symptômes liés au développement d'un cancer du poumon sont relativement nombreux et différent selon le sous-type de cancer du poumon développé par l'individu mais l'on peut néanmoins constater un affaiblissement de l'état général de l'individu [58]. Les quatre premiers symptômes en termes de fréquences sont une toux persistante (74%), une perte de poids (68%), une dyspnée (difficulté respiratoire ou essoufflement) (58%) et des douleurs thoraciques (sensation d'oppression) (49%), symptômes qui handicapent fortement le patient [58, 59]. L'hémoptysie, soit le rejet de sang oxygéné, après un effort de toux est également un symptôme typique du carcinome épidermoïde, un sous-type de cancer du poumon, décrit plus loin [60]. De nombreux patients présentent fréquemment une pneumonie, sous-jacente au cancer en tant que tel [60, 61]. Les symptômes décrits plus haut peuvent être attribuables à d'autres maladie du système respiratoire, en plus de ne pas être alertant pour certains, d'où la difficulté à diagnostiquer le cancer du poumon dans ses stades les plus précoces souvent plus facilement traitables.

## **2.3 Classification du cancer du poumon :**

Le cancer du poumon est classiquement subdivisé en deux types majeurs soit, le cancer du poumon à petites cellules (CPPC) et le cancer du poumon non-à-petites cellules (CPNPC) eux même sous divisés en plusieurs sous-catégories [57, 62]. La classification de ces deux grands types repose sur des critères histologiques, soit la taille et l'aspect des cellules cancéreuses observées lors d'un diagnostic, des critères cliniques et des caractéristiques neuroendocrines. Dans les sous-sections suivantes, nous mettrons l'accent sur le cancer du poumon non-à-petites cellules, catégorie sur laquelle a été mené le projet de recherche présenté dans ce mémoire.

### **2.3.1 Le cancer du poumon à petites cellules :**

Entre 15 et 20 % des cas de cancer de poumon diagnostiqués sont des cancers du poumon dits « à petites cellules » [63]. Il s'agit de la catégorie de cancer du poumon la plus agressive, diagnostiquée

le plus souvent à un stade métastatique, et d'évolution plus rapide que son homologue non-à petites-cellules [64]. Il est également associé à une mauvaise réponse au traitement de chimiothérapie et à un mauvais pronostic [65]. L'origine de ce cancer est neuroendocrine puisque les alvéoles pulmonaires présentent des granules neurosécrétoires chargés de neuro-hormones. Les cellules cancéreuses de cette catégorie, rondes ou ovales, présentent des contours irréguliers, une petite taille et un cytoplasme peu abondant [62, 66]. La chromatine nucléaire apparaît granuleuse et les nuclei, sont à peine visibles, voir absents [66]. Les tumeurs relatives à cette catégorie, souvent nécrotiques et mal délimitées, sont localisées le plus souvent au sein des voies aériennes proximales et il est rare d'en retrouver à l'intérieur même des bronches [67].

### 2.3.2 Le cancer du poumon non-à-petites cellules :

La très large majorité des cas de cancer du poumon diagnostiqués, soit entre 75 et 80 % sont imputables au cancer du poumon dit non-à-petites cellules [68]. Il s'agit d'un groupe hétérogène, au contraire du CPPC. Son évolution est plus lente. Il est classifié en trois sous-types : l'adénocarcinome du poumon, le carcinome à grandes cellules (non-différencié) et le carcinome épidermoïde décrits ci-après [57].

#### 2.3.2.1 *L'adénocarcinome du poumon :*

L'adénocarcinome du poumon est un cancer du poumon épithélial d'origine glandulaire, c'est-à-dire capable de sécréter des mucines [67]. Il est le sous-type de cancer de poumon, toutes catégories confondues, le plus couramment diagnostiqué, y compris chez les individus non-fumeurs [69, 70]. Les tumeurs associées à cette catégorie, bien délimitées, sont plutôt périphériques et localisées à un niveau sous-pleural. Histologiquement hétérogène, l'adénocarcinome du poumon peut être broncho-alvéolaire, solide, acinaire ou papillaire bien que cette classification soit discutée [71, 72]. Les cellules propres à cette catégorie sont organisées en papilles ou en acini. Elles sont bien délimitées et leur cytoplasme est relativement abondant, clair ou granuleux. La chromatine nucléaire apparaît également granuleuse [67].

#### 2.3.2.2 *Le carcinome à grandes cellules :*

Il s'agit du sous-type de CPNPC le moins différencié mais également le moins répandu, toutes catégories de cancer du poumon confondues [73]. Les cellules cancéreuses, bien que de grande

taille, ne présentent pas de caractéristiques cytologiques spécifiques. Aussi, le carcinome à grandes cellules est diagnostiqué par discrimination des autres sous-types [74, 75]. La majorité des tumeurs associées à cette catégorie est périphérique et volumineuse [67].

#### 2.3.2.3 *Le carcinome épidermoïde :*

Il s'agit de la catégorie typiquement diagnostiquée chez les fumeurs [76]. Les cellules cancéreuses peuvent être papillaires, claires, petites et rondes [71]. Elles présentent une différenciation malpighienne. Les tumeurs sont localisées à l'intérieur des grosses bronches ainsi que dans leur revêtement [67].

### **2.4 Altérations moléculaires et génétiques relatives au cancer du poumon :**

En plus de leurs différences histologiques, les cancers du poumon à petites cellules et non-à-petites cellules se distinguent de par la présence d'altérations moléculaires et génétiques qui leurs sont propres [77]. Ces altérations modifient l'expression de proto-oncogènes, de gènes suppresseurs de tumeurs, de gènes de réparation de l'ADN et d'enzyme clés qui induisent la carcinogenèse pulmonaire et permettent la modification du microenvironnement tumoral. La transformation maligne d'une cellule saine à l'origine, implique la notion d'instabilité génétique [77]. Celle-ci atteint le niveau chromosomique (translocations, perte ou gain de matériel génomique), le niveau nucléotidique (changement d'une ou plusieurs bases nucléotidiques) et/ou le transcriptome (altération de l'expression des gènes) de la cellule en transformation [77]. Via différentes voies de signalisation intracellulaires, ces mécanismes permettent alors à la cellule cancéreuse d'échapper à la mort cellulaire par apoptose et donc de proliférer indéfiniment.

#### 2.4.1 Les oncogènes et les voies de stimulation de la croissance :

L'induction de la croissance de la cellule tumorale passe par la surexpression persistante de signaux de croissance mitogènes. Cette surexpression résulte de l'activation d'oncogènes induite par des mutations ponctuelles, leur amplification, leur surexpression ou les réarrangements au sein même de l'ADN.

#### 2.4.1.1 La signalisation via le récepteur au facteur de croissance épidermique :

L'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) est un récepteur à tyrosine kinase qui s'active par liaison à différents ligands, par homo- ou hétérodimérisation. La surexpression ou l'activation aberrante de l'EGFR occurrent dans 50 à 90% des cancers du poumon non –à-petites cellules, en particulier dans les cas d'adénocarcinome pulmonaire [78]. Par ailleurs, les mutations somatiques de l'ERBB2 (*v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*), un récepteur tyrosine kinase de la même famille que l'EGFR, surviennent dans 2 à 4 % des cas d'adénocarcinome du poumon [79]. L'activation en continu de l'EGFR et de la voie de signalisation qui en découle agit alors en faveur de la survie, de la prolifération et de l'adhésion cellulaire. L'activation de l'EGFR aboutit alors à l'activation préférentielle de deux voies de signalisation : la voie PI3K/AKT (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase et v-akt murine thymoma viral oncogene respectivement*) et la voie STAT3/STAT5 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3 et 5 respectivement*) [80].

#### 2.4.1.2 La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK :

L'activation de la voie RAS/RAF/MEK/MAPK est fréquente dans le cas du cancer du poumon [81]. Cette voie de signalisation est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose telle que présentée en figure 1 [77]. Dans 20% des cas de cancer du poumon, particulièrement dans le cas de l'adénocarcinome pulmonaire, c'est une mutation activant l'oncogène KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) qui est à l'origine de l'activation de cette voie [81]. Par ailleurs, 90% des mutations occurrent dans un cancer du poumon, sont localisées au niveau du gène KRAS. La mutation de ce gène aboutit à l'activation constitutive de voies de signalisation en aval de la voie RAS/RAF/MEK/MAPK, à savoir PI3K et MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), conférant alors à la cellule tumorale, une indépendance vis-à-vis de la signalisation via l'EGFR. Les mutations de KRAS sont dites mutuellement exclusives des mutations de l'EGFR et de l'ERBB2 [82]. BRAF (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*), l'effecteur direct de RAS, est également la cible de mutations, bien que celles-ci soient rares dans le cas du cancer du poumon (3%) [82]. Les mutations de BRAF sont également mutuellement exclusives des mutations de l'EGFR et de KRAS [77].

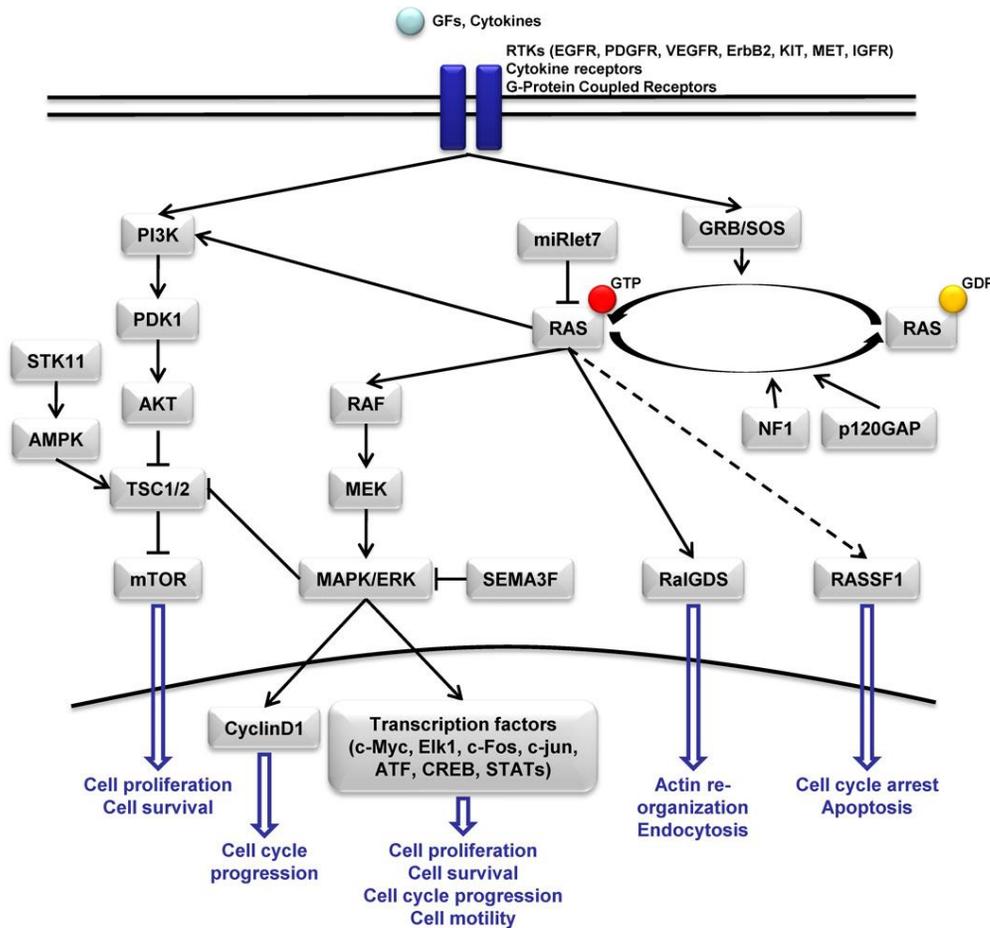


Figure 3: La voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK [77].

#### 2.4.1.3 Le gène MYC :

Le proto-oncogène MYC (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) est l'effecteur majeur de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK. Ce facteur de transcription contrôle étroitement la prolifération cellulaire via le cycle cellulaire ainsi que l'apoptose via l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. L'expression aberrante de MYC, par amplification ou surexpression, est fréquemment retrouvée dans le cas du cancer du poumon et particulièrement, le CPNPC [77].

#### 2.4.1.4 La protéine de fusion EML4-ALK :

Des translocations au sein du chromosome 2p touchant les gènes du récepteur tyrosine kinase ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) et de la protéine kinase EML4 (*Echinoderm Microtubule-associated protein like-4*) aboutissent à la formation de la protéine de fusion EML4-ALK [77]. Cette protéine de

fusion, initialement décrite dans le cas de l'adénocarcinome pulmonaire, aboutit à une signalisation mitogène persistante d'où la transformation maligne. Cette protéine est présente dans 4 % des cas de CPNPC [82]. Les mutations à l'origine de cette protéine de fusion sont mutuellement exclusives des mutations de KRAS et de l'EGFR [82].

#### 2.4.1.5 La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR :

Les PI3Ks sont des kinases lipidiques qui régulent de nombreux processus cellulaires incluant la prolifération, la survie, la mobilité et l'adhésion cellulaire. Comme présentée en figure 2, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est localisée en aval de la voie de signalisation à l'EGFR, et peut être activée par liaison de PI3K à la forme activée de RAS. L'activation de cette voie, suite à une mutation de PI3K, de PTEN, de l'EGFR, de KRAS, à l'amplification de PIK3CA, à la perte du gène suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*) ou encore à l'activation d'AKT, est un événement relativement précoce de la tumorigenèse pulmonaire [83]. L'activation de cette voie aboutit en effet, à la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose. mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est une kinase effectrice d'AKT, impliquée dans la régulation de la croissance la mobilité et la survie de la cellule tumorale [77].

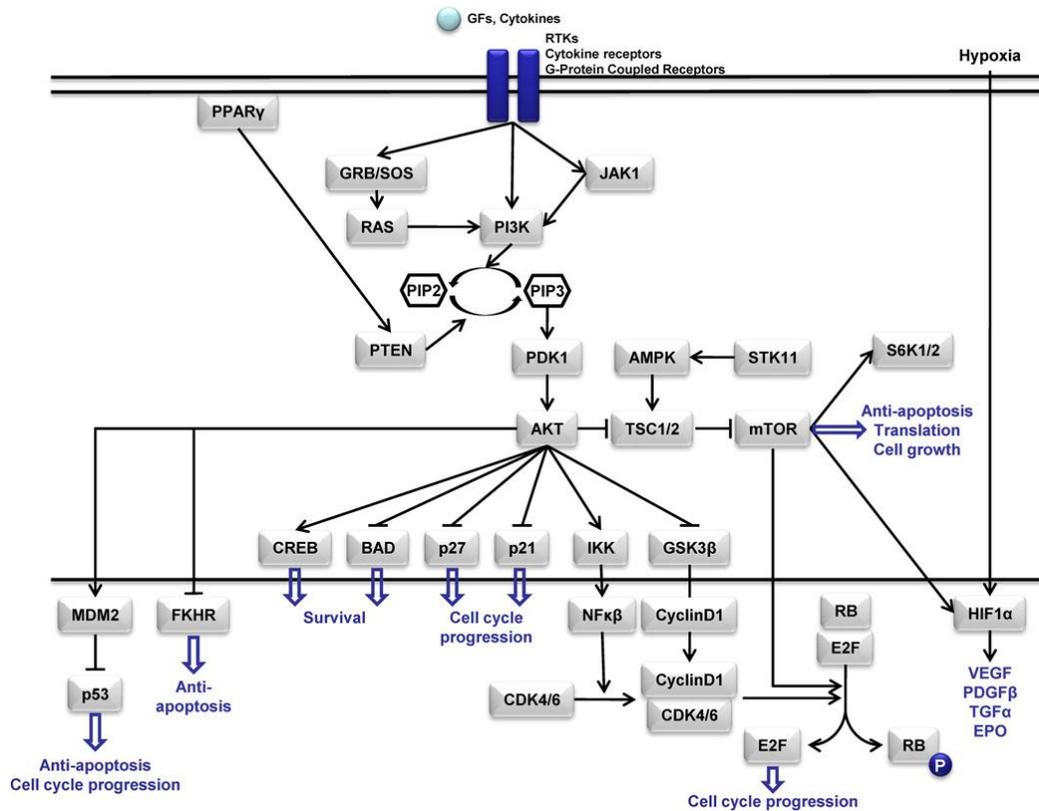


Figure 4: La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR [77].

#### 2.4.1.6 Les oncogènes SOX2 et NKX2-1 :

SOX2 (*sex determining region Y-box2*) et NKX2-1 (*NK2 homeobox1*), aussi appelé TTF1 (*homeobox transcription factor TTF1*), sont des cibles d'amplification spécifique du sous-type histologique de CPNPC [77]. En effet, l'amplification de SOX2 est spécifique aux cas de carcinome épidermoïde du poumon pour lequel il contrôle, normalement, le développement squameux de l'œsophage [77]. NKX2-1 est un facteur de transcription normalement impliqué dans la morphogénèse pulmonaire et la formation des cellules bordant les alvéoles pulmonaires, à savoir les pneumocytes de type II. Le rôle oncogénique de NKX2-1 est controversé et des études *in vivo* lui confèreraient également le rôle de suppresseur de tumeur [77].

#### 2.4.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs et les voies d'inhibition de la croissance :

Outre l'activation et la surexpression d'oncogènes particuliers, la carcinogénèse pulmonaire implique la perte de fonctionnalité d'une autre catégorie de gènes, les gènes suppresseurs de tumeurs.

#### 2.4.2.1 La voie de signalisation P53 :

P53 est une phosphoprotéine, codée par le gène TP53 (*Tumor Protein p53*), qui en réponse à un stress cellulaire, induit l'expression de gènes codant pour les inhibiteurs des kinases cyclines-dépendantes, responsables de la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, comme présenté en figure 3. Ces inhibiteurs des CDKs (*Cyclin-Dependant Kinase*) sont donc capables d'induire soit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 avec réparation de l'ADN soit l'orientation de la cellule vers l'apoptose. P53 prévient donc, en temps normal, l'accumulation des dommages de l'ADN des cellules filles. Les mutations de TP53 à l'origine de son inactivation font partie des altérations génétiques les plus fréquentes du cancer du poumon [84]. Des mutations ponctuelles de TP53 seraient également corrélées à un phénotype particulièrement agressif de cancer du poumon [77].

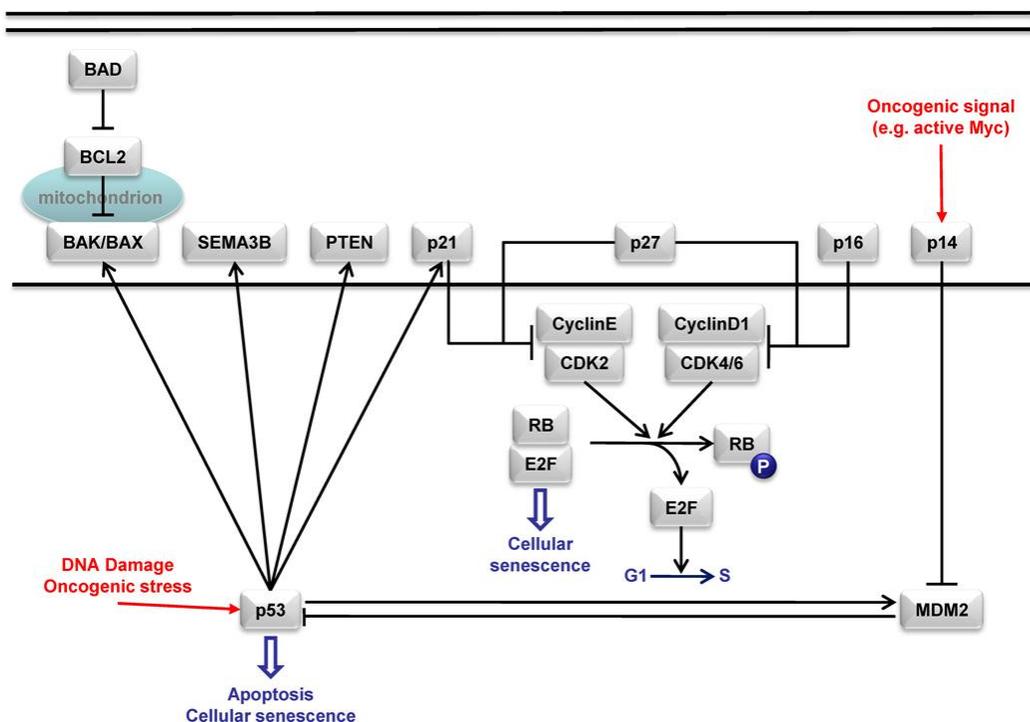


Figure 5 : Les voies de signalisation P53 et RB [77].

#### 2.4.2.2 La voie de signalisation CDKN2A/RB :

Cette voie contrôle la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. En effet, par liaison de sa forme hyperphosphorylée avec le facteur de transcription E2F3, la protéine RB induit un arrêt de la transition entre la phase G1 et la phase S (cf. figure 3). Dans 10 à 15% des cas de

CPNPC, la protéine RB (*retinoblastoma*) est absente ou mutée [85]. En revanche, la régulation anormale de l'état de phosphorylation de cette protéine et des anomalies de la protéine p16, codée par le gène CDKN2A (*Cyclin-Dependant Kinase inhibitor 2A*) sont fréquentes dans cas du CPNPC [82].

#### 2.4.2.3 Les gènes FHIT, RASSF1A, SEMA3B et TUSC2 :

FHIT (*Fragile Histidin Triad*), RASSF1A [*Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1*] TUSC2 (*Tumor Suppressor Candidate 2*) et SEMA3B [*Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B*] seraient impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire, qu'ils ralentiraient. FHIT induirait l'apoptose, tout comme RASSF1A qui régulerait également le cycle cellulaire [86]. C'est par inhibition des tyrosines kinases EGFR, PDGFR et AKT entre autre, de même que l'inhibition de la dégradation de p53, que TUSC2 exercerait son rôle de gène suppresseur de tumeur [87]. Ces gènes sont localisés sur le chromosome 3p, dont la perte d'une des deux copies est retrouvée dans presque tous les cas de cancer du poumon (96%) en plus de la méthylation des promoteurs de ces gènes, ce qui aboutit à une diminution de leur expression [88].

#### 2.4.2.4 Le gène STK11 :

Le gène STK11 (*serine/threonine kinase 11*) code pour une kinase régulatrice du métabolisme, de la polarité, de la motilité et de la différenciation cellulaire donc agirait sur la capacité d'une tumeur à métastaser. SKT11 fonctionnerait à titre de suppresseur de tumeur par inhibition de la voie de signalisation impliquant mTOR, décrite plus haut [89, 90]. Une mutation de ce gène est la plupart du temps, corrélée avec l'activation de l'oncogène KRAS, induisant la croissance de la cellule tumorale. Il s'avère en outre que l'inactivation de ce gène suppresseur de tumeur survient dans 30% des cas de cancer du poumon, particulièrement dans le sous-type non-à-petites cellules [90].

#### 2.4.3 La stimulation de l'angiogenèse :

Le processus de cancérogenèse pulmonaire induit la création de nouveaux vaisseaux sanguins susceptibles d'apporter nutriments et oxygène à la tumeur primitive. Ce processus appelé angiogenèse requiert des facteurs de croissances comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Celui-ci joue un rôle d'inhibiteur de l'apoptose ainsi que de promoteur de la survie, de la

croissance et de la migration cellulaire [91]. L'hypoxie tumorale et l'activation d'oncogènes stimule la signalisation via le VEGF, dont l'expression fortement augmentée, est corrélée avec un mauvais pronostic de CPNPC [92].

#### 2.4.4 L'activation de la télomérase :

La télomérase est une enzyme agissant sur le raccourcissement de l'extrémité des chromosomes, les télomères, à chaque division cellulaire. Dans une cellule normale, l'expression de la télomérase est mise sous silence ce qui permet à la cellule d'entrer en apoptose lorsque les télomères atteignent une taille critique. Dans plus de 80% des cas de cancer du poumon non-à petites cellules, la télomérase est activée et cette activation semble être relative aux événements précoces de la cancérogenèse pulmonaire [93].

### **2.5 Stratégies thérapeutiques actuelles de traitement du CPNPC :**

Le cancer du poumon est généralement l'un des cancers les plus difficiles à traiter et la maladie est toujours considérée comme incurable. Il existe trois stratégies thérapeutiques utilisées dans le traitement du cancer du poumon : la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Leur emploi dépend de différents critères propres au type de cancer présenté par le patient incluant le stade de la maladie et la présence de métastases. L'emploi de ces stratégies offre une alternative thérapeutique intéressante mais comporte un certain nombre d'effets secondaires, sans compter leur efficacité limitée.

#### 2.5.1 La chirurgie :

La chirurgie est la seule stratégie thérapeutique capable de l'éradication complète de la maladie , uniquement lorsque celle-ci est prise dans ses stades les plus précoces soit, les stades I, II voire IIIa, c'est-à-dire, lorsque la tumeur reste localisée, sans qu'il y ait atteinte des ganglions broncho-pulmonaires [94]. De plus, l'emploi d'une chirurgie implique un curtage ganglionnaire, et une chirurgie plus agressive allant de la lobectomie (ablation d'un ou plusieurs lobes pulmonaires) à la pneumonectomie (ablation du poumon entièrement) responsables de complications fréquentes, comme une diminution définitive de la capacité respiratoire du patient sans compter la probabilité de récurrence du cancer [94].

### 2.5.2 La radiothérapie :

La radiothérapie est l'emploi de rayons ou faisceaux de particules énergétiques dans le traitement localisé d'une tumeur de cancer du poumon [95]. L'irradiation utilisée est focalisée directement sur la zone envahie par les cellules cancéreuses et leur environnement cellulaire immédiat. Ce dernier, constitué de cellules saines, est également atteint lors de l'emploi de cette stratégie thérapeutique. On considère toutefois que cette atteinte est non-significative puisque les cellules saines possèdent la capacité de se réparer suite à ce dommage, propriété absente dans le cas des cellules cancéreuses. La focalisation des rayons sur la zone tumorale présente un certain nombre de risques pour la santé du patient puisque les mouvements de la cage thoracique liés à la respiration peuvent être indirectement responsables d'atteinte des organes sous-jacents ou avoisinant la tumeur. La radiothérapie est également à l'origine de nombreux effets secondaires incluant des douleurs œsophagiennes et des irritations cutanées. Il s'avère en outre, que la radiothérapie ne peut être utilisée seule en traitement d'un cancer du poumon, on la considère davantage comme un adjuvant utilisé en combinaison avec la chimiothérapie ou après une chirurgie [96, 97].

### 2.5.3 La chimiothérapie :

#### 2.5.3.1 *Classification des agents anticancéreux :*

Les cellules cancéreuses possèdent une capacité de croissance à l'infini et un rythme de division rapide, ainsi, la plupart des agents anticancéreux agissent par interférence avec la mitose et la réplication de l'ADN. On trouve également des agents agissant par stimulation de l'apoptose, processus altéré au cours de la carcinogénèse pulmonaire.

Il existe en fait deux catégories d'agents anticancéreux subdivisées en sous-catégories [59]. La première catégorie concerne les agents interagissant directement avec l'ADN dont ils inhibent la réplication et la transcription [98]. Cette catégorie est subdivisée en 3 sous-catégories : les agents électrophiles qui induisent une réaction d'alkylation des bases nucléiques, les agents intercalants qui s'insèrent entre ou à l'intérieur des brins de la double hélice d'ADN et les agents scindants qui se comportent comme des endonucléases et induisent des cassures multiples des brins d'ADN [98]. La seconde catégorie concerne les agents interagissant de façon indirecte avec l'ADN. Cette catégorie est subdivisée en 3 sous-catégories : les agents interagissant avec le cycle cellulaire, les agents

inhibant la prolifération cellulaire et les agents induisant l'apoptose des cellules cancéreuses. Les agents interagissant avec le cycle cellulaire agissent sur les différentes phases du cycle cellulaire, la période de repos comprenant la phase G0 et la période active constituée des phases G1 (présynthèse des acides nucléiques), S (synthèse des acides nucléiques et réplication de l'ADN), G2 (intervalle pré-mitotique avec poursuite de la synthèse de l'ADN et des protéines) et M (mitose) [98]. Ils peuvent par exemple interagir avec la phase S de synthèse et de réplication de l'ADN. C'est le cas des antifolates, des antimétabolites structurellement proches des bases puriques ou pyrimidiques et des inhibiteurs des topoisomérases [59]. Parmi les agents interagissant avec le cycle cellulaire, on trouve enfin les agents antimitotiques qui inhibent la formation du fuseau mitotique ou le rendent non-fonctionnel, et de cette façon empêchent le processus de division des cellules cancéreuses par mitose [59]. Les agents inhibant la prolifération des cellules cancéreuses interfèrent avec la voie de signalisation des *Mitogen Activated Proteins Kinases*(MAPK) situées en aval des récepteurs aux différents facteurs de croissance indispensable à la prolifération cellulaire [98, 99]. Enfin, la 3ème catégorie d'agents anticancéreux interagissant de façon indirecte avec l'ADN regroupe les agents qui interfèrent directement avec la voie extrinsèque (activation spécifique de la caspase 8) ou la voie intrinsèque (activation spécifique de la caspase 9 et relargage du cytochrome C vers le milieu intracellulaire) de l'apoptose, ayant pour conséquence la mort des cellules cancéreuses [59].

#### 2.5.3.2 *Agents anticancéreux usuels et potentiel des produits naturels en chimiothérapie du CBNPC:*

Les stratégies actuelles utilisées en chimiothérapie du CBNPC mettent en œuvre des composés seuls ou en synergie avec d'autres composés. Ces stratégies sont utilisées dans le traitement des stades avancés de CBNPC (stade III ou IV) [100].

**Tableau 1: Agents anticancéreux utilisés en chimiothérapie du CPNPC.**

Nom de la molécule	Début d'utilisation	Classe	Mode d'action	Références
Carboplatine	1989	agent électrophile	Fixation à la guanine de l'ADN et de l'ARN : déroulement et raccourcissement de l'ADN	[101]
Cisplatine	1979	agent électrophile	(idem carboplatine)	[101]
Docétaxel	1996	taxane antimitotique	Formation d'un fuseau mitotique non-fonctionnel par stimulation de la polymérisation des microtubules	[102]
Paclitaxel	1993	taxane antimitotique	(idem docétaxel)	[103]
Etoposide	1975	agent interagissant avec le cycle cellulaire	Action sur la phase S du cycle cellulaire (inhibition de la topoisomérase de type II)	[104]
Gemcitabine	1996	antimétabolite analogue des pyrimidines	Inhibition de la synthèse de l'ADN et de ses mécanismes de réplifications	[105]
Vinorelbine	1989	alcaloïde de la pervenche antimitotique	Inhibition de la polymérisation des microtubules constitutifs du fuseau mitotique et arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M	[106]

De façon générale, les agents anticancéreux agissent spécifiquement sur les cellules à croissance rapide, c'est-à-dire, les cellules cancéreuses mais également les cellules saines de la moelle osseuse, du tractus digestif et des follicules pileux. Ainsi, l'inconvénient majeur de l'emploi d'agents

anticancéreux réside dans leur capacité à induire des effets secondaires chez le patient incluant l'immunosuppression, des troubles gastro-intestinaux comme les vomissements, une chute des cheveux ainsi qu'une hépatotoxicité et une toxicité rénale [107]. L'autre inconvénient important de l'emploi d'agents anticancéreux est l'apparition d'un phénomène de résistance (primaire ou acquise) au médicament le rendant inefficace [99].

Parmi les agents anticancéreux utilisés dans le CPNPC présentés dans le tableau 1, trois sont des produits d'origine naturelle. La vinorelbine, ou navelbine, est en effet un alcaloïde issu de la pervenche [108]. Le paclitaxel et le docétaxel sont respectivement produits par extraction-isolation ou par dérivation de taxanes provenant de certaines espèces d'if telles que *Taxus canadensis*, *Taxus baccata* et *Taxus brevifolia* [109, 110]. Par ailleurs, il a été montré que la rapamycine, un macrolide produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* [111], inhibait la croissance et la prolifération de cellules du CPNPC [112]. Finalement, le temsirolimus, un inhibiteur de la protéine mTOR dérivé de la rapamycine, a été approuvé en 2007 par la FDA concernant le traitement des cancers du rein avancés [113]. Depuis cette date, 12 nouveaux dérivés de produits naturels ont été approuvés pour le traitement de différents types de cancers tels que le cancer du sein, le cancer du rein mais aussi le CPNPC [114]. Considérer les produits naturels comme réservoirs d'anticancéreux potentiels semble donc être une stratégie chimiothérapeutique intéressante pour le CPNPC.

En effet, plusieurs composés dérivants de produits naturels ont été approuvés ou ont démontré une efficacité probante *in vivo* sur des modèles de souris porteuses de tumeurs de différents types de cancer. A titre expérimental, il a été observé que la romidepsine, un penta-peptide aussi appelé FR901228 extrait de la bactérie *Chromobacterium violaceum*, exhibait une activité anti-tumorale potentielle *in vivo*, sur des souris porteuses de tumeurs de cancer du sein MCF-7 mais également sur un modèle de souris porteuses de tumeurs d'adénocarcinome pulmonaire (A549) [115]. Il a été démontré par la suite, que la romidepsine agissait à titre de pro-drogue, en tant qu'inhibiteur des histones désacétylases 1 et 2, ces enzymes régulant une variété de processus cellulaires par modulation de l'expression génique [116]. Le Kanglaite, une forme injectable d'un extrait d'une plante médicinale chinoise, *Semen coicis*, est utilisé dans le traitement du CPNPC en Russie et en Chine, et fait depuis l'objet d'essais cliniques aux États-Unis [117].

Une attention particulière a également été accordée aux produits naturels issus du genre *Helleborus*, une Ranunculaceae comprenant environ 20 espèces réparties en Europe et en Asie. Il a été suggéré que les composés isolés à partir de ce genre possédaient des propriétés antitumorales et cytotoxiques. Plusieurs études mettent ainsi en évidence le potentiel chimiothérapeutique d'un groupe important de stéroïdes cardiotoniques issus de ce genre, les bufadiénolides [118, 119], isolés aussi bien à partir des animaux que des plantes [120, 121]. Il a en effet été montré que les bufadiénolides extraits des rhizomes d'*Helleborus orientalis* exhibaient une cytotoxicité particulièrement élevée contre les cellules cancéreuses, soit contre des cellules de mélanome humain (A375), des cellules de carcinome squameux (CSH-2) et des cellules d'hépatome humain (HepG2), en comparaison de la cytotoxicité exhibée pour des cellules normales humaines (HPC) [122-124]. Il a également été constaté que les hellethionines, une famille de thionines découvertes dans les racines d'*Helleborus purpurascens*, présentaient des propriétés cytotoxiques et étaient susceptibles d'agir à titre d'immunotoxines en soutien d'une thérapie antitumorale [125]. Il a aussi été démontré que des extraits polyphénoliques issus de cette espèce d'*Helleborus* exhibaient des effets cytostatiques et cytotoxiques contre des cellules d'adénocarcinome cervical humain (HeLa) [126]. Récemment, il a été prouvé par test colorimétrique MTT, que l'hellebrine isolée à partir d'*Helleborus purpurascens*, et sa forme aglycone, l'hellebrigénine, inhibaient la croissance d'un large éventail de lignées cellulaires cancéreuses humaines: les ACHN (carcinome rénal), les SF-268 et SNB-75 (gliome), les MCF-7 (cancer du sein), les SKMEL-5 (mélanome), les HCT-116 et HT-29 (cancer du côlon), les TK-10 (cancer du rein), les Ovcar-3 et -4 (ovaire cancer) et les A549 (cancer non-à-petites cellules du poumon) [127]. Dans la même idée, Lindholm et al. ont montré que des extraits issus d'*Helleborus cyclophyllus* possédaient des propriétés antitumorales et cytotoxiques contre des cellules cancéreuses de leucémie, du myélome, du lymphome, de l'adénocarcinome rénal et du cancer du poumon à petites cellules [128]. Un extrait aqueux provenant d'une autre espèce d'*Helleborus*, *Helleborus Niger*, a également été testé concernant son éventuelle cytotoxicité sur des cellules de lymphome, de leucémie et de mélanome [129]. L'étude a révélé que la forte inhibition de la prolifération des cellules de tumeurs hématologiques malignes résultait de l'induction de l'apoptose spécifiquement via l'activation de la caspase-3. La bioactivité d'extraits issus d'*Helleborus bocconei* ssp. *Intermedius* a également été testée et il a été montré que deux saponines, les helleborosides A et B, isolées à partir de cette espèce, inhibaient entre 60 et 70 % de la croissance de cellules de gliome de rat [130]. Dans une étude similaire, Cakar et al. ont montré l'efficacité d'extraits de racines de

deux autres espèces d'*Helleborus*, *Helleborus multifidus* Vis et *Helleborus hercegovinus* Martini, en terme d'activité antiproliférative, contre des cellules de lymphome de Burkitt à cellules B (BJAB) [131]. Plus récemment, il a été rapporté que de nouveaux bufadiénolides isolés à partir des rhizomes d'*Helleborus thibetanus* présentaient des effets cytotoxiques contre deux lignées cellulaires de cancer de la prostate, DU145 et PC3 [132]. Cette espèce était déjà connue pour sa relative cytotoxicité à l'égard des cellules d'adénocarcinome du sein, les MCF-7, des cellules d'hépatocarcinome humain, les QGY-7701, des cellules de cancer gastrique humain, les BGC-823 et des cellules de cancer pulmonaire de Lewis, les LLC [133]. Enfin, concernant *Helleborus caucasicus*, Muzashvili et al. ont démontré que des extraits alcooliques issus des racines et rhizomes de cette espèce exhibaient une forte cytotoxicité contre des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, des cellules de cancer de la prostate et des fibroblastes normaux de peau humaine [134]. *Helleborus* semble donc bien être un genre prometteur en termes de développement d'agents anticancéreux à partir de produits d'origine naturelle.

#### 2.5.3.3 La thérapie ciblée :

L'emploi d'agents anticancéreux classiques utilisés dans le traitement du CPNPC occasionne de nombreux effets secondaires et leur efficacité est limitée de par leur manque de spécificité. Le CPNPC reste donc à ce jour une maladie incurable. La détermination des altérations génétiques et moléculaires propres à un sous-type particulier de CPNPC décrites plus haut introduit la notion de thérapie ciblée permettant de traiter de façon plus efficace les différents sous-types de la maladie [135].

À ce titre, Le bévacicumab est un anticorps monoclonal murin humanisé possédant une forte spécificité et affinité pour le VEGF-A dont il bloque la liaison au récepteur VEGFR1, par fixation à l'extrémité extracellulaire de ce dernier [136]. De cette façon, le bévacicumab. inhibe l'angiogenèse et limite la prolifération tumorale. L'utilisation en association avec le carboplatine et le paclitaxel du bévacicumab, commercialisé sous le nom d'Avastin®, a été approuvée en 2006 par la FDA (*Food and Drug Administration*) comme traitement de première ligne des cas de CPNPC de stades IIIb et IV, non opérables et dépourvus de composante épidermoïde [137]. Cette approbation reposait sur l'amélioration significative de la survie globale de 10,3 à 12,3 mois en moyenne chez les individus traités [137] même s'il a été constaté que l'emploi de cette thérapie occasionnait des effets

secondaires graves voir mortels chez les patients à savoir, des hémorragies pulmonaires ou gastro-intestinales et des infarctus du système nerveux ou du myocarde [137].

Bien que le bévacizumab soit à ce jour le seul agent anticancéreux de thérapie ciblée approuvé pour son utilisation dans le traitement du CPNPC, d'autres composés sont en cours d'évaluation préclinique et clinique pour leur éventuelle approbation dans le traitement de cette maladie chez l'humain. Dans cette optique, il a été montré que le sorafénib, un inhibiteur des tyrosines kinases, était capable de bloquer la prolifération cellulaire par inhibition de l'activité des kinases BRAF et FLT-3 mais également de limiter l'angiogenèse en ciblant le facteur de croissance VEGF et le récepteur au PDGF [138]. Dans la même catégorie, citons également le gefitinib et l'erlotinib, des inhibiteurs de tyrosine kinase du récepteur au facteur de croissance épidermique, capable de limiter la prolifération cellulaire [139]. Le crizotinib, un inhibiteur du proto-oncogène MET et du récepteur tyrosine kinase ALK semble être également une stratégie curative intéressante concernant les cas de CPNPC présentant des translocations aboutissant à la formation de la protéine de fusion EML4-ALK [140]. L'emploi de l'imetelstat, un oligonucleotide antisens ciblant spécifiquement l'ARN de la télomérase humaine semble être également une alternative thérapeutique intéressante [141]. L'efficacité de l'emploi du LY294002, un agent thérapeutique ciblant spécifiquement la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, a été montrée aussi bien dans le cas du CPNPC que dans le cas du CPPC lorsque ceux-ci présentent une activation récurrente de la voie via AKT [142, 143].

## SECTION II ÉTUDE DE SAM68 DANS DIVERS PROCESSUS BIOLOGIQUES ET IMPLICATIONS SUBSÉQUENTES DANS LE CANCER CHEZ L'HOMME

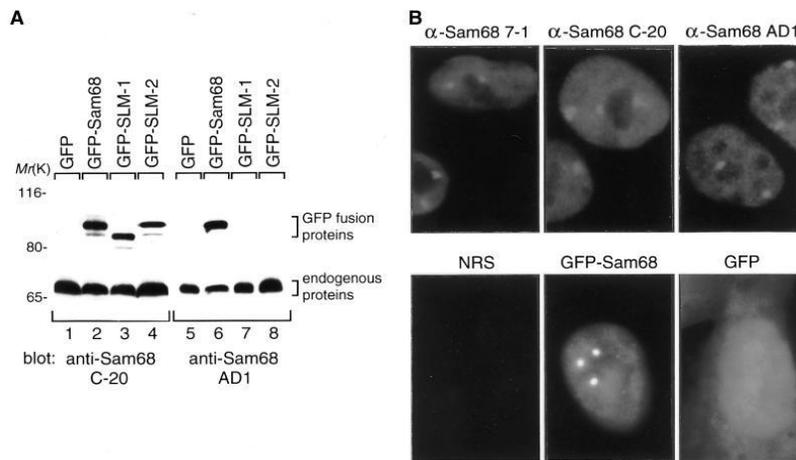
### 1 Généralités concernant SAM68 :

#### 1.1 Affiliation de la protéine :

SAM68 (*Src-associated during mitosis*, 68kDa) [144] est une protéine à l'expression ubiquitaire appartenant à la famille de protéines de liaison à l'ARN, les STAR (*Signal transducer and activator of RNA*) dont les membres sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires ainsi que dans divers aspects du métabolisme de l'ARN allant de l'épissage alternatif à la traduction en protéines [145]. Cette famille de protéines est très conservée au cours de l'évolution (de la levure à l'homme) [146]. On considère par ailleurs que SAM68, comme d'autres membres des STAR (ex : *Splicing factor 1*), est un prototype protéique de STAR en raison de la multitude de modifications post-traductionnelles qu'elle subit (sumoylation, acétylation, arginine-méthylation et phosphorylation) [145].

#### 1.2 Localisation subcellulaire :

Pour les cellules cancéreuses, SAM68 présente une distribution globalement nucléoplasmique mais est également concentrée au sein d'organelles sphériques, fibreuses, riches en acides nucléiques (ARN majoritairement) et en protéines, appelée corps nucléaires SAM68/SLM (SNBs), comme présenté en figure 4 [147]. Il s'agit de structures dynamiques, changeantes, en réponse à divers stimuli ou en fonction du processus cellulaire engagé. En effet, les SNBs sont désassemblés au cours la mitose ou en réponse à une stimulation par des inhibiteurs de la transcription [147]. Une cellule compte deux à trois SNBs au niveau de son noyau. Les SNBs mesurent moins de 1  $\mu\text{m}$  et sont localisés à proximité des nucléoles [146-148]. Les *SAM-like mammalian proteins* SLM-1 et -2, protéines possédant 70% d'homologie de séquence avec le domaine GSG de SAM68, sont également localisées dans les SNBs [147].



**Figure 6 : Localisation de SAM68 dans les SNBs [147].** Après avoir généré un anticorps anti-SAM68 dit « AD1 », Chen et al. en ont montré la spécificité envers SAM68. En effet, après immunobuvardage de type *Western* de lysats issus de cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression encodant pour la protéine de fusion GFP-SAM68, l'anticorps AD1 détectait bien la présence de SAM68 (colonne 6). L'anticorps AD1 ne détectait en revanche, ni SLM-1 ou SLM-2, dans les lysats issus de cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression encodant pour les protéines de fusion GFP-SLM-1 ou GFP-SLM-2 (colonne 7 et 8 respectivement) (A). Pour déterminer la localisation cellulaire de SAM68, des cellules HeLa immunomarquées avec des anticorps primaires anti-SAM68 7-1, anti-SAM68 C-20, anti-SAM68 AD1 ou encore anti-NRS (sérum normal de lapin) ont été exposées à des anticorps secondaires couplés à la rhodamine (un composé fluorescent) puis observées par microscopie à fluorescence. Dans le même objectif, des cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour la protéine de fusion GFP-SAM68 ou GFP seule ont été observées selon la même technique. Chen et al. ont montré que la distribution de la fluorescence associée aux cellules HeLa immunomarquées avec des anticorps primaires anti-SAM68 7-1 et anti-SAM68 AD1 mais également dans les cellules HeLa transfectées avec des vecteurs d'expression codant pour la protéine de fusion GFP-SAM68 résultait en 2 à 5 corps nucléaires définis, les SNBs (B).

De façon générale, la localisation subcellulaire de SAM68 ainsi que ses fonctions et son affinité pour l'ARN, sont sévèrement modulées par les modifications post-traductionnelles que la protéine subit et en fonction des nombreuses voies de signalisation auxquelles la protéine prend part.

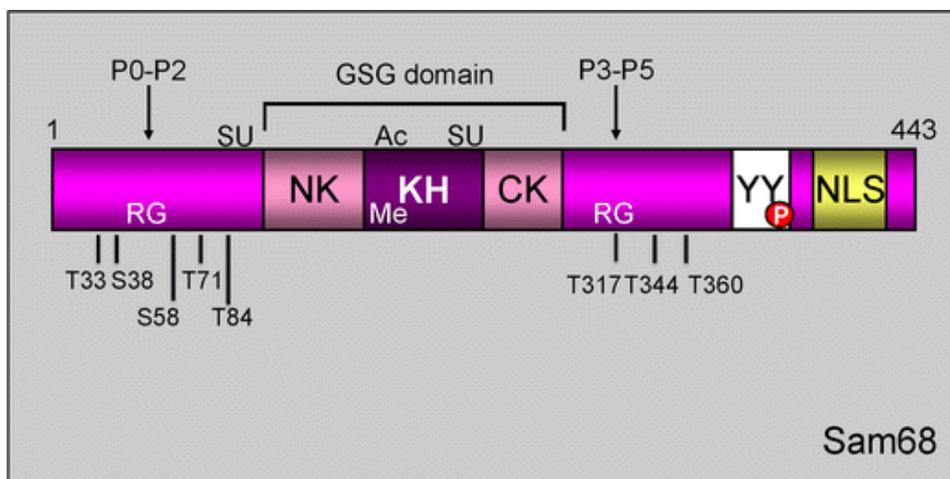
### 1.3 Structure de SAM68, et modifications post-traductionnelles associées:

SAM68 ou KHDRBS1 est constituée de 443 acides aminés et est codée par un gène (KHDRBS1) pour *KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 1*, ou plus simplement SAM68 [149, 150]), situé sur le chromosome 1p32, soit, au niveau de la 2<sup>ème</sup> bande de la 3<sup>ème</sup> région du bras court du chromosome 1 [145].

D'un point de vu structurel, SAM68, comme bien d'autres protéines STAR, possède un domaine d'homologie KH (*hnRNP-K homology*) inclut dans un plus vaste domaine de 200 acides aminés, le domaine GSG (GRP33/SAM68/GLD-1) nécessaire à l'homodimérisation de la protéine [151-153]. Ce dernier confère à la protéine ses propriétés de liaison à l'ARN [154]. Ce sont les parties N- et C-terminal du domaine KH de SAM68, respectivement QUA1 (ou NK pour *N-terminal of KH*, 80 acides aminés) et QUA2 (ou CK pour *C-terminal of KH*, 30 acides aminés) qui en permettent l'homodimérisation [145] donc rendent la protéine fonctionnelle (ex : régulation de l'épissage alternatif). Chaque monomère est constitué de deux hélices  $\alpha$  liées par une courte boucle, et arrangées perpendiculairement l'une par rapport à l'autre dans une structure inhabituelle à 4 hélices [155]. Le domaine KH constitue le premier domaine fonctionnel de SAM68.

Les régions QUA1 et QUA2 sont des régions régulatrices, sites des modifications post-traductionnelles citées plus haut (méthylation, sumoylation, acétylation) affectant la protéine (ex: acétylation des résidus lysine de QUA1) ainsi que ses fonctions et sont nécessaires aux interactions protéine-protéines [156].

Comme présenté en figure 6, SAM68 contient six domaines riches en proline. On dénombre trois régions riches en proline (P0 à P2) en N-terminal de la protéine et trois autres régions (P3 à P5), localisées en C-terminal de SAM68. Elles permettent son interaction avec des protéines à domaine SH3 (*Src homology 3*) [149] et WW (aussi connu sous le nom de *rsp5-domainou WWP repeating motif*) [157, 158] telles que FBP21 et FBP30 [159], des protéines de liaison à la formine (protéine de nucléation initiant la polymérisation de l'actine G en micro-filaments).



**Figure 7: Représentation structurale schématique de SAM68 [86].**

Le domaine C-terminal de SAM68 est riche en résidus tyrosine (domaine « YY »), sites de phosphorylation par de nombreuses kinases (interaction de SAM68 avec les domaines SH3 et/ou SH2 de ces dernières) [149, 151, 160]. Outre les résidus tyrosine, les résidus sérine et thréonine de SAM68 sont également le site de phosphorylation [161].

Le deuxième domaine fonctionnel de SAM68 est constitué par les régions riches en glycine et en arginine (« RGG ») localisées en N- et C-terminal du domaine GSG [154]. Ces régions sont le site de méthylation. SAM68 contient une séquence signal de localisation nucléaire NLS (*Nuclear localization Signal*) inclut dans les 24 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminal de la protéine [162]. SAM68 reconnaît les séquences bipartites d'ARN auxquelles il se lie en raison de sa forte affinité pour les séquences riches ribonucléotides poly-U [144] et poly-A [163].

## **2 Rôles de SAM68 dans divers processus biologiques :**

Les implications générales de la protéine SAM68 en termes de processus biologique, sont les suivantes : transcription et épissage alternatif des pré-ARNm, transduction du signal et signalisation intracellulaire par interactions avec une variété de protéines différentes. Ces protéines agissent sur la structure même de SAM68 en modulant ainsi l'activité à différents niveaux cellulaires et dans de nombreux processus biologiques et pathologiques comme le cancer. L'objectif de cette section n'est pas de lister la totalité des interactions et interventions possibles de SAM68 mais plutôt de mettre en

exergue certains faits intéressants concernant la protéine à un niveau cellulaire physiologique et d'introduire son intervention à un niveau cellulaire pathologique, soit le cancer chez l'Homme.

### **2.1 SAM68 : mitose et régulation du cycle cellulaire :**

Au cours de la mitose, SAM68 est phosphorylée par la tyrosine kinase Src [144]. Afin de préciser le degré d'importance de cette interaction, Pillay et al. montrent que l'emploi de radicicol, un inhibiteur de Src, inhibait de façon réversible la tyrosine-phosphorylation mitose-spécifique de SAM68 chez des fibroblastes Src-transformés mais n'affectait pas la capacité de ces cellules à entrer en mitose [164]. Il a cependant été montré dans la même étude que le radicicol retardait l'entrée de ces cellules en mitose.

De nombreuses études suggèrent le rôle de SAM68 dans la modulation du cycle cellulaire, et notamment au niveau des transitions entre les phases G1/S et G2/M. Il a été initialement mis en évidence que l'expression ectopique de la forme dominante négative de SAM68 (Sam68 $\Delta$ KH) par des cellules quiescentes NIH-3T3 transformées, induisait un arrêt de la progression du cycle cellulaire en G1/S par inhibition de l'expression de la cycline D1 [165]. La même année, une autre équipe indique que la thréonine-phosphorylation de SAM68 par la protéine Cdc2 (*Cell division cycle protein 2 homolog*, aujourd'hui appelée *Cyclin-dépendant kinase 1*, CDK1) pendant la mitose, permettrait la transition rapide des cellules en phase G1 [166]. Quelques années plus tard, Li et al. mettent en évidence le rôle critique joué par SAM68 dans la progression du cycle cellulaire à un autre niveau, soit au niveau de la transition G2/M, et ce indépendamment de contrôle de cette transition par l'activité du complexe cycline B/ kinase Cdc2 [167]. Ils remarquent en effet que des cellules DT40 rendues déficientes en SAM68 par disruption génique exhibent alors un retard de croissance conséquent à l'élongation de la phase G2/M et ce, bien que l'activité kinase associée à Cdc2 ne soit pas altérée. Les suppositions quant aux différentes possibilités d'intervention de SAM68 au niveau du cycle cellulaire sont listées figure 7 (partie 3 en bas à gauche).

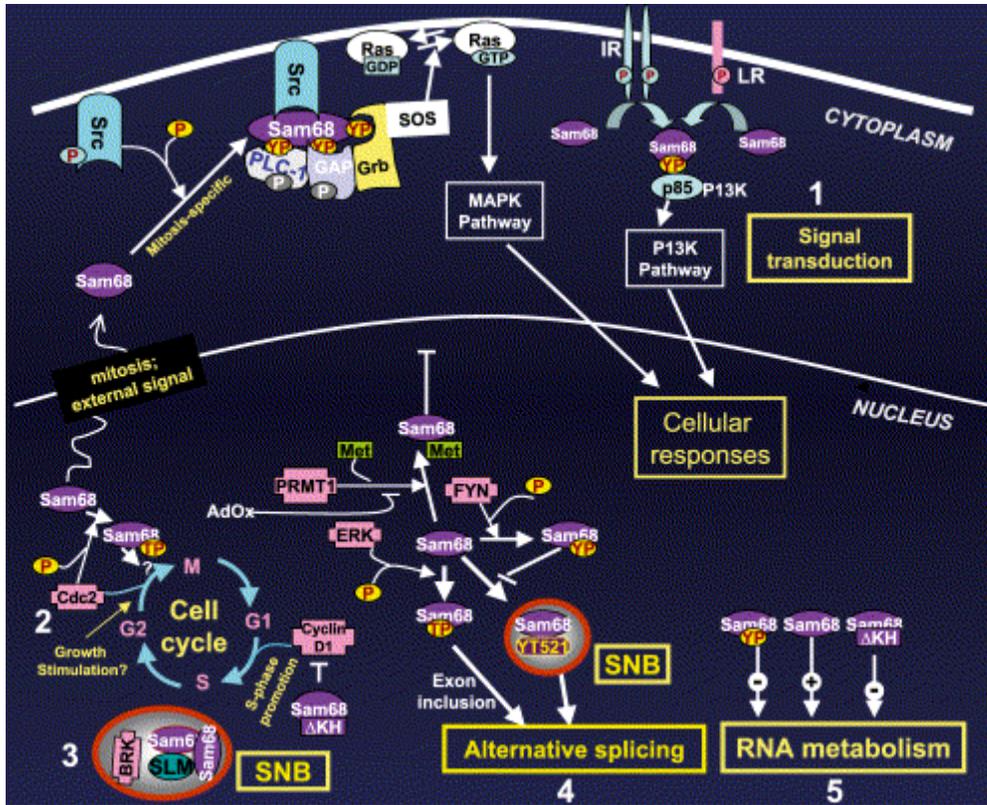


Figure 8: Représentation schématique des rôles possibles joués par SAM68 à différents niveaux subcellulaires [145].

Finalement, Taylor et al. montrent en 2004 que la surexpression de SAM68 chez des cellules murines NIH-3T3 induit l'arrêt en phase G1. Ils montrent ainsi, que l'inhibition de la transition entre la phase G1 et la phase S est consécutive d'une augmentation de répression transcriptionnelle des cyclines D1 et E par SAM68 [168]. Il a été depuis montré que la cycline D1 est une cible transcriptionnelle de SAM68 qui en diminue l'épissage alternatif, ceci chez des cellules saines mais aussi chez des cellules du cancer du sein et de la prostate [168-170].

## 2.2 SAM68 et mortalité cellulaire: apoptose et survie cellulaire :

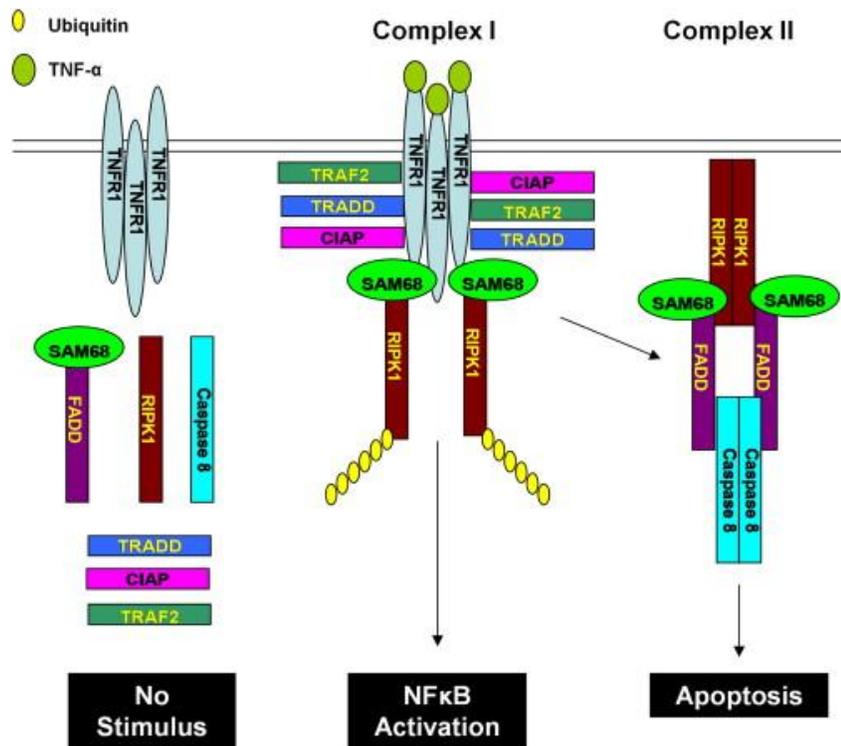
La structure modulaire de SAM68 et la multitude d'interactions protéiques associées à ses domaines fait de cette STAR, une protéine multifonctionnelle adaptatrice de la transduction du signal et donc de la signalisation intracellulaire. A l'heure actuelle, SAM68 a été impliquée dans quatre voies de signalisation pour lesquelles la protéine joue le rôle de protéine d'échafaudage:

- la voie de signalisation du TCR (*T cell receptor*, récepteur transmembranaire des lymphocytes T, reconnaissant les complexes CMH-peptide) [170-173],
- la voie de signalisation du récepteur Ob-R (récepteur à la leptine, présent chez les cellules immunitaires) [174] ,
- la voie de signalisation du récepteur à l'insuline [175],
- la voie de signalisation du TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor-  $\alpha$* , une cytokine capable d'induire soit la mort soit la survie cellulaire) [176].

La voie du TNF- $\alpha$  est reliée à une multitude de pathologies humaines incluant le cancer. Pour induire soit la survie, soit la mort cellulaire, cette cytokine module via sa liaison au récepteur transmembranaire TNFR1 la formation de deux complexes protéiques distincts d'un point de vue spatio-temporel : le complexe I aboutissant à l'activation de NF- $\kappa$ B donc à la survie cellulaire quelques minutes seulement après la fixation du ligand au TNFR1 et le complexe II qui aboutit à la mort cellulaire par apoptose des heures après la fixation du ligand au TNFR1 [177, 178].

En effet, suite à la liaison du TNF- $\alpha$  au TNFR1, différents composants protéiques, dont les éléments du complexe I, sont recrutés au niveau du TNFR1. Ces éléments sont la protéine TRADD (*TNFR1-associated death domain protein*), la protéine TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*), les protéines cIAP1 et cIAP2 (*Cellular inhibitor of apoptosis proteins 1 et 2*) et la protéine kinase RIPK1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*) (cf. figure 8). RIPK1 est alors poly-ubiquitinylée ce qui permet la création d'une sorte de base permettant à deux complexes protéiques, de se lier et d'interagir entre eux. Le complexe formé par la TAK1 (*TGF-  $\beta$ -activated kinase 1*) ainsi que TAB2 et TAB3 (*TGF-  $\beta$ - activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2 et 3*), phosphoryle et active le deuxième complexe, IKK (*I $\kappa$ B kinase*). IKK est alors dissociée de TNFR1 et vient phosphoryler I $\kappa$ B aboutissant à la dégradation de celle-ci mais également à la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau. NF- $\kappa$ B active alors la transcription

de cytokines et de gènes de survie cellulaire, comme cIAP1 et cIAP2 ou encore FLIP (*FLICE-like inhibitory protein*) inhibant l'activation de la caspase 8 donc l'apoptose). Or, il s'avère que dans le cas présenté ci-dessus, SAM68 agirait comme une protéine d'amarrage nécessaire au recrutement au niveau du TNFR1 de RIPK1 pour laquelle elle permettrait l'ubiquitylation, et de TRAF2 et cIAP1. SAM68, par son implication dans la formation du complexe I, permettrait donc la survie cellulaire [176].



**Figure 9: Représentation schématique de l'implication de SAM68 dans la voie de signalisation du TNF-α [106].**

Dans un deuxième temps, plusieurs heures plus tard, le TNFR1 est internalisé et les composants recrutés plus haut s'en dissocient selon un mécanisme encore inconnu. RIPK1, ainsi libérée, vient alors s'associer à une protéine adaptatrice, FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*). FADD recrute alors la caspase 8 et initie ainsi la cascade de signalisation médiée par les caspases, donc la mort cellulaire par apoptose. Or, SAM68 qui constitue une protéine d'amarrage de RIPK1, interviendrait dans ce second complexe, afin d'en permettre l'association avec FADD/caspase 8. De plus, SAM68 jouerait un rôle potentiel dans l'activation de cette caspase puisque en l'absence de la

STAR, FADD et la caspase-8 formeraient un complexe inactif [176]. Selon la même étude, il s'avèrerait que SAM68 ne soit pas requis pour la voie extrinsèque Fas-induite ou la voie intrinsèque stress-induite de l'apoptose.

## **2.3 Régulation des fonctions de SAM68 par les différentes modifications post-traductionnelles affectant la protéine :**

### 2.3.1 Régulation des fonctions de SAM68 par tyrosine-phosphorylation :

L'interaction de SAM68 avec les domaines SH2 et SH3 des kinases de la famille Src est indispensable à sa tyrosine-phosphorylation. C'est d'ailleurs de cela que la protéine tire son nom puisqu'elle a été initialement identifiée comme 1<sup>er</sup> substrat de la kinase oncogénique Src au cours de la mitose [144][179]. Dans la même étude, il a également été montré que SAM68 liait les polyribonucléotides *in vitro* ce qui suggérerait que Src régulerait le métabolisme de l'ARN, via son interaction avec SAM68 [144]. La tyrosine phosphorylation de SAM68 est également consécutive de l'activation des récepteurs à l'insuline [175] et à la leptine [180] ce qui suggère que la forme phosphorylée de la protéine est impliquée dans la réponse hormonale des cellules concernées.

De façon générale, SAM68 est tyrosine-phosphorylée par de nombreuses tyrosines kinases solubles, incluant celles de la famille Src (Src, p59Fyn, Sik) [144, 179, 181], les kinases de la famille Tec (ITK et BTK [182, 183], exprimées à la surface des cellules T et B, respectivement) mais également par les kinases ZAP70 [184] (*Zeta-chain-associated protein kinase 70*, protéine exprimée à la surface des cellules T et Natural killer) et BRK[181] (*Breast tumor kinase*). Cette dernière est d'ailleurs localisée dans le noyau au niveau des SNBs, comme SAM68.

SAM68 est également phosphorylée par des protéines de signalisation comme PLC $\gamma$  (Phospholipase C $\gamma$ -1) [185, 186] ou PI3K (Phosphatidylinositide 3-kinases) [187] et des molécules adaptatrices comme NCK (*non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1*) [188] et GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) [189]. Notons aussi que la liaison de SAM68 avec les ligands CD16 (ou Fc $\gamma$ RIII, un récepteur de faible affinité de la partie constante Fc des Ig G, présent à la surface de nombreuses cellules de l'immunité), CD32 (ou Fc $\gamma$ RII, récepteur de faible affinité des IgG

complexées mais également modulateur d'activité des cellules B) et le TCR aboutit aussi à la tyrosine-phosphorylation de SAM68 [182].

De façon générale, la tyrosine-phosphorylation de SAM68 inhibe sa capacité de liaison avec l'ARN, sa capacité d'homodimérisation mais augmente son interaction avec les protéines de signalisation et induit sa redistribution à l'intérieur du noyau [163, 181, 190]. Des niveaux élevés de SAM68 phosphorylée sont également remarquables chez des lignées cellulaires issues de biopsie de patientes atteintes de cancer du sein [190] ainsi que dans le cas du cancer de la prostate [191], suggérant ainsi une activité pro-métastatique de la forme tyrosine-phosphorylée de la protéine.

### 2.3.2 Régulation des fonctions de SAM68 par sérine et thréonine phosphorylation :

SAM68 est sérine-phosphorylée au cours de l'interphase et sérine-, thréonine-phosphorylée par Cdc2 au cours de la mitose [166]. Il est possible qu'ERK1/2 (*Extracellular regulated kinases 1 and 2*), appartenant à la famille des MAPK (*Mitogen activated protein kinase*) joue un rôle dans la phosphorylation de la protéine. En effet, la stimulation des cellules T (relatives au lymphome ou leucémie à cellules T) par un ester de phorbol aboutit à la sérine-phosphorylation de SAM68 par ERK1/2 [192]. Cette phosphorylation affecte l'activité d'épissage alternatif de la protéine puisqu'elle renforce l'intégration de v5 (*variable exon 5*) dans l'ARNm de CD44 (une glycoprotéine de surface impliquée dans l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse) [192]. Or ce phénomène est également associé à la transformation néoplasique [193]. Donc la modulation de l'activité d'épissage de SAM68 via sa phosphorylation par les MAPK pourrait être considérée comme un événement relatif au cancer.

### 2.3.3 Régulation des fonctions de SAM68 par méthylation :

Les séquences RGG (riches en arginine et en glycine) de SAM68 peuvent être méthylées par l'arginine méthyltransferase 1 (PRMT1) [194]. Cette modification post-traductionnelle, irréversible dans le cas de SAM68, module l'activité de régulateur transcriptionnel (épissage alternatif) et induit un changement dans la localisation subcellulaire de la protéine [195]. En effet, la forme méthylée de SAM68 se trouve dans le noyau tandis que la forme hypométhylée se trouve dans le cytoplasme. De même, la méthylation des résidus arginine de SAM68 empêche l'interaction avec les protéines à domaine SH3 mais pas avec les protéines à domaine WW [157, 196] suggérant ainsi

que l'interaction de SAM68 avec une protéine en particulier serait dépendante de l'état de méthylation de SAM68.

La méthylation est de plus une condition *sine qua non* à la localisation nucléaire de la protéine et à sa capacité à favoriser l'export nucléaire des ARN viraux [194, 197, 198]. L'influence de la méthylation de SAM68 sur sa capacité de liaison à l'ARN n'est pas clairement établie à ce jour. Certaines études suggèrent que cette modification post-traductionnelle n'exerce pas d'influence sur cette propriété [199] chez des lignées de cellules endothéliales stimulées au peroxy-nitrite (une substance pro-athérogénique) tandis que d'autres suggèrent exactement l'inverse pour certaines cellules épithéliales modifiées (cellules 293 et 293T) [200]. La méthylation de SAM68 par PRMT1 peut également intervenir au cours de la transformation néoplasique dans le cas de leucémies [cf. sous-section 3].

#### 2.3.4 Régulation des fonctions de SAM68 par acétylation et sumoylation :

L'acétylation des résidus lysine du domaine QUA1 et la première moitié du domaine KH de SAM68 par l'acétyltransférase CBP (*CREB-binding protein*) en augmente les capacités de liaison aux ribonucléotides poly-U de l'ARN. Par ailleurs, SAM68 existe sous forme acétylée dans les cellules cancéreuses, notamment chez des lignées cellulaires de cancer du sein et cette acétylation en augmente la capacité de liaison avec l'ARN [201].

Enfin, SAM68 peut être sumoylée par la ligase SUMO-E3 PIAS1, augmentant ainsi son activité de répresseur transcriptionnel de l'expression de la cycline D1 (donc modulation du cycle cellulaire) et inhibant sa capacité d'inducteur d'apoptose [202].

De par sa structure, SAM68 semble être un acteur multifonctionnel dans de nombreux processus biologiques cellulaires (mitose, apoptose, cycle cellulaire), subcellulaires (transduction du signal, signalisation intracellulaire, métabolisme de l'ARN) mais également dans divers processus pathologiques (tumorigénèse, VIH). Les sections et sous-sections qui suivent se concentreront uniquement sur l'implication à différents niveaux de SAM68 dans le cancer chez l'Homme.

### **3 Implication de SAM68 dans le cancer chez l'Homme :**

Jusqu'à la moitié des années 2000, on pensait que le gène codant pour SAM68 était un gène suppresseur de tumeurs. En effet, certaines études montraient qu'une diminution de l'expression de SAM68 induite ainsi que l'élimination de SAM68 par *Knock Out* aboutissaient à la transformation néoplasique et au développement de tumeurs métastatiques [203]. Il s'avérait en outre, que la surexpression de SAM68 provoquait un arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1 par répression des cyclines D1 et E (effet indépendant de l'activité de liaison à l'ARN de SAM68) puis l'apoptose (effet indissociable de cette activité) [168]. Depuis, de nombreuses études concernant l'expression du gène codant pour SAM68 et de la protéine en elle-même, ainsi que ses fonctions, démontrent que pour de nombreuses lignées de cellules cancéreuses, la protéine SAM68 joue un rôle pro-oncogénique pour les cancers endocrines (cancers du sein, de la prostate, de la thyroïde) par régulation de certaines voies de transduction du signal et la modulation de l'expression de certains gènes cancer-spécifiques.

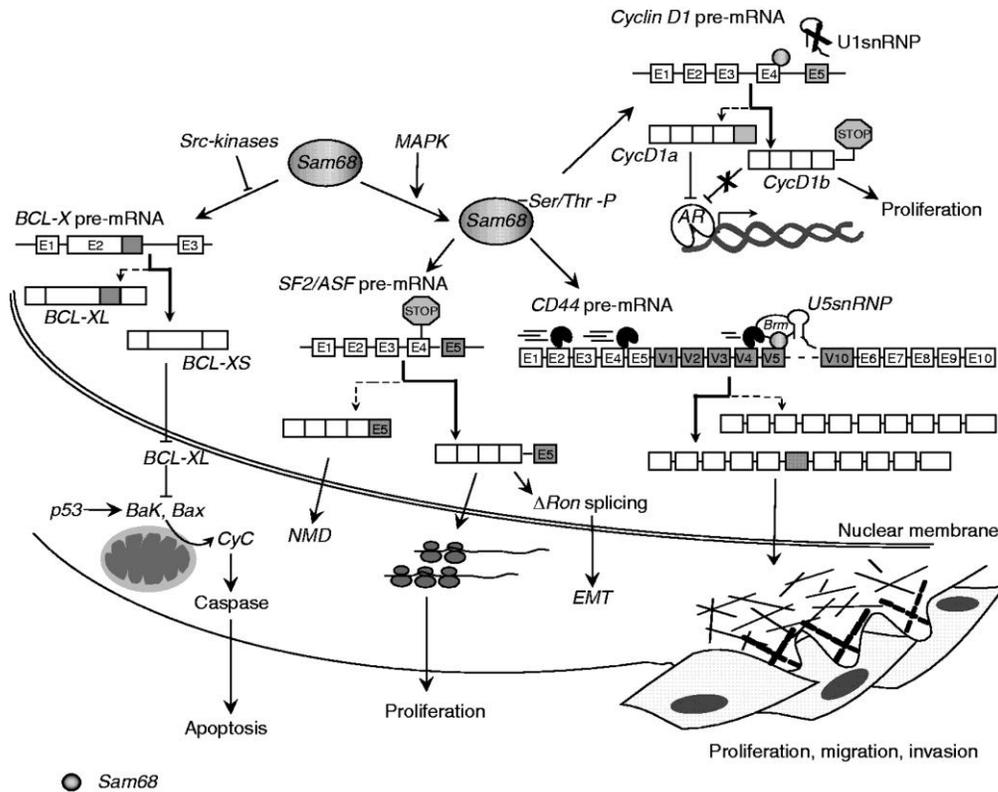
#### **3.1 Rôles de SAM68 dans le cas du cancer de la prostate :**

Bien que la fonction exacte de SAM68 soit encore inconnue dans le cas du cancer de la prostate, on peut néanmoins aboutir à quelques conclusions à ce propos. Premièrement, l'activation de la kinase Src par le récepteur tyrosine kinase c-Kit tronqué (récepteur exprimé de façon aberrante pour certains sous-groupes de cancer de la prostate), stimule l'assemblage d'un complexe SAM68/PLC $\gamma$ /Fyn puis augmente la tyrosine-phosphorylation de SAM68 pour des cellules de cancer de la prostate (cellules PCa) [191, 204]. Comme le résume la figure 9, cette tyrosine phosphorylation affine les événements d'épissage alternatif (par exemple, de la cycline D1 [205], de CD44 [192], de BCL-X et SF2/ASF) relatif à l'apoptose, la prolifération et l'adhésion cellulaire, médiés par SAM68. Comme Src est très souvent activée chez de nombreux cancers [206, 207], ce mécanisme permettrait la survie des cellules néoplasiques PCa. Dans le cas du cancer de la prostate, SAM68 interagit avec l'*Androgen receptor* (AR) augmentant ainsi son activité transcriptionnelle [208] mais réprime l'épissage alternatif de la cycline D1 (également impliquée dans contrôle de l'activité de l'AR par rétrocontrôle [209]). Dans ce cas précis, la fonction positive exercée par la cycline D1 sur le cycle cellulaire de cellules PCa est néanmoins préservée grâce à l'expression d'une isoforme épissée de

celle-ci, soit la cycline D1b [209]. Remarquons, qu'en plus de ses propriétés fortement oncogéniques, la cycline D1b n'exerce pas de rétrocontrôle négatif sur l'AR [210].

Deuxièmement, SAM68 est sur-régulée et hyperphosphorylée chez les cellules PCa [191, 208]. L'expression conséquente de la protéine permettrait ainsi la prolifération et la survie de ces cellules face à des agents génotoxiques [169]. Sur le même thème, Busà et al. démontrent qu'un traitement à la mitoxantrone, un inhibiteur de la topoisomérase de type II, induit la relocalisation de SAM68 dans le noyau, en association avec la forme phosphorylée de l'ARN polymérase de type II ainsi que d'autres facteurs d'épissage alternatif, au niveau de régions actives d'un point de vue transcriptionnel [211]. Aussi, SAM68 jouerait un rôle de protection des cellules cancéreuses en induisant un mécanisme d'échappement de ces dernières face à l'agent chimiothérapeutique, et permettant ainsi leur survie [211, 212].

Comme Src, BRK est régulé de façon aberrante dans le cas du cancer de la prostate [213], ces résultats suggèrent qu'une régulation anormale de la voie BRK/SAM68 pourrait également jouer un rôle dans l'oncogenèse du cancer de la prostate.



**Figure 10: Représentation schématique des évènements d'épissage alternatif relatifs à l'apoptose, la prolifération, l'adhésion et l'invasion cellulaire induits par SAM68 dans le cas du cancer [214].**

### 3.2 Rôles de SAM68 dans le cancer du sein :

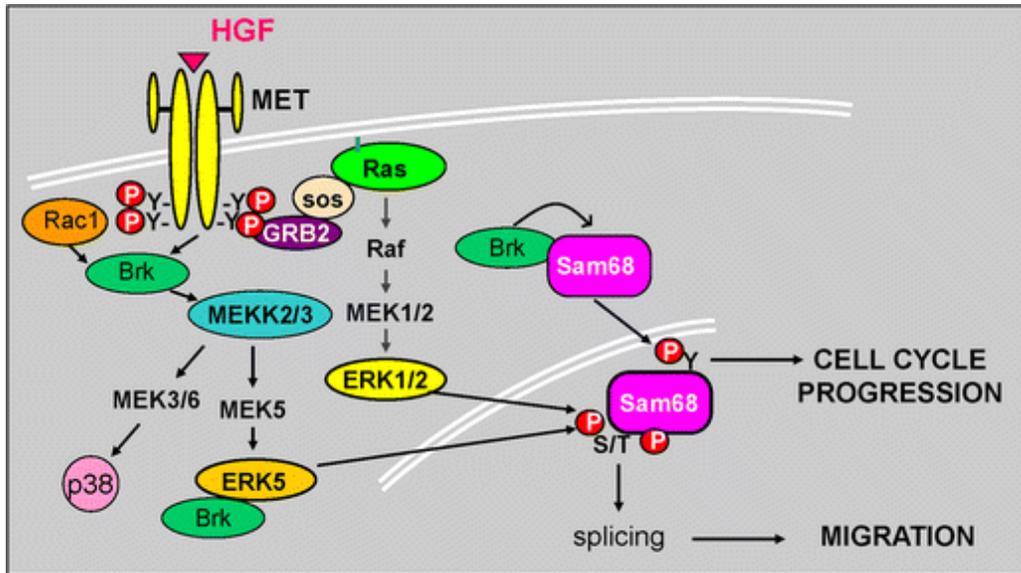
Les conclusions concernant le rôle de SAM68 dans le cas du cancer du sein sont similaires aux conclusions tirées dans le cas du cancer de la prostate. En effet, la diminution de l'expression de SAM68 par knockdown chez des lignées de cellules de cancer du sein en réduit la capacité de prolifération et de tumorigénicité, en affectant la progression du cycle cellulaire (en bloquant la transition entre la phase G1 et la phase S) [170]. D'un point de vue mécanistique, l'inactivation de la forme endogène de SAM68 entraîne la sur-régulation d'inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (p21/p27) [170], réduisant la phosphorylation d'une protéine de séquestration exerçant un contrôle négatif du cycle cellulaire, la protéine RB. La sur-régulation de p21/p27 par inactivation de SAM68 aboutit de plus, à une inhibition de l'activité de la kinase Akt (diminution drastique de la forme

phosphorylée) et à l'activation subséquente des facteurs de transcription de la famille FOXO (*Forkhead box O*) [170].

Il a également été démontré que l'haploinsuffisance (un seul des deux allèles d'un gène est délété ou non-exprimé) de SAM68 chez des souris n'aboutissaient pas au développement de tumeurs mammaires conséquentes à une exposition à l'antigène moyen T du virus du polyome, PyMT [215]. L'activation de la voie de signalisation impliquant PyMT, via la kinase Src [dont SAM68 est un substrat, cf. sous-section 2.1.)] aboutit normalement au développement de ce type de tumeurs. De plus, selon la même étude, la réduction de l'expression de SAM68 est corrélée avec une activité accrue de Src [215]. De forts niveaux d'expression de SAM68 seraient donc requis pour la transformation néoplasique des cellules *in vivo*. Comme cité précédemment, dans le cas de cellules du cancer du sein, il s'avère également que SAM68 est exprimée sous sa forme acétylée, ce qui augmenterait sa capacité de liaison à l'ARN [201]. Pour des stades avancés de cancer du sein mais aussi de carcinome rénal, il a été remarqué que SAM68 était localisé dans le cytoplasme des cellules cancéreuses [170, 216]. SAM68 est également localisé dans le cytoplasme de cellules germinales mâles [217] (rôle de SAM68 dans la spermatogénèse et la fertilité en raison de la stimulation de l'activité traductionnelle de la protéine par la voie RAS/MAPK) et de neurones [218] (rôle de SAM68 dans le développement neural) en association avec le complexe d'initiation de la traduction eIF4F et des polysomes (ou polyribosomes, soit, un ensemble de ribosomes reliés entre eux par un ARNm). Cette localisation, en association avec les éléments cités permettrait à SAM68 de réguler la traduction de certains ARNm d'intérêts présélectionnés. Il serait donc possible que la protéine joue un rôle additionnel pour les tumeurs fortement malignes. En effet, comme SAM68 module l'épissage alternatif d'ARN cancer-spécifiques [192, 205, 212], il est possible qu'une localisation cytoplasmique de SAM68 dans le cas des tumeurs de haut grade, contribue à la transformation néoplasique des cellules en augmentant la traduction d'ARNm spécifiques. De même que Song et al. dans le cas du cancer du sein [170], Zhang et al. ont corrélié l'augmentation de l'expression de SAM68 dans le cas du carcinome rénal avec un pronostic de survie faible [216].

Il a été récemment mis en évidence que l'activation du récepteur Met, impliqué dans la migration, la survie et la prolifération cellulaire tant physiologique que pathologique (cancer), par l'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) induirait la formation de complexes entre BRK, ERK5 et SAM68, comme

présenté en figure 10 ci-dessous. La fonction associée à ces complexes, donc de SAM68 dans ce cas, serait la reprogrammation cellulaire de l'épissage d'ARNm et donc de l'expression des protéines résultantes, ce qui favoriserait la motilité des cellules cancéreuses du sein indiquant ainsi le rôle essentiel de cette voie de signalisation dans la tumorigenèse et la progression du cancer du sein.

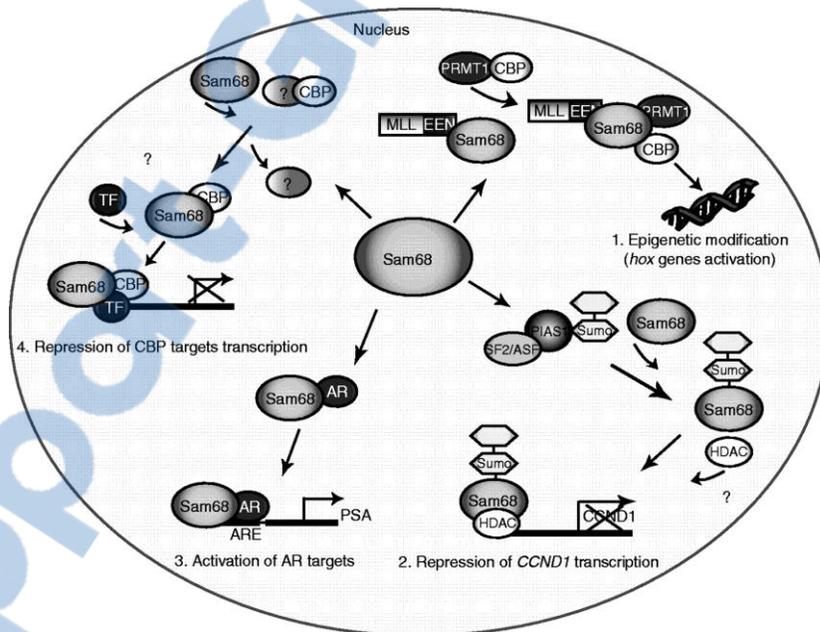


**Figure 11: Représentation schématique de la cascade de signalisation impliquant BRK/SAM68/ERK5 relative à l'activation du récepteur Met par HGF, et des évènements cellulaires qui en découlent [219].**

À propos de BRK, il a été démontré que la kinase était surexprimée, comme SAM68, chez des lignées cellulaires du cancer du sein [220]. Celle-ci permettrait la prolifération et la croissance ancrage-indépendante [221]. De plus, Lukong et al. ont remarqué plus récemment que la tyrosine-phosphorylation de SAM68 par cette kinase en permettait la translocation nucléaire chez des lignées de cancer du sein lors de la stimulation mitogénique de ces dernières à l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) [190].

### 3.3 Rôles de SAM68 dans les leucémies et carcinomes thyroïdiens :

La possibilité d'intervention de SAM68 dans certaines interactions protéines-protéines, en plus de son activité de liaison à l'ARN et des événements qui en découlent (épissage alternatif et traduction d'ARNm présélectionnés cancer-spécifiques), serait également indissociable de son rôle oncogénique. C'est notamment le cas pour les carcinomes thyroïdiens pour lesquels il a été montré que SAM68 était fortement tyrosine-phosphorylée par les oncoprotéines RET/PTC2 (*Rearranged During Transfection/Protein phosphatase type 2C*) [222] qui agissent en amont des SFKs (*Src Family Kinases*). Il pourrait donc s'avérer que SAM68 joue un rôle supplémentaire de modulateur de l'activité des SFKs dans le cas des cellules cancéreuses. A l'heure actuelle, il a été proposé que SAM68 régule l'assemblage dynamique du cytosquelette d'actine à la membrane plasmique via la modulation de la voie de signalisation impliquant Src et qu'une déplétion en SAM68 provoquerait l'activation aberrante de la protéine GTPasique Rho [223]. Les interventions possibles de SAM68 dans les interactions protéines-protéines relatives au cancer sont listées figure 11 plus bas.



**Figure 12: Représentation schématique des interventions possibles de SAM68 dans différentes interactions protéines-protéines et régulation conséquente de la transcription d'événements cancer-spécifiques [214].**

Fait remarquable dans ces interventions, l'interaction directe de SAM68, via quatre de ses régions riches en proline avec la protéine de fusion chimérique MLL-EEN (fusion de l'histone méthyltransférase *Myeloïd Lymphoïd Leukemia* avec *Extra Eleven Nineteen*) via le domaine SH3 d'EEN permet le recrutement conjoint de l'histone méthyltransférase PRMT1 (*Protein arginine N-methyltransferase 1*) et de l'histone acétyltransférase CBP (*CREB binding protein*) [224]. La protéine de fusion MLL-EEN est associée au développement de leucémie myéloïde aiguë [225]. Il s'avère en outre que dans le cas du cancer, le recrutement de PRMT1 via SAM68, ne se produit que grâce à la protéine de fusion oncogénique MLL-EEN [224]. Ce recrutement est absolument essentiel à la transformation néoplasique puisqu'en effet, l'interaction de CBP avec la protéine MLL de type sauvage n'entraîne pas de transformation néoplasique des cellules [224]. Le recrutement de PRMT1 via SAM68, aboutit à certaines modifications épigénétiques (notamment sur les gènes Hox, impliqués dans le développement de leucémies) puis à la dérégulation de la transcription des cibles de MLL-EEN [224]. Confirmant l'implication de SAM68 dans la transformation néoplasique, une diminution induite de la forme endogène de SAM68, abolit totalement la transformation cellulaire médiée par MLL-EEN [224].

### **3.4 Rôles de SAM68 dans le cancer du poumon non-à-petites cellules :**

À ce jour, une seule étude concernant l'éventuelle implication de SAM68 dans le cas du CPNPC a été rapportée [226]. Dans cette étude, Zhang et al. ont constaté à partir de biopsies de tumeurs de CPNPC que l'expression de la protéine était relativement élevée, en comparaison des tissus sains avoisinants les tumeurs. Cette importante expression de la protéine était de plus, significativement corrélée avec la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques et avec le stade de la maladie, les stades II et III exhibant les plus forts niveaux d'expression de SAM68, en comparaison du stade I. L'étude révèle également que l'expression élevée de la protéine était corrélée avec un pronostic faible de la maladie, conférant de ce fait à SAM68, le statut de marqueur pronostic de survie globale du CPNPC.

En conclusion, SAM68 semble être une cible thérapeutique intéressante dans le cas du traitement du cancer [227], en raison de son implication multifonctionnelle dans différents mécanismes subcellulaires (métabolisme de l'ARN, interactions protéines-protéines, signalisation cellulaire, transduction du signal).

## CHAPITRE 2 PROBLÉMATIQUE ETHYPOTHÈSE DU MÉMOIRE

Entre les années 1940 et 2006, 475 des nouveaux agents anticancéreux approuvés pour l'utilisation chez l'humain étaient des produits naturels ou des produits directement dérivés de ceux-ci [228]. Ces chiffres suggèrent ainsi qu'il existe un fort potentiel de nouveaux anticancéreux dans la nature. Il semble donc opportun de poursuivre les recherches sur les produits d'origine naturelle afin d'améliorer l'efficacité des traitements de chimiothérapie contre le CPNPC, une forme de cancer toujours incurable.

À ce titre, le laboratoire LASEVE (Laboratoire d'Analyse et de Séparation des essences Végétales) mène depuis plus d'une dizaine d'années, des recherches pour découvrir de nouvelles molécules issues de plantes. Comme décrit au chapitre 1-section I, les plantes appartenant au genre *Helleborus*, sont sources d'anticancéreux potentiels de par leur teneur en glycosides cardiaques (bufadiénolides et cardiénolides), composés dont l'efficacité anticancéreuse et anti-tumorale a été notamment montrée dans le cas du cancer du poumon [119, 229]. L'extrait enrichi étudié dans le projet de recherche présenté dans ce mémoire, est issu d'une plante endémique de la Géorgie, *Helleborus caucasicus*. Il n'existe à ce jour qu'une seule étude concernant la cytotoxicité des extraits alcooliques issus des racines et rhizomes d'*Helleborus caucasicus*. Cette étude réalisée dans notre laboratoire montrait que l'extrait était cytotoxique contre des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, des cellules de cancer de la prostate et des fibroblastes normaux de peau humaine [134]. Cependant, aucun essai *in vivo* concernant l'activité anti-tumorale des extraits issus de cette espèce particulière et aucune étude concernant son mécanisme d'action dans le cas précis du CPNPC, n'a été effectué à ce jour.

L'hypothèse générale de ce projet de recherche est que l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* étudié ici, constitue une stratégie thérapeutique pertinente dans le traitement du CPNPC.

De ce fait, le premier objectif de ce travail consistait à évaluer l'activité cytotoxique, donc le potentiel anticancéreux de l'extrait, *in vitro* sur plusieurs modèles de cellules cancéreuses de poumon et de fibroblastes normaux de poumon.

Le deuxième objectif du projet consistait à caractériser le mécanisme d'action de l'extrait sur un modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire. Cet objectif a été divisé en quatre sous-objectifs :

1. Évaluer l'effet de l'extrait sur le cycle cellulaire,
2. Évaluer le potentiel pro-apoptotique de l'extrait,
3. Évaluer l'effet de l'extrait sur le transcriptome
4. Évaluer l'effet de l'extrait sur l'expression et la localisation subcellulaire de la protéine SAM68, protéine au rôle oncogénique connu mais qui n'a été que très récemment corrélée au CPNPC [226] (cf. chapitre 1, section II).

Enfin, le troisième objectif de recherche consistait à évaluer l'activité anti-tumorale de l'extrait *in vivo*, sur un modèle de souris porteuses de tumeurs du carcinome pulmonaire de Lewis.

## CHAPITRE 3 ANTITUMOR ACTIVITY OF *HELLEBORUS CAUCASICUS* ENRICHED EXTRACT AGAINST LUNG CANCER AND STUDY OF MECHANISM OF ACTION

### RÉSUMÉ:

Le cancer du poumon est la principale cause de décès par cancer au monde. La majorité des cancers du poumon diagnostiqués sont imputables au cancer du poumon non-à-petites cellules. Les traitements couramment utilisés présentent une efficacité relative et des effets secondaires, d'où la nécessité de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques. De nombreuses études pharmacologiques mettent en évidence les propriétés anti-tumorales des espèces du genre *Helleborus*. Afin d'évaluer le potentiel chimiothérapeutique d'un extrait enrichi issu des racines d'*Helleborus caucasicus* dans le cas du CPNPC, nous avons évalué son activité cytotoxique sur des lignées de cellules cancéreuses du poumon et sur des fibroblastes normaux du poumon puis déterminé ses effets sur la mort cellulaire, le cycle cellulaire et le transcriptome de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, les A549. Nous avons également évalué les effets antitumoraux de l'extrait sur des souris C57BL/6 NCrl mâles porteuses de tumeur du carcinome pulmonaire de Lewis.

Les résultats ont montré que l'extrait était fortement cytotoxique contre les cellules A549, avec une valeur d'IC50 de 0,02 µg/ml, cellules pour lesquelles il induisait une diminution significative de la viabilité cellulaire, un ralentissement du cycle cellulaire en phase G2/M, la mort cellulaire incluant l'apoptose. En outre, les résultats ont montré que les lignées de cellules normales du poumon, HEL-299 et MRC-5, étaient 5 fois moins sensibles à l'extrait que les cellules A549, avec des valeurs d'IC50 de 0,1 µg/ml, suggérant ainsi une sélectivité possible de l'extrait pour certaines formes de CPNPC. Nous avons également constaté que l'extrait induisait la régulation de l'expression transcriptionnelle de plusieurs oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur chez les cellules d'adénocarcinome du poumon A549, suggérant ainsi que celui-ci pourrait agir à titre d'inhibiteur de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK. Enfin, Les résultats ont montré que l'extrait d'*H.caucasicus* réduisait de manière significative le poids des tumeurs d'environ 46 à 47% pour une dose de 1 mg/kg chez des souris C57BL/6 NCrl porteuses de tumeur du carcinome pulmonaire de

Lewis, sans toxicité de l'extrait. Ces résultats suggèrent donc que cet extrait pourrait constituer un outil thérapeutique pertinent dans le traitement du CPNPC.

# **Antitumor activity of *Helleborus caucasicus* enriched extract against lung cancer and study of mechanism of action.**

Lucile Pain, André Pichette, Balla Sylla, Vakhtang Mshvildadze and Jean Legault\*

<sup>1</sup> Laboratoire LASEVE, Université du Québec à Chicoutimi, 555 Boul. de l'Université, Département des Sciences Fondamentales, Chicoutimi, Québec, Canada;

\* Corresponding author: Jean.Legault@uqac.ca

## **KEYWORDS**

*Helleborus caucasicus*, chemotherapy, antitumor, non-small-cell lung cancer, lung adenocarcinoma.

## **ABSTRACT**

Lung cancer is the leading cause of cancer death in the world. A large majority of lung cancers diagnosed are imputable to non-small-cell lung cancer. The commonly used treatments present relative effectiveness and side effects, hence the need to develop new therapeutic alternatives. Many pharmacological studies bring out that *Helleborus* species possess antitumor properties. To assess the chemotherapeutic potential of an enriched extract from the roots of *Helleborus caucasicus* in the case of NSCLC, we evaluated its cytotoxicity against lung cancer cell lines and normal fibroblasts and determined its effect on cell death, cell cycle and on the transcriptome of human lung adenocarcinoma A549 cells. We also investigated the antitumor effects of the extract on Lewis lung cancer bearing C57BL/6 NCrl mice. Results showed that the extract was particularly cytotoxic for A549 cells, with IC50 value about 0.02 µg/mL, for which it induced a significant decrease of cell viability, a G2/M phase's cell cycle slowing and cell death including apoptosis. Moreover, results showed that normal HEL-299 and MRC-5 cell lines were 5 times less sensitive to the extract than A549 cells, with IC50 values about 0.1 µg/mL, suggesting that the extract would be selective for some forms of non-small-cell lung cancer. We also found that the extract induced the regulation of transcriptional expression of several oncogenes and tumor suppressor genes on lung

adenocarcinoma A549 cells, suggesting that it could act as an inhibitor of the RAS/RAF/MEK/MAPK signaling pathway. Finally, the results showed that *H. caucasicus* enriched extract reduced significantly tumor weight about 46 to 47 % at low dose of 1 mg/kg without toxicity, on Lewis lung cancer bearing mice. These results suggest that this extract could be a compelling therapeutic tool for the treatment of NSCLC.

## INTRODUCTION

It is estimated that lung cancer is the principal cancer-related mortality since it is responsible of 19.4% of all deaths from cancer throughout the world [1]. Lung cancer is currently divided in two major subtypes, classified according to histological criteria, small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC) [2]. 75-85% of all lung cancers diagnosed are imputed to NSCLC [3]. Depending on the stage of the disease, different approaches, including surgery, radiotherapy and chemotherapy [4], are used as treatment with limited effectiveness and side effects, hence the necessity to develop new therapeutic strategies to treat NSCLC.

In this order, a special attention has been paid to bioactive natural products such as extracts of *Helleborus* genus, a Ranunculaceae comprising around 20 species spread in Europe and Asia. It has been suggested that compounds isolated from this genus possessed antitumor and cytotoxic properties. Especially, several studies bring out the chemotherapeutic potential of an important group of cardiotonic steroids from this genus, bufadienolides [5, 6], isolated from both animals and plants [7, 8]. Thus, it has been shown that bufadienolides, furo- and spirostanol glycosides extracted from the rhizomes of *Helleborus orientalis* indicated particular cytotoxicity and had high tumor specificity against human melanoma cells (A375), squamous carcinoma cells (HSC-2), and human hepatoma cells (HepG2) than they had for normal human pulp cells (HPC) [9-11]. It has also been shown that hellethionins, a family of thionins discovered in the roots of *Helleborus purpurascens*, exhibited cytotoxic properties and thus, have been proposed as potential immunotoxins to support antitumor therapy [12]. Concerning the same species, some polyphenolic extracts displayed cytostatic and cytotoxic effects against human cervical adenocarcinoma cells (HeLa) [13]. Recently, it has been proved by MTT colorimetric assay, that hellebrin isolated from *Helleborus purpurascens*, and its aglycone form, hellebrigenin, exerted in vitro growth inhibitory activity against a wide range of cancer

cell lines: ACHN (renal carcinoma), SF-268 and SNB-75 (glioma), MCF-7 (breast cancer), SKMEL-5 (melanoma), HCT-116 and HT-29 (colon cancer), TK-10 (kidney cancer), Ovar-3 and -4 (ovarian cancer) and A549 (non-small cell lung cancer) [14]. In the same idea, Lindohlm et al. have demonstrated that some extracts from *Helleborus cyclophyllus* possessed antitumoral and cytotoxic properties against leukemia, myeloma, lymphoma, renal adenocarcinoma and small-cell lung cancer cell lines [15]. An aqueous whole extract from another specie of *Helleborus*, yet used as an adjuvant therapy in the treatment of tumor patients [16], *Helleborus niger*, has been tested for cytotoxicity on lymphoma, leukemia and melanoma cell lines [17]. Study revealed that the strong inhibition of hematological malignancies cells proliferation resulted from specific apoptosis induction with caspase-3 processing. Biological activity of *Helleborus bocconeii* ssp. *Intermedius* has also been shown since two furostanol saponins, helleboroside A and B isolated from this species exhibited major cytotoxic effects on rat C6 glioma cells with a cell growth inhibition about 60% to 70% [18]. In a similar study, Cakar et al. have demonstrated that root extracts from two *Helleborus* species, *Helleborus multifidus* Vis and *Helleborus hercegovinus* Martinis, were more efficient than leaves extracts against Burkitt's lymphoma B cells (BJAB) cell line in terms of antiproliferative activity, with percentages of cell growth inhibition around 50% [19]. More recently, it has been reported that new bufadienolide glycosides isolated from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* exhibited cytotoxic effects against DU145 and PC3, two prostate cancer cell lines [20]. This specie was previously known to be moderately cytotoxic on human breast adenocarcinoma MCF-7 cells, human hepatocarcinoma QGY-7701 cells, human gastric cancer BGC-823 cells and Lewis lung carcinoma 3LL cells [21].

Actually, only one study, performed in our laboratory, relates the strong cytotoxicity of root and rhizome alcoholic extracts from *Helleborus caucasicus*, an endemic plant of Georgian flora, against human lung adenocarcinoma, prostate cancer cell lines and normal skin fibroblast [22]. No in vivo assay concerning the efficiency of this species about NSCLC is presently available.

The objective of this study was to assess the cytotoxic activity *in vitro* and *in vivo* of an enriched extract from the roots of *Helleborus caucasicus* against NSCLC. Moreover, we investigated its mechanism of action on lung adenocarcinoma cells.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Extraction procedure**

The aqueous-methanolic extract from the roots and rhizomes of *Helleborus caucasicus* previously washed with hexane (to remove the lipid compounds) was partitioned between water and ethyl acetate as described by Sylla et al. [23]. The organic fraction was subjected to a series of chromatographic purifications resulting in obtaining an extract rich in hellecaucaside A (over 97%) [23] and some glycosidic compounds of the bufadienolides family. This enriched extract was tested for the following experiments described below.

### **Cell culture**

Two human non-small cell lung adenocarcinoma cell lines A549 (CCL-185) and NCI-H23 (CRL-5800), one murine Lewis lung carcinoma cell line LLC1 (CRL-1646) and two human lung fibroblast cell lines HEL-299 (CCL-137) and MRC-5 (CCL-171), were purchased from American Type Culture Collection (VA, USA). A549, LLC1, HEL-299 and MRC-5 were cultivated in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM; Wisent Inc., Quebec, CA) supplemented with heat-inactivated 10% fetal calf serum, 1% penicillin/streptomycin and 1% multivitamin mix (all from Mediatech Cellgro, Corning Inc., VA, USA). NCI-H23 were cultivated in Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (ATCC, VA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum. A549 derived doxorubicin-resistant cells (A549-dox-r) were developed by selecting cells acquired doxorubicin resistance in the medium containing stepwise increasing concentrations of doxorubicin (Sigma-Aldrich, MO, USA) until final concentration required (0.5  $\mu$ M). Doxorubicin-resistant cells were exposed to 0.5 doxorubicin at regular intervals to maintain their drug resistance, but the addition of doxorubicin was arrested one week before any experiment. Cells were maintained at 37°C in a humidified environment containing 5% CO<sub>2</sub>.

### **Cytotoxicity assay**

Exponentially growing cells (5x10<sup>3</sup> per well) were seeded into 96-well plates and allowed to adhere overnight. Cells were then incubated for 48h with DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA) and increasing concentrations of the extract, dissolved in DMSO and then, added to culture medium. Etoposide (Sigma-Aldrich, MO, USA) was used as positive control. Cytotoxicity was assessed by measuring cellular metabolic activity firstly and DNA amount secondly. Briefly, cellular metabolic activity was

assessed using the resazurin (Sigma-Aldrich, MO, USA) reduction test as described by O'Brien et al. [24]. Plates containing cells layers were then frozen and cells were lysed by adding sodium dodecyl-sulfate (SDS) 0.01% (Sigma-Aldrich, MO, USA). DNA assay was carried out using Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, MO, USA) staining as described by Rago et al. [25]. Fluorescence was measured on an automated 96-well Fluoroskan Ascent FL plate reader (ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm for resazurin reduction test, and excitation/emission wavelengths of 355/460 nm for DNA assay. Cytotoxicity was expressed as the half maximal inhibitory concentration of the extract or etoposide ( $IC_{50}$ ).

### **Cell cycle distribution analysis by flow cytometry**

The distribution of cells at different stages in the cell cycle was estimated by flow cytometric DNA analysis as described by Moore et al. [26]. Briefly, A549 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded onto 100 mm petri culture dishes and allowed to adhere overnight. Cells were then exposed for 24 h to increasing concentrations of the extract (0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dissolved in DMSO or solvent DMSO (0.5% v/v) used as negative control. After collecting their respective stimulation media, cells were washed with PBS 1X, harvested by trypsinization and centrifuged at 800g for 3 min at 4°C. Pellets were washed with cold PBS 1X, fixed in 100% pre-cold ethanol/30% PBS 1X and stored overnight at -20°C. The fixed cells were then centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C and washed in cold PBS 1X. Cells were finally resuspended in propidium iodide (PI) staining buffer [50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI (Invitrogen®, Life technologies, Thermo Fisher Scientific, OR, USA), 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A (Bio Basic Canada Inc., ON, CA), 0.2% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) and PBS 1X to complete to final volume required] and kept at 4°C for 30 min at 4°C. Cell cycle analysis was performed by CHU de Québec Research Center (Québec, CA) using BD FACSCanto II (BD Biosciences, Becton Dickinson, CA, USA) using an excitation wavelength of 625 nm and an emission wavelength of 540 nm.

### **Cell viability assay**

A549 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded into 100 mm petri culture dishes and allowed to attach overnight. Cells were then exposed for different times (6, 12 and 24 h) to increasing concentrations of the extract (0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) dissolved in DMSO or solvent DMSO (0.5% v/v) used as negative

control. After collecting their respective stimulation media, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) 1X (Mediatech Cellgro, Corning Inc., VA, USA), harvested by trypsinization (Mediatech Cellgro, Corning Inc., VA, USA) and centrifuged at 800xg for 3 min at room temperature. The pellets were then resuspended in 1000  $\mu$ L of DMEM. For each group, an aliquot of the cells was reacted with an equal volume of trypan blue (Sigma-Aldrich, MO, USA) analyzed for the dye-excluding viable cells as described by Strober [27]. The percentages of cell viability were determined considering the DMSO treated control group as 100 % of viability. All values were the averages  $\pm$  Standard Deviation (SD) of three independent experiments in each group.

### **Flow cytometric assessment of cell death using Annexin V-FITC assay**

A549 cells ( $1 \times 10^6$ ) were seeded into 100 mm petri culture dishes and allowed to attach overnight. Cells were treated for different times (6h, 12h and 24h) to increasing concentrations of the extract (0.5, 2.5 and 5  $\mu$ g/mL) dissolved in DMSO or solvent DMSO (0.5% v/v) used as negative control. After collecting their respective stimulation media, cells were washed with PBS 1X, harvested by trypsinization and centrifuged at 800g for 4 min at 4°C. Cell apoptosis was measured by Annexin V-FITC assay as described by Koopman et al. [28] using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit Plus (BioVision, CA, USA). After washing with cold Binding Buffer 1X, cell were resuspended in 500  $\mu$ L of the same buffer. 5  $\mu$ L of Annexin V-FITC and 1  $\mu$ L of SYTOX Green dye were added. The samples were then incubated at room temperature for 5 min in the dark. Analysis of cell death by flow cytometry (Ex=488 nm; Em=530 nm) was performed by CHUQ flow cytometry laboratory (Québec, CA) using BD FACSCanto II (BD Biosciences, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

### **Morphological cell assessment by hematoxylin and eosin staining**

A549 cells ( $5 \times 10^3$  per well) were seeded into 96-well plates and allowed to adhere overnight. Cells were then incubated for 24h with DMSO and increasing concentrations (7.7 ng/mL to 9.9  $\mu$ g/mL) of the extract dissolved in culture medium. Cells were checked every two hours to monitor their evolution. Plates were then stained performing a hematoxylin and eosin stain as described by Wissowzky [29], using Fisher HealthCare™ PROTOCOL™ Hema 3™ Manual Staining System (Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) according to the manufacturer's recommendations.

### **RNA extraction, total RNA quantification and transcriptome analysis**

A549 cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were seeded into 100 mm petri culture dishes and allowed to adhere overnight. Cells were then exposed for different times (4, 6 and 8 h) to 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of the extract dissolved in DMSO or solvent DMSO (0.5% v/v) used as negative control. After collecting their respective stimulation media, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS)1X, harvested by trypsinization and centrifuged at 800g for 3 min at room temperature. The pellets were then resuspended in 1000  $\mu\text{L}$  of DMEM and counted for standardizing each sample at  $1 \times 10^6$  A549. For each sample, RNA was extracted using the RNeasy Mini kit (QIAGEN Inc., California, USA) according to the manufacturer's recommendations based on the methods of Chirgwin et al. [30] and, Chomczynski and Sacchi [31]. Following the methods previously mentioned, RNA concentration was determined by spectrophotometric measurement at 260 nm using Agilent 8453 Spectrophotometer (Agilent Technologies, CA, USA).  $A_{260}/A_{280}$  ratio was calculated to determine the purity of the RNA, which was allowed to be 1.8-2. Transcriptome analysis was performed by The McGill University and Génome Québec Innovation Centre using the GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix, CA, USA) for more than 40000 transcripts as described by Pradervand et al. [32].

### ***In vivo* drug antitumoral activity and toxicity study**

*In vivo* drug antitumoral activity and toxicity studies were performed as described by Chuang et al. [33]. LLC1 cells ( $1 \times 10^6$  /injection) suspended in 100  $\mu\text{L}$  of DMEM (without antibiotics and FBS) were inoculated subcutaneously (SQ) into the right back of male C57BL/6 NCrI mice (Charles River, Massachussets, USA). Mice were divided into 9 groups with 10 animals per group except for group 1 (negative control) which comprised 15 animals. Treatments of extract or cisplatin, used as a positive control, were diluted in PBS and administered intravenously (IV). 24h after inoculation with tumor cells, group 1 received 100  $\mu\text{L}$  of PBS used as negative control, group 2 received 100  $\mu\text{L}$  of 4 mg/kg cisplatin, group 3 received 100  $\mu\text{L}$  of 1 mg/kg extract, group 4 received 100  $\mu\text{L}$  of 2.5 mg/kg extract and group 5 received 100  $\mu\text{L}$  of 5 mg/kg extract once a day from day 1 to day 4. Group 6 received 100  $\mu\text{L}$  of 4 mg/kg cisplatin, group 7 received 100  $\mu\text{L}$  of 1 mg/kg extract, group 8 received 100  $\mu\text{L}$  of 2.5 mg/kg extract and group 9 received 100  $\mu\text{L}$  of 5 mg/kg extract once a day from day 7 to day 10. All mice were euthanized at day 18 and tumors were excised then weighted. Mice weight and survival were monitored throughout the experiment to determine toxicity. Mice weight changes were expressed as percentages and calculated using the following formula:  $[(W4-W1)/W1] \times 100\%$  or

$[(W_{10}-W_7)/W_7] \times 100\%$  depending of the treatments administration periods, where  $W_n$  was the mouse weight at day  $n$ ). Mice were kept in accord with the guidelines and policies of GAP-Good Animal Practice as established by the Canadian Council on Animal Care (CCAC) which approved the experiment.

### **Statistical analysis**

Data were presented as means  $\pm$  Standard Deviation (SD) of at least three independent experiments except for transcriptome analysis and in vivo study (one experiment). For cytotoxicity assay and drug antitumoral activity study, Mann Whitney Rank Sum tests were used to determine the statistical significance. For weight changes comparison of toxicity study, one-way ANOVAs were used. About cell viability assay, cell cycle and cell death analysis, two-way ANOVAs were used to determine the statistical significance. All statistical analyzes about experiments mentioned earlier were performed using SigmaStat 3.5 software. Finally, concerning transcriptome analysis, t-statistics using the GSEA tool, were used to determine the statistical significance.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Evaluation of cytotoxic activity of *H. caucasicus* enriched extract against normal and lung cancer cell lines.**

The cytotoxic activity of *H. caucasicus* enriched extract was evaluated against normal (HEL-299, MRC-5), human (A549, NCI-H23) and mouse (LLC1) lung cancer cell lines using resazurin and Hoescht assays. The results are expressed as the concentration inhibiting fifty percent of cell growth ( $IC_{50}$ ). Etoposide was used as positive control with  $IC_{50}$  values ranging from 0.8 to 2  $\mu\text{g/ml}$  for normal and lung cancer cell lines. The results presented in Table 1 showed that the extract was found about 4 to 40 times more cytotoxic than etoposide against lung cancer cells with  $IC_{50}$  values ranging from 0.02 to 0.4  $\mu\text{g/ml}$  using both assays. As previously reported, the extract was found strongly cytotoxic against A549 lung adenocarcinoma cells with  $IC_{50}$  values of 0.02  $\mu\text{g/ml}$  [22]. However, the extract was found less cytotoxic against NCI-H23 and LLC1 cells with  $IC_{50}$  values ranging from 0.12 to 0.4  $\mu\text{g/ml}$ . Interestingly, normal lung cell lines HEL-299 and MRC-5 were 5 times less sensitive than

A549 cells with IC<sub>50</sub> values of about 0.10µg/ml suggesting a possible selectivity for some forms of lung cancer.

On the other hand, IC<sub>50</sub> values for normal lung HEL-299 and MRC-5 cells were similar to IC<sub>50</sub> values for lung cancer NCI-H23 cells. The cytotoxicity for both normal and cancer cells has already been reported for several compounds, well-characterized, extracted from the rhizomes of another *Helleborus* species, *Helleborus orientalis*. In the study, two compounds provided particular high toxicity for cancer cell lines and weak toxicity for healthy cell line (Human pulp cells) [10]. A third compound, also extracted from this plant, was shown to be cytotoxic for both cancer and healthy cell lines, showing the simultaneous presence of cytotoxic cancer-specific and non-specific compounds in the extract from *Helleborus orientalis*. These results also suggest the possibility of co-occurrence of cytotoxic tumor-specific and non-specific compounds in *H. caucasicus* enriched extract studied here.

Finally, the cytotoxicity was also evaluated against A549 cells resistant to doxorubicin (A549-dox-r). The results show that this resistant cell line is respectively about 5 times less sensitive to etoposide (IC<sub>50</sub>: 8 µg/ml) and to *H. caucasicus* enriched extract (IC<sub>50</sub> : 0.11 µg/ml) in comparison with parental A549 cells. This result suggests that the extract would be less cytotoxic for chemoresistant non-small cell lung cancer cells.

### **Evaluation of the mechanism of action of the *H. caucasicus* enriched extract on A549 human lung adenocarcinoma cells.**

#### *Effect of H. caucasicus enriched extract on the cell cycle distribution.*

The anti-cancer effects of many drugs are mediated by modulating cell cycle distribution and inducing cell cycle arrest or slowing [34]. As it was obvious that adenocarcinoma A549 cells were the most sensitive cell line for the extract, they were chosen for further mechanistic investigations in order to elucidate how the extract caused cytotoxic activity. Thus, to determine cell cycle distribution and eventually, a cell cycle arrest or slowing induced by the enriched extract, we proceeded to cell cycle analysis by flow cytometry and PI staining. The results presented in Figure 1 show the cell cycle

progression of A549 after exposing cells for 24 hours to increasing concentrations of extract (0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or vehicle (DMSO). The distribution of cells in each cell cycle phase was expressed as percentage of total cell analyzed. Resulting percentages are shown as means  $\pm$  SD of three independent experiments. In contrast with S cycle phase for which there was no statistical difference between extract treated-groups and control group, treatment of A549 with 0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of extract for 24hours resulted in a significant G2/M accumulation of cells corresponding to 32%; 36 % and 37 % respectively in comparison with DMSO control group (17%) ( $p < 0.001$ , two-ways ANOVA). However, the difference between the A549 treated-groups in the G2/M phase was not statistically significant. The accumulation of cells in the G2/M phase was related with a parallel significant decrease of the percentages of A549 in the G0/G1 phase ( $p < 0.001$ , two-ways ANOVA). Concerning A549 cells in Sub-G1 phase, the difference between extract-treated groups and negative control group was also no statistically significant. These results suggest that the extract inhibited A549 proliferation by mediating a G2/M phase's cell cycle slowing.

#### *A549 cell death assessment*

The cytotoxic properties of many anticancer drugs are also based on their ability to induce cancer cell death via apoptosis [35]. The viability of A549 cells using trypan blue exclusion assay was evaluated following incubation with increasing concentrations of extract (0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or DMSO for 6, 12 and 24 hours. In the same time, the apoptosis-inducing ability of the extract in A549 cells was also determined by Annexin V-FITC/SYTOX Green dye staining and flow cytometry. Concerning cell viability, cellular counts for extract treated-cells, were normalized to the count obtained in DMSO treated-cells for the same time, which was considered as 100% viability. The results, presented in Figure 2A, are expressed as the percentage of viability from three experiments. In comparison to vehicle-group, the extract was found to significantly reduce the A549 viability in a dose- and time-dependent manner ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA). Indeed, after exposing A549 for 6h, cell viabilities were 91%, 81 % and 72% after incubation of cells with 0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectively. After exposing A549 for 12h with the same concentrations of extract, cell viabilities were 53%, 44 % and 39%. The decrease in A549 viability was even more pronounced after 24h of exposure since after cells treatment with 0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of extract, the viability were 24 %, 20 % and 18 %, respectively.

Concerning the apoptosis-inducing ability of the extract in A549 cells, the result presented in Figure 2B show that the percentages of apoptotic cells following an incubation for 6 hours to increasing concentrations of the extract were not significantly different in comparison to the vehicle DMSO group. However, after exposing cells for 12 hours to the same concentrations of extract, the induction of apoptosis was significantly increased compared to control since percentages of apoptotic A549 were 14%, 20% and 21% corresponding to 0.5, 2.5 and 5  $\mu\text{g/ml}$  respectively, versus about 4% for the cells treated with vehicle DMSO ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA). Furthermore, the pro-apoptotic effect of the extract on A549 cells was even more pronounced after 24 hours of exposure. The percentages of apoptotic cells were significantly increased with 22% of apoptotic cells for 0.5  $\mu\text{g/ml}$  extract-treated A549 and 32% of apoptotic cells, for 5  $\mu\text{g/ml}$  extract-treated cells in comparison with 5% of apoptotic cells for the vehicle DMSO ( $p < 0.05$ , two-way ANOVA).

Taken with cell viability percentages, the results obtained after cell death assessment by flow cytometry highlight the fact that the extract did not induce cell death only by mediating apoptosis. Indeed, when cells were treated for 12 hours to increasing concentrations of extract, cell death percentages increased from nearly 47%, for A549 treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of extract, to nearly 61% for A549 treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of extract. These percentages did not correspond to the percentages of apoptotic A549 cells since they ranged from 14% for cells treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of extract, to 21% for A549 treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of extract. This tendency was also observed and even more pronounced after treatment of A549 cells for 24 hours to the same concentrations of extract. Thus, cell death percentages obtained after cell viability assessment ranged from 76% for A549 treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of extract, to 83% for A549 treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of extract. In comparison, percentages of apoptotic A549 cells for the same conditions ranged from 22% for the cells treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of extract, to 32% for the cells treated with 5  $\mu\text{g/ml}$  of extract. Consequently, a significant proportion of cell death is relative to the necrosis- or autophagy.

Nevertheless, the apoptosis-inducing ability of the extract in A549 was further confirmed after exposing cells for 12 hours with 31  $\text{ng/ml}$  of extract and processing cellular morphological assessment by hematoxylin/eosin staining and optical microscopy. For a very low concentration of extract, A549-treated cells were found to be fewer in number compared to vehicle DMSO. Moreover, the

blackarrows in Figure 3 show membranes blebbings, peripheral aggregation and condensation of chromatin added to the formation of apoptotic bodies in 31 ng/mL extract treated-A549. These morphological changes are well-known to be characteristics of apoptosis cell death, as described by Elmore et al. [36]. Taken with the results obtained by flow cytometric assessment of cell death, these observations confirm that the cytotoxic effect of the enriched extract in adenocarcinoma A549 cells was associated with induction of cell death including apoptosis, as reported in cells of hematological malignancies treated with an aqueous whole extract of *Helleborus niger* [17] or in human lymphocytes treated with roots extracts and leaf ethanol extracts of another three *Helleborus* taxa, *Helleborus odorus*, *Helleborus multifidus* and *Helleborus hercegovinus* [37].

#### *Effect of the H. caucasicus enriched extract on the transcriptome of A549 cells*

In NSCLC, tumorigenesis is a process involving the accumulation of different molecular abnormalities, genomic and transcriptomic alterations including the activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes [38, 39]. Targeting these processes which modify some signaling pathways resulting in uncontrolled cell growth, division and proliferation, appears to be a successful approach to treat the NSCLC [38-40].

Thus, the effect of the *H. caucasicus* enriched extract on the transcriptome of A549 cells was evaluated in order to correlate anticancer properties of the extract to the modulation of expression of particular transcripts, well-known to be deregulated in the case of NSCLC. Transcriptome analysis was performed for more than 40000 transcripts using RNA microarray after extracting total RNA from 2.5 µg/ml extract or vehicle DMSO-treated A549 cells for 4hours, 6hours and 8hours. After normalizing signal intensity of the samples, analysis revealed a large number of strongly regulated transcripts (data not shown). The results presented in Table 2 show that the extract induced a significant down-regulation of the sarcoma viral oncogene homolog KRAS (fold change=-1.36, p-value=3.12.x10<sup>-3</sup>), of SOS1 [son of sevenless homolog 1 (Drosophila)] (fold change: -1.37, p-value=5.88x10<sup>-4</sup>), of the v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog MYC (fold change=-2.43, p-value=3.37x10<sup>-5</sup>) and of PIK3CB (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta) (fold change=-1.54, p-value=1.94x10<sup>-3</sup>) in comparison to vehicle DMSO-treated cells. The transcriptome analysis also reported that the extract induced a significant up-regulation of the

forkhead box O3 FOXO3 (fold change=1.5, p-value=2.49x10<sup>-4</sup>) and of the tumor suppressor RASSF1 [Ras association (RAIGDS/AF-6)] (fold change=1.64, p-value=6.48x10<sup>-5</sup>) in comparison to vehicle DMSO-treated cells.

In NSCLC, the activation of the RAS/RAF/MEK/MAPK signaling pathway is frequent, mostly via activating mutations in KRAS, and lead to uncontrolled cell growth, proliferation, and survival [39]. KRAS, a member of the RAS proto-oncogene family, is in fact the most frequently mutated oncogene in human lung adenocarcinoma [41, 42]. The Grb-2 associated guanine nucleotide exchange factor SOS1 is known to activate RAS by exchanging GDP for GTP [43]. Two of the major downstream effectors of the RAS/RAF/MEK/MAPK signaling pathway, are the tumor suppressor gene RASSF1 and the proto-oncogene MYC. It has been shown that RASSF1 promoted cell cycle arrest and apoptosis in normal conditions and decreased tumor formation in vivo in primary NSCLC [44, 45]. It has also been reported that RASSF1 was unexpressed in NSCLC and that its inactivation was closely related to KRAS activation and contributed to malignant transformation [46]. In NSCLC, MYC is commonly activated, through amplification or over-expression, which leads to uncontrolled cell proliferation [47-49].

In the other hand, the NSCLC tumorigenesis also involves the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway which has been associated with high grade tumors and advanced disease [50, 51]. This pathway can be activated by the binding of PI3Ks proteins, for which PIK3CB belongs, to RAS, and is known to promote cell proliferation, growth, survival and invasion in tumor cells [52-54]. Forkhead box O (FOXO) transcription factor 3 is a downstream effector of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway leading to its inhibition [50]. Furthermore, the inhibition of the expression of this transcription factor is required for cell transformation, angiogenesis and tumor progression supporting its tumor-suppressive roles [55-57].

The anticancer properties of the extract would be based on its ability to induce cell death and inhibit cell proliferation by modulating precise molecular events. These results suggest that the extract could act as an inhibitor of the RAS/RAF/MEK/MAPK signaling pathway by the initial down-regulation of KRAS and SOS1, consequently leading to down-regulation of the proto-oncogene MYC and up-regulation of the tumor-suppressor gene RASSF1 and also, the up-regulation of FOXO3 by

modulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Additionally, it has been shown that lung adenocarcinoma cell lines, especially NCI-H23 and A549, did not exhibit the same pattern of oncogenes transcriptional expression [58]. Notably, the expression of C-MYC was much higher in NCI-H23 than in A549 cells and L-MYC transcript was only found in NCI-H23. As the extract strongly regulates MYC transcriptional expression, these results could explain the particular high sensitivity of the extract for A549 in comparison to a human lung adenocarcinoma cell line with very high level of MYC transcripts as NCI-H23.

### **Antitumor activity of the *H. caucasicus* enriched extract against Lewis lung cancer bearing mice**

The antitumor activity and its toxicity were evaluated against Lewis lung cancer bearing mice. The mice were treated with vehicle alone (PBS), 4 mg/kg cisplatin (positive control) and growing concentrations of *H. caucasicus* enriched extract (1,2.5 and 5 mg/kg) once a day from day 1 to day 4 or from day 7 to day 10. The results presented in Figure 4 show that the mice treated from day 1 to 4 with 1 mg/kg extract exhibited significant decrease about 46 % in the tumor weight in comparison with the control group ( $p=0.014$ , Mann-Whitney Rank Sum test). Moreover, when treatments were administrated from day 7 to day 10, both animal groups treated with 4 mg/kg cisplatin (47 %,  $p=0.007$ , Mann-Whitney Rank Sum test) and 1mg/kg extract (47%,  $p=0.02$ , Mann-Whitney Rank Sum test) exhibited significant decrease in the tumor weight in comparison with the control group.

The toxicity of the treatments was also evaluated by measuring the weight changes of the animals throughout the experiment. Firstly, the average percent weight change in mice treated with the vehicle, cisplatin or growing concentrations of extract was compared as illustrated in Figure 5. Negative values indicate a weight loss. In comparison with mice treated with PBS alone, only mice treated from day 1 to day 4 or from day 7 to day 10 with 4 mg/kg cisplatin exhibited significant weight loss in comparison to day 0 ( $p<0.001$ , one-way ANOVA). In contrast, the animals treated either from day 1 to day 4 or from day 7 to day 10 with the indicated concentrations of extract, mice did not present weight loss in comparison to day 0. The weight of mice treated with *H. caucasicus* extract was not significantly different to control group indicating that the extract would better tolerated and less toxic than cisplatin. Moreover, the mice treated for all conditions appeared healthy throughout

the experiments. However, it has been observed that the administration of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg of extract resulted in a high diuretic effect in Lewis lung cancer bearing mice. This effect could be caused by the presence of bufadienolides, a family of compound that have been identified in roots of some *Helleborus* species. These compounds stimulate renal sodium excretion and thus, possess diuretic property as reported earlier [59]. Taken with the antitumor activity results, for which only 1 mg/kg of extract induced a significant reduction of the tumor weight, these facts indicate that from a fairly high concentration, the extract would be more eliminated and this would explain why the extract did not induce a significant decrease in the tumor weight at concentration of 2.5 mg/kg and 5 mg/kg.

## CONCLUSION

In this study, the cytotoxic activity of *Helleborus caucasicus* enriched extract was investigated against normal and lung cancer cells. The extract was found strongly and selectively active against lung adenocarcinoma A549 cells in comparison with normal lung cells. The extract induced a G2/M phase's cell cycle slowing in adenocarcinoma A549 cells and death, in part, by apoptosis. The extract induced many transcriptional changes in A549 cells including the reduction of gene transcription of KRAS and MYC suggesting that it can act as an inhibitor of the RAS/RAF/MEK/MAPK signaling pathway. Finally, the extract possesses antitumor properties against Lewis lung cancer bearing mice without toxicity.

## REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D. and Bray F.. GLOBOCAN 2012, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. 2013 [cited 2014 12/05]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Travis W.D., Travis L. B. and Devesa S. S., Lung cancer. *Cancer*, 1995. **75**(1 Suppl): p. 191-202.
3. American Cancer Society. Lung Cancer (Non-Small Cell) [cited 2014 12/05]; Available from: <http://www.cancer.org/cancer/lungcancer-non-smallcell/detailedguide/index>.
4. Schiller J.H., Current standards of care in small-cell and non-small-cell lung cancer. *Oncology*, 2001. **61**(1 Suppl): p. 3-13.
5. Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F., and Kiss R., Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1776**(1): p. 32-57.
6. Newman R.A., Yang P., Pawlus A. D. and Block K. I., Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv*, 2008. **8**(1): p. 36-49.
7. Krenn L. and Kopp B., Bufadienolides from animal and plant sources. *Phytochemistry*, 1998. **48**(1): p. 1-29.
8. Steyn P.S. and Van Heerden F. R., Bufadienolides of plant and animal origin. *Nat Prod Rep*, 1998. **15**(4): p. 397-413.
9. Mimaki Y., Watanabe K., Sakuma C., Sakagami H. and Sashida Y., Novel Polyoxygenated Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of *Helleborus orientalis*. *Helvetica Chimica Acta*, 2003. **86**(2): p. 398-407.
10. Watanabe K., Mimaki Y., Sakagami H., and Sashida Y., Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. *J Nat Prod*, 2003. **66**(2): p. 236-41.
11. Mimaki Y., Mimaki Y., Watanabe K. and Sakagami, H., Furostanol glycosides from the rhizomes of *Helleborus orientalis*. *J Nat Med*, 2010. **64**(4): p. 452-9.
12. Milbradt A.G., Kerek F., Moroder L. and Renner C., Structural characterization of hellethionins from *Helleborus purpurascens*. *Biochemistry*, 2003. **42**(8): p. 2404-11.
13. Vochita G., Mihai C.T., Gherghel D., Iurea D., Roman G., Radu G.L., and Rotinberg P., New potential antitumoral agents of polyphenolic nature obtained from *Helleborus purpurascens*

- by membranary micro- and ultrafiltration techniques. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara*, 2011. **12**(2): p. 41-51.
14. Moreno Y., Banuls L., Katz A., Miklos W., Cimmino A., Tal D. M., Ainbinder E., Zehl M., Urban E., Evidente A., Kopp B., Berger W., Feron O., Karlish S. and Kiss, R., Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Mol Cancer*, 2013. **12**: p. 33.
  15. Lindholm P., Gullbo J., Claeson P., Goransson U., Johansson S., Backlund A., Larsson R. and Bohlin L., Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts. *J Biomol Screen*, 2002. **7**(4): p. 333-40.
  16. Bussing A. and K. Schweizer, Effects of a phytopreparation from *Helleborus niger* on immunocompetent cells in vitro. *J Ethnopharmacol*, 1998. **59**(3): p. 139-46.
  17. Jesse P., Mottke, G., Eberle, J., Seifert G., Henze G. and Prokop A., Apoptosis-inducing activity of *Helleborus niger* in ALL and AML. *Pediatr Blood Cancer*, 2009. **52**(4): p. 464-9.
  18. Rosselli S., Maggio A., Bruno M., Spadaro V., Formisano C., Irace C., Maffettone, C. and Mascolo N., Furostanol saponins and ecdysones with cytotoxic activity from *Helleborus bocconeii* ssp. *intermedius*. *Phytother Res*, 2009. **23**(9): p. 1243-9.
  19. Cakar J., Paric A., Vidic D., Haveric A., Haveric S., Maksimovic M. and Bajrovic K., Antioxidant and antiproliferative activities of *Helleborus odoratus* Waldst. & Kit, *H. multifidus* Vis. and *H. hercegovinus* Martinis. *Nat Prod Res*, 2011. **25**(20): p. 1969-74.
  20. Cheng W., Tan Y. F., Tian H. Y., Gong X. W., Chen K. L. and Jiang R. W., Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* with inhibitory activities against prostate cancer cells. *Nat Prod Res*, 2014. **28**(12): p. 901-908.
  21. Yang J., Zhang Y. H., Miao F., Zhou L. and Sun W., Two new bufadienolides from the rhizomes of *Helleborus thibetanus* Franch. *Fitoterapia*, 2010. **81**(6): p. 636-9.
  22. Muzashvili T., Skhirtladze A., Sulakvelidze T., Benidze M., Mshviladze V., Legault J., Pichette A. and Kemertelidze, E., Cytotoxic activity of *Helleborus caucasicus* A. Br., *Georg. Chem.*, 2006. **6**: p. 684-685.
  23. Sylla B., Gauthier C., Legault J., Fleury P. Y., Lavoie S., Mshvildadze V., Muzashvili T., Kemertelidze E. and Pichette A., Isolation of a new disaccharide nucleoside from *Helleborus*

- caucasicus: structure elucidation and total synthesis of hellecaucaside A and its beta-anomer. *Carbohydr Res*, 2014. **398C**: p. 80-89.
24. O'Brien J., Wilson I., Orton T. and Pognan F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
  25. Rago R., Mitchen J. and Wilding, G., DNA fluorometric assay in 96-well tissue culture plates using Hoechst 33258 after cell lysis by freezing in distilled water. *Anal Biochem*, 1990. **191**(1): p. 31-4.
  26. Moore A., Donahue C. J., Bauer K. D. and Mather J. P., Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods Cell Biol*, 1998. **57**: p. 265-78.
  27. Strober, W., Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
  28. Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T. and van Oers M. H., Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 1994. **84**(5): p. 1415-20.
  29. Wissowzky A., Ueber das Eosin als reagenz auf Hämoglobin und die Bildung von Blutgefäßen und Blutkörperchen bei Säugetier und Hühnerembryonen. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 1876: p. 479-96.
  30. Chirgwin J.M., Przybyla A. E., MacDonald R. J. and Rutter W. J., Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 1979. **18**(24): p. 5294-9.
  31. Chomczynski P. and Sacchi N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
  32. Pradervand, S., A. Paillusson, J. Thomas, J. Weber, P. Wirapati, O. Hagenbuchle, and K. Harshman, Affymetrix Whole-Transcript Human Gene 1.0 ST array is highly concordant with standard 3' expression arrays. *Biotechniques*, 2008. **44**(6): p. 759-62.
  33. Chuang, J.C., S.L. Warner, D. Vollmer, H. Vankayalapati, S. Redkar, D.J. Bearss, X. Qiu, C.B. Yoo, and P.A. Jones, S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(5): p. 1443-50.

34. Shapiro G.I. and Harper J.W., Anticancer drug targets: cell cycle and checkpoint control. *J Clin Invest*, 1999. **104**(12): p. 1645-53.
35. Hickman J.A., Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev*, 1992. **11**(2): p. 121-39.
36. Elmore S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
37. Cakar J., Haveric A., Haveric S., Maksimovic M. and Paric A., Cytotoxic and genotoxic activity of some *Helleborus* species. *Nat Prod Res*, 2014. **28**(12): p. 883-7.
38. Massion P.P. and Carbone D. P., The molecular basis of lung cancer: molecular abnormalities and therapeutic implications. *Respir Res*, 2003. **4**: p. 12.
39. Larsen J. E. and Minna J. D., Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*, 2011. **32**(4): p. 703-40.
40. Greulich H., The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. *Genes Cancer*, 2010. **1**(12): p. 1200-10.
41. Rodenhuis S., Slebos R. J., Boot A. J., Evers S. G., Mooi W. J., Wagenaar S. S., Van Bodegom P. C. and Bos J. L., Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, 1988. **48**(20): p. 5738-41.
42. Reynolds S.H., Anna C. K., Brown, K. C., Wiest J. S., Beattie E. J., Pero R. W., Iglehart J. D. and Anderson, M. W., Activated protooncogenes in human lung tumors from smokers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991. **88**(4): p. 1085-9.
43. Chardin, P., et al., Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science*, 1993. **260**(5112): p. 1338-43.
44. Hesson L.B., Cooper W.N., and Latiff., The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers*, 2007. **23**(1-2): p. 73-87.
45. Kim D.H., Kim J.S., Park J.H., Lee S.K., Ji Y.I., Kwon Y.M., Shim Y.M., Han J. and Park J., Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 2003. **63**(19): p. 6206-11.
46. Chen, H., Suzuki M., Nakamura Y., Ohira M., Ando S., Iida T., Nakajima T., Nakagawara A. and Kimura H., Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 2006. **15**(5): p. 1281-5.

47. Richardson G.E. and Johnson B.E., The biology of lung cancer. *Semin Oncol*, 1993. **20**(2): p. 105-27.
48. Adhikary S. and Eilers M., Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(8): p. 635-45.
49. Nau M.M., Brooks B.J. Jr., Carney D.N., Gazdar A.F., Battey J.F., Sausville E.A., Minna J.D., Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986. **83**(4): p. 1092-6.
50. Fumarola C., Bonelli M.A., Petronini P.G. and Alfieri R.R., Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non-small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*, 2014. **90**(3): p. 197-07.
51. Scrima M., De Marco C., Fabiani F., Franco R., Pirozzi G., Rocco G., Ravo M., Weisz A., Zoppoli P., Ceccarelli M., Botti G., Malanga D. and Viglietto G., Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e30427.
52. Engelman J.A., Luo J., and Cantley L.C., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet*, 2006. **7**(8): p. 606-19.
53. Vivanco I. and C.L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(7): p. 489-501.
54. Hay N., The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 179-83.
55. Paik, J.H., et al., FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell*, 2007. **128**(2): p. 309-23.
56. Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J. and Greenberg M.E., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
57. Yang J.Y., Zong C.S., Xia W., Yamaguchi H., Ding Q., Xie X., Lang J.Y., Lai C.C., Chang C.J., Huang W.C., Huang H., Kuo H.P., Lee D.F., Li L.Y., Lien H.C., Cheng X., Chang K.J., Hsiao C.D., Tsai F.J., Tsai C.H., Sahin A.A., Muller W.J., Mills G.B., Yu D., Hortobagyi G.N. and Hung M.C., ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(2): p. 138-48.
58. Kiefer P.E., Weigmann B., Bacher M., Erbil, C., Heidtmann H. and Havemann K., Different pattern of expression of cellular oncogenes in human non-small-cell lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1990. **116**(1): p. 29-37.

59. Doris P.A.and Bagrov A. Y., Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **218**(3): p. 156-67.

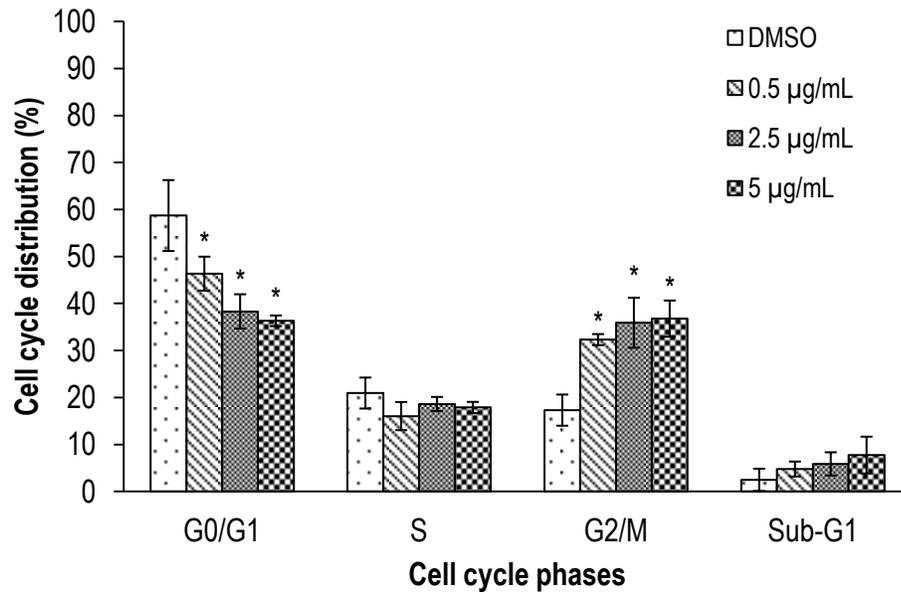
**Table 1. Cytotoxic activity of *H. caucasicus* enriched extract against normal and lung cancer cell lines.**

Cell lines	IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>a</sup>		IC <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>b</sup>	
	Extract	Etoposide	Extract	Etoposide
A549	0.02 ±0.01	0.8 ±0.5	0.03 ±0.02	0.8 ±0.3
A549-dox-r <sup>c</sup>	0.11 ±0.04	8 ±8	0.10 ±0.05	10 ±10
NCI-H23	0.12 ±0.06	2 ±1	0.18 ±0.08	2 ±1
LLC1	0.4 ±0.2	1.7 ±0.9	0.4 ±0.2	2 ±1
HEL-299	0.10 ± 0.05	1.9 ±0.9	0.10 ±0.04	2 ±2
MRC-5	0.10±0.1	2 ±1	0.12 ±0.09	3 ±1

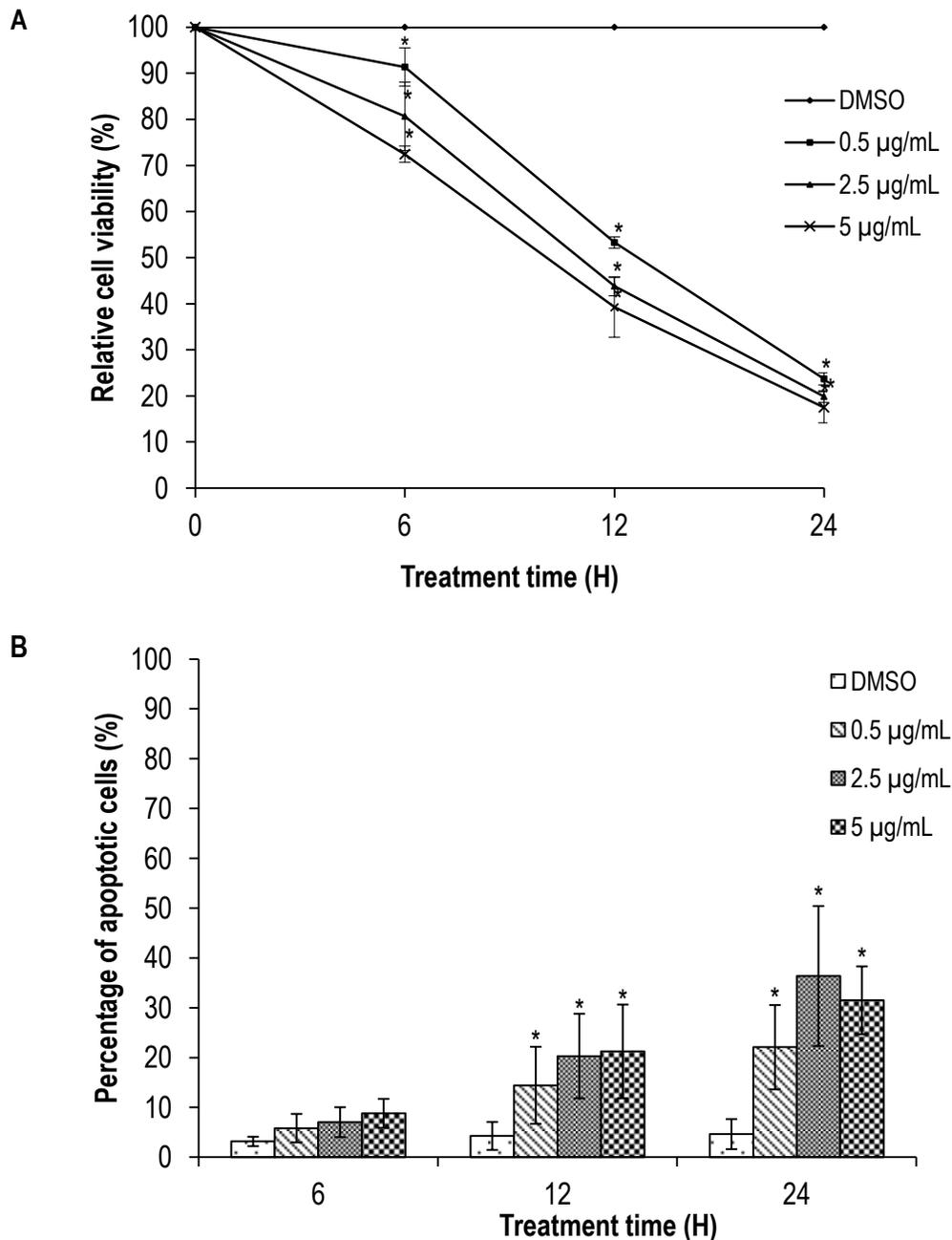
<sup>a</sup>Concentration inhibiting 50% of cell growth using resazurin assay;

<sup>b</sup>Concentration inhibiting 50% of cell growth using Hoechst assay;

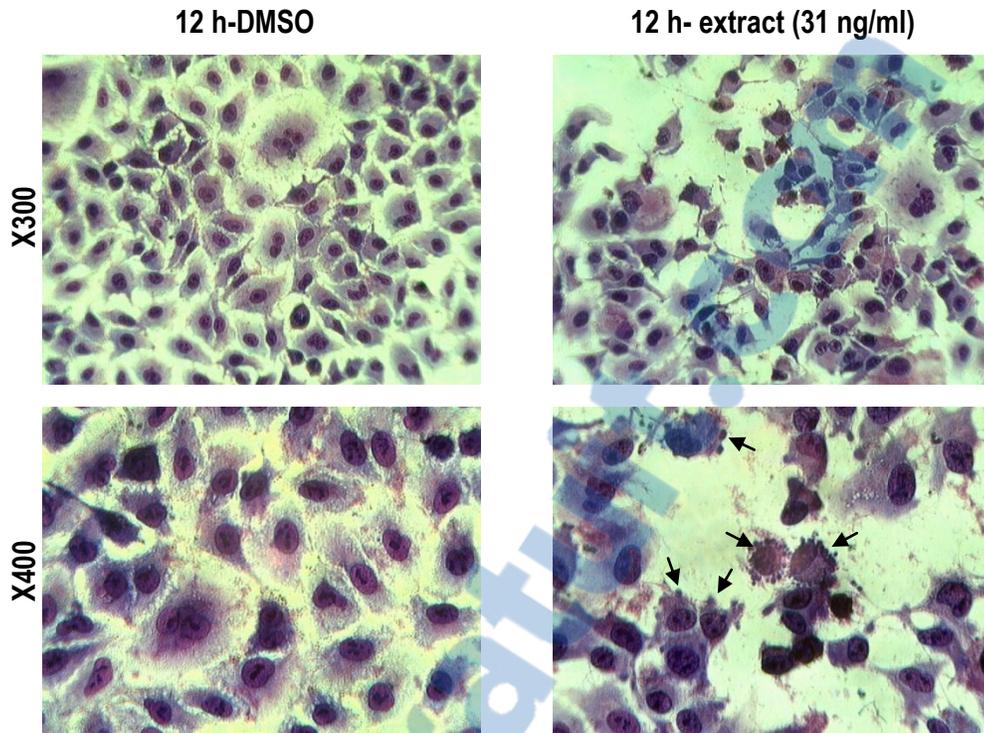
<sup>c</sup>A549 doxorubicin-resistant cells.



**Figure 1. Cell cycle analysis of A549 human lung adenocarcinoma cells following treatment with *H. caucasicus* enriched extract.** A549 cells were treated with 0.5, 2.5 and 5 µg/mL extract for 24 h then stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. Results are expressed as the average percentages  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. \*Significantly different from DMSO treated cells,  $p < 0.001$ , two-way ANOVA.



**Figure 2. Analysis of A549 cells viability and induction of apoptosis by *H. caucasicus* enriched extract.** A549 cells were treated with 0.5, 2.5 and 5 µg/mL extract for 6h, 12h or 24h then stained with trypan blue and counted. For each condition, relative viability was expressed as a average percentage considering DMSO treated cells as 100% viability (A). A549 cells treated with 0.5, 2.5 and 5 µg/mL extract for 6h, 12h or 24h were stained with Annexin V-FITC and SYTOX Green dye then analysed by flow cytometry. \*Significantly different from DMSO treated cells,  $p < 0.05$ , two-way ANOVA. (B). Results are presented as the average percentages  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. \*Significantly different from DMSO treated cells,  $p < 0.05$ , two-way ANOVA.



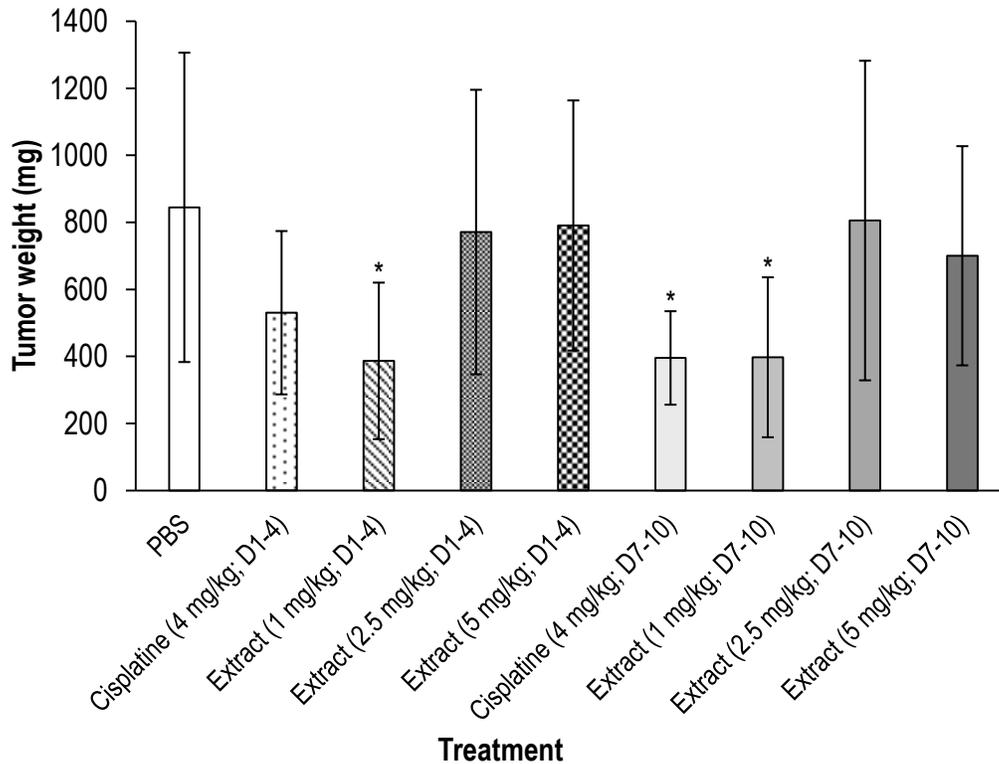
**Figure 3. Apoptotic cells revealed by hematoxylin and eosin staining in A549 cells.** A549 cells were treated for 12hours with DMSO, considered as negative control (left panel) or with *H. caucasicus* extract 31 ng/ml (right panel). Cells were stained with hematoxylin/eosin. A549 cells were observed using confocal microscopy at a magnification of 300X and 400X. Black arrows indicate specific apoptotic morphological changes.

Rapport

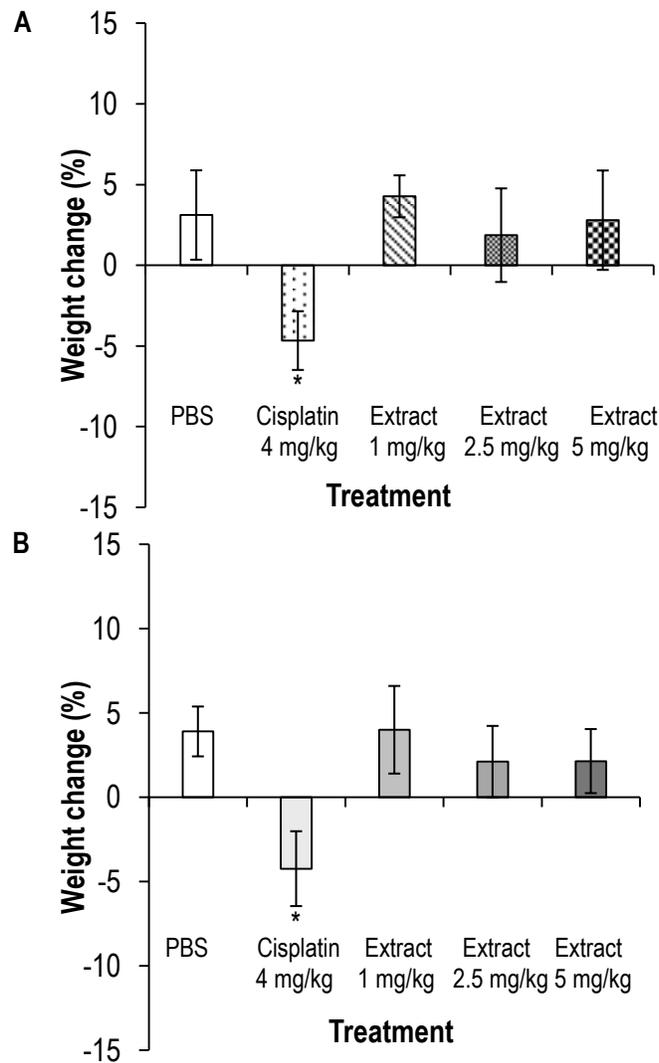
**Tableau 2. Differentially expressed transcripts of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with 2.5 µg/mL of *H. caucasicus* enriched extract.**

Transcripts symbols	Transcripts Name	Probe ID	Fold Change	P-value
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	16762399	-1.36	3.12x10 <sup>-3</sup>
SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)	16896710	-1.37	5.88 x10 <sup>-4</sup>
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog avian	17072669	-2.43	3.37 x10 <sup>-5</sup>
PIK3CB	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta	16959701	-1.54	1.94x10 <sup>-3</sup>
FOXO3	forkhead box O3	17011450	1.5	2.49 x10 <sup>-4</sup>
RASSF1	Ras association (RAIGDS/AF-6)	16954440	1.64	6.48 x10 <sup>-5</sup>

A549 were exposed for different times (4, 6 and 8 h) to 2.5 µg/mL of the extract or solvent DMSO (negative control), after which the RNA were harvested. Transcriptome analysis was performed for more than 40000 transcripts using the GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array. The first and second columns indicate transcripts symbols and corresponding names, found to be significantly up-regulated or down regulated, in the particular case of NSCLC. Corresponding probes used for transcriptome analysis are indicated in the third column. For each transcripts, fold-changes in comparison with DMSO, and corresponding p-values obtained after t-statistics, are presented in the two last columns. All transcripts presented in the table are considered as significantly up-regulated or down-regulated. Data shown are from a single experiment.



**Figure 4. Evaluation of antitumor activity of *H. caucasicus* extract against Lewis lung cancer bearing mice.** C57BL/6 NCrI mice inoculated with LLC1 cells were treated with PBS (negative control), 4 mg/kg cisplatin (positive control), 1, 2.5 or 5 mg/kg of extract from day 1 to day 4 or from day 7 o day 10. Mice were euthanized at day 18 and tumors were excised and weighted. Results are expressed as the average of tumor weights  $\pm$  standard deviation. \*Significantly different from PBS treated mice, Mann-Whitney Rank Sum test.



**Figure 5. Evaluation of toxicity of *H. caucasicus* enriched extract in Lewis lung cancer bearing mice.** C57BL/6 NCrI mice bearing Lewis Lung tumor were treated with PBS (negative control), 4 mg/kg cisplatin (positive control), 1; 2.5 or 5 mg/kg extract from day 1 to day 4 (A) or from day 7 to day 10 (B). Animals were weighted throughout the experiment to determine toxicity. Weight changes were expressed as percentages and calculated using the following formula:  $[(W_4 - W_1)/W_1] \times 100\%$  or  $[(W_{10} - W_7)/W_7] \times 100\%$  where  $W_n$  was the mouse weight at day  $n$ . Results are expressed as the average percent weight change  $\pm$  the standard deviation. Negative values indicate a weight loss. \*Significantly different from PBS treated mice,  $p < 0.001$ , one-way ANOVA.

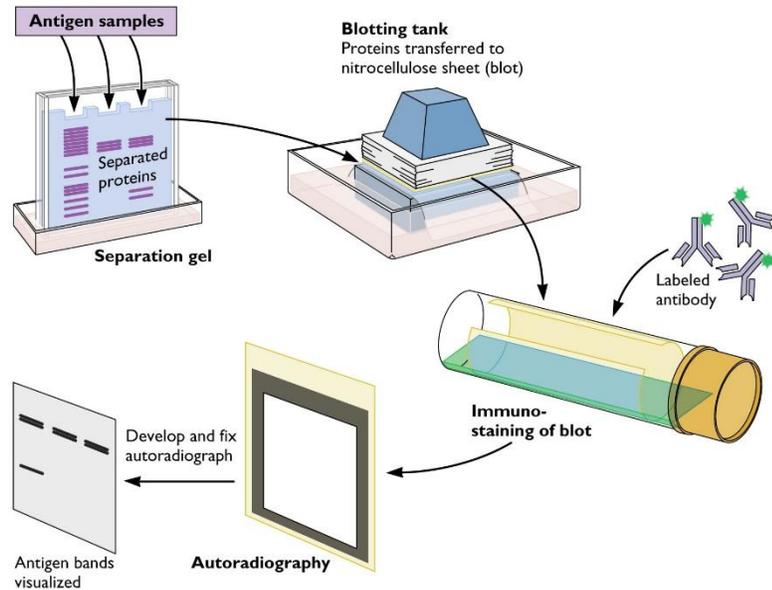
## CHAPITRE 4 ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'EXTRAIT SUR L'EXPRESSION ET LA LOCALISATION SUBCELLULAIRE DE SAM68, SOUS SA FORME NATIVE

### 1 Introduction :

Comme il a été décrit au chapitre 1 section 2, l'implication de la protéine de liaison SAM68 dans une variété de voies de signalisation modulant des processus biologiques normaux incluant le cycle cellulaire, l'apoptose et la mitose, mais également dans les mécanismes aboutissant à la cancérogénèse, confère à la protéine un statut de nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer.

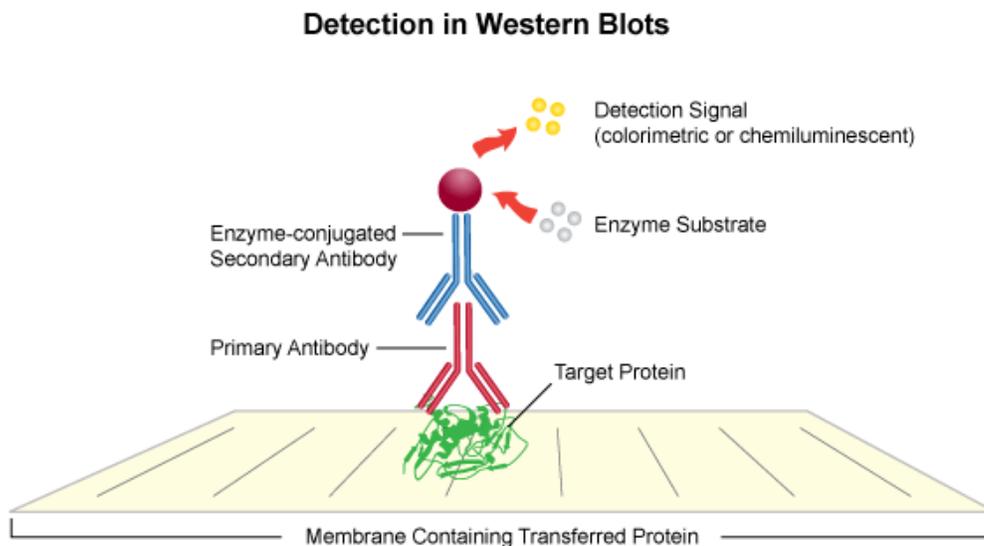
Aussi, afin de répondre au dernier sous-objectif de l'étude présentée dans ce mémoire à savoir, caractériser le mécanisme d'action de l'extrait, on cherche à caractériser par immunobuvardage de type Western, une éventuelle modulation de l'expression et de la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 (c'est-à-dire n'ayant pas subi de modifications post-traductionnelles) induite par l'extrait sur un modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain (A549). On cherche donc de ce fait, à corroborer le potentiel anticancéreux de l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* avec son action sur la protéine SAM68. À ce jour, aucune étude attribue à la modulation de l'expression, de la localisation subcellulaire ou de l'activité de cette protéine par les glycosides cardiaques, que ce soit cardiénolides ou bufadiénolides, présents dans la plante n'a été reportée.

La technique de l'immunobuvardage de type *Western* employée ci-après, est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter, d'identifier et de quantifier l'expression d'une protéine particulière extraite d'un échantillon biologique donné (sang ou tissu par exemple). Comme présenté en figure 17 ci-après, cette technique comporte trois étapes principales. La première étape consiste à faire migrer par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les échantillons protéiques obtenus après extraction. Les protéines chargées négativement, migrent alors selon leur seul poids moléculaire et de ce fait, sont séparées les unes des autres selon cette seule propriété. La deuxième étape consiste à transférer ces protéines sur un autre support, soit une membrane de nitrocellulose ou de PVDF, qui possède la propriété de fixer les protéines de façon non-spécifique.



**Figure 18: Principales étapes de l'immunobuvardage de type *Western* menant à la détection de protéines d'intérêt [230].**

C'est enfin, la troisième étape de l'immunobuvardage de type *Western*, qui consiste à détecter la ou les protéine(s) d'intérêt. Comme présenté en figure 18 ci-après, cette étape s'effectue au moyen d'un anticorps primaire spécifiquement dirigé contre tout ou partie de la protéine, donc possédant la propriété de s'y attacher.



**Figure 19: Principe de détection de protéine d'intérêt par immunobuvardage de type *Western* [231].**

On utilise enfin un anticorps secondaire couplé à une enzyme, le plus souvent la peroxydase de raifort, et spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire, pour détecter et identifier la protéine d'intérêt par réaction avec un agent chimio-luminescent. La réaction chimique entre l'enzyme fixée à l'anticorps secondaire et le réactif, aboutit à la production de lumière, détectable visuellement et proportionnelle à la quantité de la protéine d'intérêt.

## **2 Matériels et Méthodes :**

### **2.1 Anticorps primaires et secondaires :**

Concernant l'évaluation par immunobuvardage de type *Western* de l'effet de l'extrait sur l'expression et la localisation subcellulaire de SAM68, l'anticorps primaire anti-SAM68 utilisé était un anticorps monoclonal anti-SAM68 (sc-1238) provenant de Santa Cruz Biotechnology [*SAM68 clone 7-1 (sc-1238) mouse monoclonal IgG*]. Cet anticorps est spécifiquement dirigé contre les acides aminés 331 à 443 de la protéine. L'anticorps secondaire correspondant était un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase de raifort (HRP), provenant de *Jackson Immunoresearch*. L'anticorps primaire utilisé pour contrôler la charge de matériel protéique testé, était un anticorps polyclonal anti- $\beta$ -actine provenant de Santa Cruz Biotechnology [Actin (I-19) sc1616]. L'anticorps secondaire correspondant était un anticorps anti-chèvre couplé à la peroxydase de raifort.

### **2.2 Lignée utilisée et culture cellulaire :**

Les expérimentations concernant l'évaluation par immunobuvardage de type *Western* de l'effet de l'extrait sur l'expression et la localisation subcellulaire de SAM68 ont été effectuées à partir de la lignée cellulaire A549, une lignée d'adénocarcinome pulmonaire humain obtenue auprès de l'*American Type Culture Collection*. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 1% de mélange multi-vitaminique et 1% d'un mélange d'antibiotique contenant les mêmes proportions de pénicilline et de streptomycine. Tout au long de la culture, les cellules ont été conservées à 37°C dans un incubateur contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.3 Stimulation des A549 et évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type *Western*:

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de  $3 \times 10^5$  cellules par puits et incubées une nuit à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pour permettre l'adhésion cellulaire. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 6, 8 ou 12h au DMSO ou au milieu de culture seul (contrôles négatifs) ou encore à des concentrations croissantes (0,5; 2,5 ou 5 µg/mL) d'extrait, préalablement dissout dans du DMSO, puis ajouté au milieu de culture à hauteur d'une concentration finale de 0,5% v/v, afin de prévenir d'une éventuelle cytotoxicité liée au solvant. Pendant toute la durée de stimulation, les cellules ont été maintenues à l'incubation sous 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Une fois la stimulation terminée, les milieux de culture respectifs ont été prélevés, les tapis cellulaires ont été rincés au PBS 1X puis les cellules ont été récoltées par trypsinisation. A ce stade, un compte cellulaire a été effectué par test d'exclusion au bleu trypan, afin de standardiser tous les échantillons à  $3 \times 10^5$  A549. Chaque échantillon a ensuite été lavé avec du PBS1X puis centrifugé à 300xg pendant 1 minute à 4°C. Les culots ont ensuite été resuspendus dans une proportion égale de PBS 1X et de tampon de Laemmli 2X bouillant dont la composition est indiquée au tableau 4, ci-dessous.

**Tableau 4. Composition du tampon de Laemmli 2X.**

Composants	Concentration finale
Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
SDS (Sodium Dodécyl Sulfate)	8%
β-Mercaptoéthanol	10%
Glycérol	17%
Orthovanadate	5 mM
Aprotinine et Leupeptine	20 µg/mL
Bleu de bromophénol	0,5%

Les échantillons ont ensuite été vortexés, bouillis à 95°C pendant 7 minutes, puis centrifugés brièvement afin d'en faire redescendre la condensation. Les échantillons ont ensuite été soumis à

électrophorèse en SDS-PAGE en utilisant un gel de séparation des protéines contenant un gradient d'acrylamide de 7,5-20% et un gel d'empilement contenant 4,32% d'acrylamide. Après électrophorèse, les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène).

L'immunobuvardage de type *Western* été réalisé après blocage de la membrane de transfert dans une solution contenant 5% p/v de lait en poudre dilué dans du TBS-Tween 0,15% v/v, lavage avec du TBS-Tween 0,15% v/v puis utilisation des anticorps primaires anti-SAM68 (sc-1238), décrits plus haut, dilués à 1 :500 dans du TBS-Tween 0,15% v/v. Les anticorps secondaires anti-souris (cf. plus haut) utilisés ont été dilués à 1:10000 dans du TBS-Tween 0,15% v/v et la révélation a été effectuée par chimioluminescence en utilisant une solution d'ECL (*Enhanced chemiluminescent*). Les bandes obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel Image J 1.48 (*Wayne Rasband, National Institutes of Health*). Les valeurs de densitométrie obtenues pour SAM68, normalisées en utilisant les valeurs de densitométrie obtenues pour le témoin de charge, la  $\beta$ -Actine, ont été exprimées sous forme d'intensités relatives en considérant les échantillons stimulés au DMSO (contrôle négatif) comme valeur standard.

#### **2.4 Stimulation des A549 et évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type *Western*:**

Les cellules ont étéensemencées en plaque 6 puits à raison de  $3 \times 10^5$  cellules par puits et placées une nuit à l'incubation sous 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> pour adhésion. Les cellules ont ensuite été stimulées pendant 6h au DMSO ou au milieu de culture seul (contrôles négatifs) ou encore à des concentrations croissantes (0,5; 2,5 ou 5  $\mu\text{g/mL}$ ) d'extrait, préalablement dissout dans du DMSO, puis ajouté au milieu de culture à hauteur d'une concentration finale de 0,5% v/v, afin de prévenir d'une éventuelle cytotoxicité liée au solvant. Pendant toute la durée de stimulation, les cellules ont été maintenues à l'incubation sous 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Une fois la stimulation terminée, les milieux de culture respectifs ont été prélevés, les tapis cellulaires ont été rincés au PBS 1X puis les cellules ont été récoltées par trypsinisation. À ce stade, un compte

cellulaire a été effectué par test d'exclusion au bleu trypan, afin de standardiser tous les échantillons à  $3 \times 10^5$  A549. Chaque échantillon a ensuite été lavé avec du PBS1X puis centrifugé à 300xg pendant 1 minute à 4°C. Les culots ont ensuite été resuspendus soit dans une proportion égale de PBS 1X et de tampon de Laemmli 2X bouillant (cf. tableau 6) puis bouillis pendant 7 minutes à 95°C, soit dans une proportion égale de tampon de lyse hypotonique dont la composition est indiquée au tableau 5 ci-après puis placés pendant 5 minutes à 4°C.

**Tableau 5. Composition du tampon de lyse hypotonique.**

Composants	Concentration finale
NP40	0,1%
Tris HCl pH 7,4	20 mM
NaCl	10 mM
EDTA pH 7,4	1 mM
Orthovanadate	2 mM
Aprotinine et Leupeptine	10 µg/mL
PMSF	2 mM
SBTI (Soybean trypsin inhibitor)	50 µg/mL

Les échantillons lysés à 4°C dans le tampon de lyse hypotonique ont été centrifugés à 400xg pendant 10 minutes. Une proportion égale de surnageant a été ajoutée à une proportion égale de tampon de Laemmli 2X bouillant. Ces échantillons représentent les fractions cytoplasmiques. Les culots ont quant à eux été resuspendus dans du tampon de lyse hypotonique puis mélangés à une proportion équivalente de tampon de Laemmli 2X bouillant. Ces échantillons représentent les fractions nucléaires.

Les échantillons représentant les fractions nucléaires et cytoplasmiques ainsi que les lysats cellulaires totaux ont ensuite été vortexés, bouillis à 95°C pendant 7 minutes, puis centrifugés brièvement afin d'en faire redescendre la condensation. Les échantillons ont ensuite été soumis à

électrophorèse en SDS-PAGE en utilisant un gel de séparation des protéines contenant un gradient d'acrylamide de 7,5-20% et un gel d'empilement contenant 4,32% d'acrylamide. Après électrophorèse, les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de PVDF.

L'immunobuvardage de type *Western* a été réalisé après blocage de la membrane de transfert dans une solution contenant 5% p/v de lait en poudre dilué dans du TBS-Tween 0,15% v/v, lavage avec du TBS-Tween 0,15% v/v puis utilisation des anticorps primaires anti-SAM68 (sc-1238), décrits plus haut, dilués à 1 :500 dans du TBS-Tween 0,15% v/v. Les anticorps secondaires anti-souris (cf. plus haut) utilisés ont été dilués à 1:10000 dans du TBS-Tween 0,15% v/v et la révélation a été effectuée par chimioluminescence en utilisant une solution d'ECL (*Enhanced chemiluminescent*). Les bandes obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel Image J 1.48 (*Wayne Rasband, National Institutes of Health*). Les valeurs de densitométrie obtenues pour SAM68, normalisées en utilisant les valeurs de densitométrie obtenues pour le témoin de charge, la  $\beta$ -Actine, ont été exprimées sous forme d'intensités relatives en considérant les échantillons stimulés au DMSO (contrôle négatif) comme valeur standard.

## **2.5 Contrôle des charges par évaluation des niveaux de $\beta$ -Actine après détachement des anticorps des membranes:**

Pour les deux types d'expérimentations, le contrôle des niveaux de protéines chargées a été effectué après détachements des anticorps des membranes puis incubation avec un anticorps primaire anti- $\beta$ -actine (cf. plus haut). Brièvement, les membranes ont subi une série de lavage au TBS-Tween 0,15% v/v puis mises en contact pendant 15 minutes, avec une solution de détachement des anticorps douce, provenant de *Thermo Fisher scientific Incorporation*. Les membranes ont ensuite été lavées puis bloquées avec une solution de TBS-Tween 0,15% v/v contenant 5% p/v de lait en poudre. Les immunobuvardages des membranes ont été effectués à nouveau en utilisant des anticorps anti- $\beta$ -actine dilués à 1 :1000 dans du TBS-Tween 0,15 % v/v puis des anticorps secondaires anti-chèvre couplés à la HRP. La révélation a été effectuée par chimioluminescence en utilisant une solution d'ECL (*Enhanced chemiluminescent*). Les bandes obtenues ont été analysées en utilisant le logiciel Image J 1.48 (*Wayne Rasband, National Institutes of Health*).

### 3 Résultats :

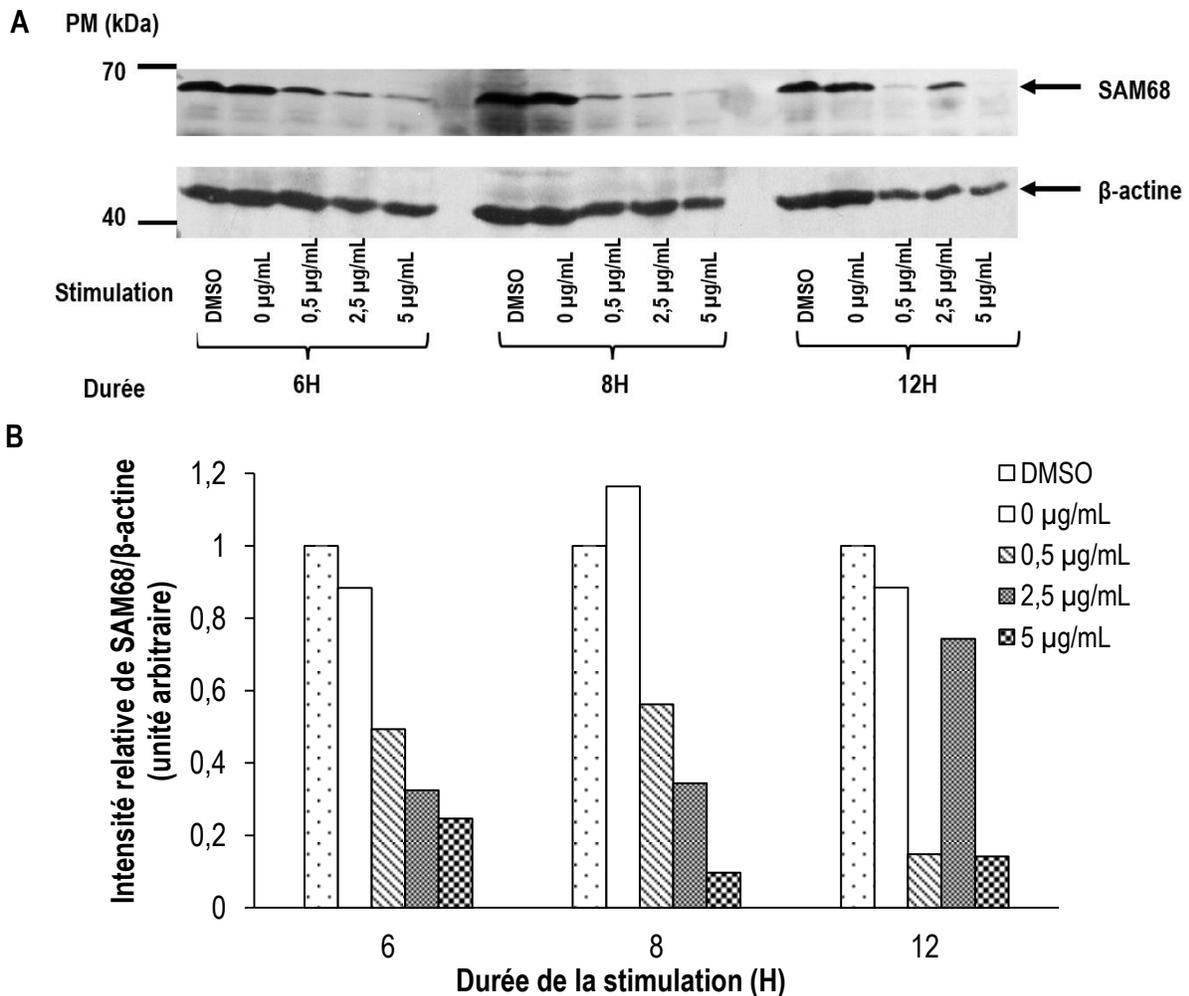
#### 3.1 **Évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type *Western* dans un modèle de lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain:**

Après traitement des cellules A549 pendant 6, 8 ou 12h avec des concentrations croissantes (0,5;2,5 ou 5 µg/mL) d'extrait, l'expression relative de la forme native de SAM68 a été mesuré par immunobuvardage de type *Western* tel que présenté à la figure 18. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Après 6h de stimulation aux concentrations d'extrait indiquées à la figure 18, l'expression relative de SAM68, sous sa forme native, se trouvait diminuée par rapport au contrôle négatif (DMSO). L'expression relative de la forme native de SAM68 présente dans l'échantillon traité avec le DMSO présentait une valeur similaire à celle de l'échantillon non traité (0 µg/mL), indiquant que le solvant de l'extrait n'avait pas induit de changements notoires quant à l'expression de la forme native de cette protéine chez les cellules A549. En revanche, le traitement des cellules A549 avec des concentrations de 0,5; 2,5 et 5 µg/mL d'extrait aboutissait respectivement à une diminution d'environ 50, 70 et 75% de l'expression relative de SAM68 sous sa forme native, par rapport aux cellules A549 incubées avec du DMSO.

Après 8h de stimulation aux concentrations d'extrait indiquées, l'expression relative de SAM68, sous sa forme native, se trouve diminuée par rapport au contrôle négatif (DMSO). L'expression relative de la forme native de SAM68 présente dans l'échantillon traité avec le DMSO présentait une valeur similaire à celle de l'échantillon non traité (0 µg/mL), indiquant que le solvant de l'extrait n'avait pas induit de changements notoires quant à l'expression de la forme native de cette protéine chez les cellules A549. En revanche, le traitement des cellules A549 en présence d'une concentration croissante d'extrait de 0,5; 2,5 et 5 µg/mL induisait une diminution dose-dépendante, respectivement, d'environ 50, 70 et 90% de l'expression relative de SAM68 sous sa forme native en comparaison des cellules incubées en présence de DMSO seul.

Finally, after 12h of treatment at the indicated concentrations of extract, the relative expression of SAM68 was reduced compared to the negative control (DMSO). The relative expression of the native form of SAM68 present in the sample treated with DMSO had a value similar to that of the untreated sample (0 µg/mL), indicating that the solvent of the extract did not induce any significant changes in the expression of the native form of this protein in A549 cells. On the contrary, the treatment of A549 cells with concentrations of 0.5 and 5 µg/mL of extract induced in both cases, a decrease of about 85% of the relative expression of SAM68 in its native form, compared to A549 cells incubated only with DMSO.



**Figure 20: Évaluation de l'effet de l'extrait sur l'expression de la forme native de SAM68 dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, A549.** Les cellules A549 ont été stimulées aux concentrations croissantes d'extrait (0,5; 2,5; 5  $\mu$ g/mL) ou incubées avec ou sans DMSO (0  $\mu$ g/mL) comme contrôle négatif et pour les durées indiquées. Pour chaque condition, des aliquotes cellulaires ont été lysées dans des volumes équivalents de tampon de Laemmli 2X bouillant. Les lysats cellulaires totaux résultant, ont été soumis à un immunobuvardage de type *Western* (A). Les résultats obtenus ont été analysés par densitométrie en utilisant Image J1.48 après normalisation des valeurs de densitométrie obtenues pour SAM68 grâce au témoin de charge, la  $\beta$ -Actine. Les résultats ont ensuite été exprimés sous forme d'intensités relatives en considérant les échantillons stimulés au DMSO comme valeur standard, soit 1 (B). Les résultats présentés sont issus d'une seule expérience représentative de 3 expériences indépendantes.

### 3.2 Évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 par immunobuvardage de type *Western* dans un modèle de lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humain:

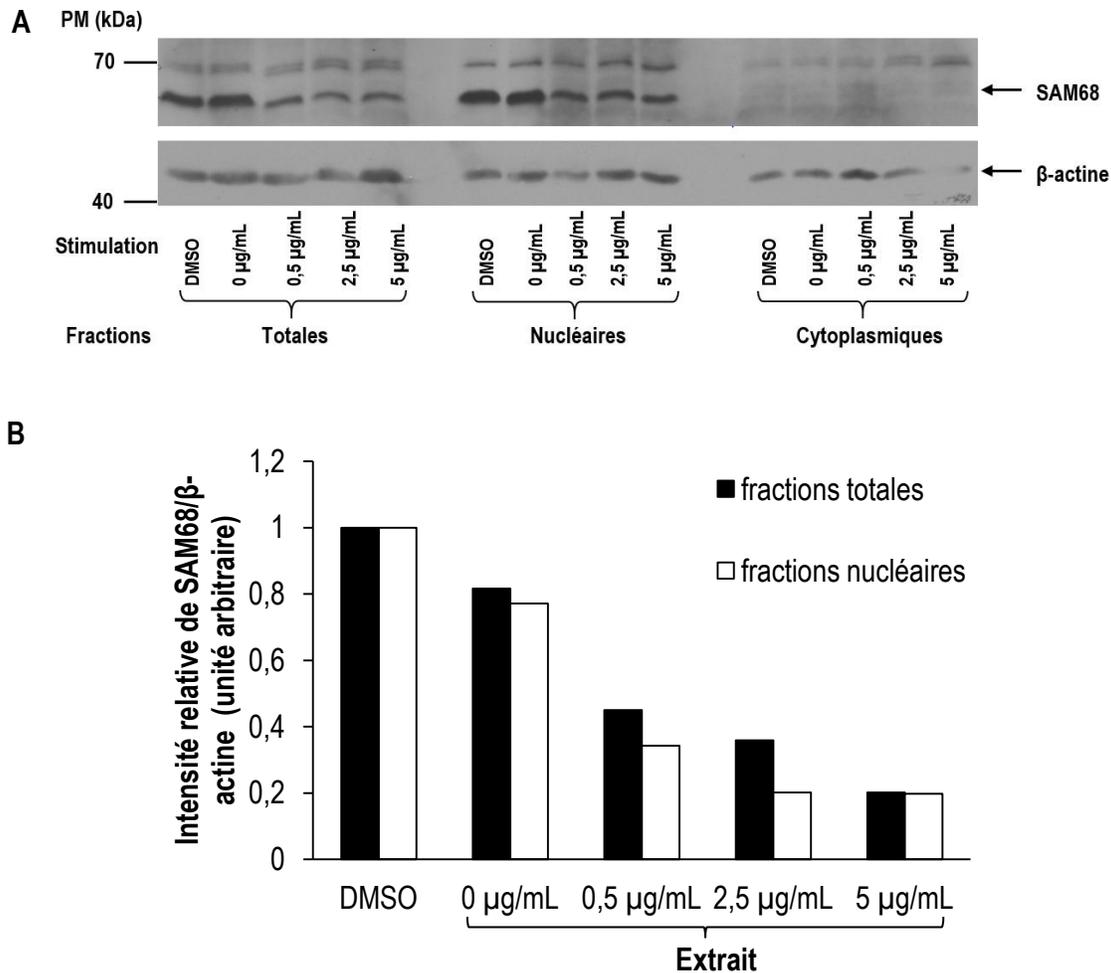
Après traitement des cellules A549 pendant 6 heures en présence de DMSO ou du milieu de culture seul (contrôles négatifs) ou encore à des concentrations croissantes (0,5;2,5 ou 5 µg/mL) d'extrait, l'expression relative de la forme native de SAM68 présente dans les fractions totales, les fractions nucléaires (insolubles) et les fractions cytoplasmiques (solubles) a été mesurée par immunobuvardage de type *Western*. Pour chaque échantillon, l'expression relative de la protéine a été normalisée selon le témoin de charge, la β-actine, et exprimée sous forme d'intensité relative en considérant les échantillons stimulés au DMSO, comme contrôles tel que présenté en figure 19. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Tel que rapporté à la section précédente et à la figure 19, l'expression relative de SAM68 (forme native), obtenue à partir des lysats totaux de cellules A549 traitées pendant 6 heures à des concentrations croissantes (0,5;2,5 ou 5 µg/mL) d'extrait se trouvait diminuée par rapport au contrôle DMSO. En effet, le traitement des cellules A549 avec des concentrations de 0,5; 2,5 et 5 µg/mL d'extrait aboutissait respectivement à une diminution d'environ 50, 60 et 80% de l'expression relative de SAM68 sous sa forme native, par rapport aux A549 stimulées au DMSO. Ces valeurs sont très similaires à celles obtenues à l'expérience précédente, dans les mêmes conditions.

Il est à noter que pratiquement aucune trace de la forme native de SAM68 n'était détectable dans les fractions cytoplasmiques, et ce, quel que soit le type de stimulation. En revanche, SAM68 était bien détectable dans les fractions nucléaires, et ce, quel que soit le type de stimulation. La quantification relative de SAM68 dans ces fractions est indiquée en figure 19B, sous forme de graphique représentant l'intensité relative des bandes vis-à-vis du contrôle DMSO, après normalisation au témoin de charge, en fonction du type de traitement. À ce sujet, l'expression relative de la forme native de SAM68 présente dans les fractions nucléaires obtenues à partir des A549 stimulées aux concentrations indiquées d'extrait, se trouvait diminuée par rapport au contrôle négatif (DMSO). Cette diminution notable dans les fractions nucléaires suivait la diminution d'expression de la protéine présente dans les fractions totales et les ratios de diminution étaient relativement similaires

(environ 50, 65 et 80% de diminution par rapport au contrôle DMSO, correspondant respectivement à des traitements des cellules A549 avec 0,5 ; 2,5 et 5 µg/mL d'extrait).

Fait remarquable, l'anticorps anti-SAM68 semblait également détecter la protéine à un poids moléculaire d'environ 70 kDa, à des niveaux d'intensité différents mais pour tous les échantillons testés. L'intensité de ces bandes semblait constante pour les fractions totales (colonnes 1 à 5) et nucléaires (colonnes 6 à 10). Dans les fractions cytoplasmiques (colonnes 11 à 15), ces bandes semblaient néanmoins plus intenses lorsque la concentration d'extrait utilisée pour traiter les A549 augmentait.



**Figure 21: Évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de la forme native de SAM68 dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, A549.** Les cellules A549 ont été traitées pendant 6 heures aux concentrations indiquées d'extrait, de milieu de culture seul ou de DMSO (contrôle négatif). Des aliquotes de suspension cellulaires ont ensuite été soit directement transférées dans des volumes équivalents de tampon de Laemmli 2X bouillant (colonnes 1 à 5), soit dans des volumes équivalents de tampon de lyse hypotonique (colonnes 6 à 15). Les fractions nucléaires et cytoplasmiques ont été obtenues après centrifugation des échantillons à 4°C pendant 10 minutes suite à quoi, une proportion égale de surnageant pour chaque condition a été ajoutée à une proportion égale de tampon de Laemmli 2X bouillant (fractions cytoplasmiques). Les culots ont été resuspendus dans du tampon de lyse hypotonique puis ajoutés à une proportion équivalente de tampon de Laemmli 2X bouillant (fractions nucléaires). Tous les échantillons ont été soumis à un immunobuvardage de type *Western* (A) et les résultats obtenus ont été analysés par densitométrie en utilisant Image J 1.48 après normalisation des valeurs de densitométrie obtenues pour SAM68 grâce au témoin de charge, la  $\beta$ -Actine. Pour les fractions cellulaires totales et nucléaires, les résultats ont ensuite été exprimés sous forme d'intensités relatives en considérant les échantillons stimulés au DMSO comme valeur standard, soit 1 (B). Les résultats présentés sont issus d'une seule expérience, représentative de 3 expériences indépendantes.

#### 4 Discussion :

Les résultats présentés dans ce chapitre indiquent deux points. Dans un premier temps, l'extrait semble provoquer une diminution dose et temps-dépendants de l'expression de la forme native de SAM68 allant de 50 à 90% dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, A549, dépendamment de la concentration d'extrait utilisée pour les stimuler et de la durée de cette stimulation. Cependant, il serait pertinent de déterminer si l'extrait stimule la dégradation de la protéine native ou encore provoque une diminution de la synthèse de cette protéine par des voies de signalisation localisées en amont.

Il a été montré que l'expression de SAM68, sous sa forme native, était régulée à la hausse dans une lignée cellulaire de cancer de la prostate (PCa) et que la surexpression consécutive de la protéine permettrait la prolifération et la survie de ces cellules cancéreuses [169, 191]. De même, Richard et al. ont suggéré que de forts niveaux de la protéine seraient requis pour la transformation néoplasique de cellules du cancer du sein [215]. Dans le cas des carcinomes thyroïdiens, il a également été montré qu'une diminution induite de la forme endogène de SAM68 abolissait la transformation néoplasique médiée par la protéine de fusion MLL-EEN [224]. Enfin, Zhang et al. ont constaté à partir de biopsies de tumeurs de CPNPC que l'expression de la SAM68 (sous sa forme native) était relativement élevée, en comparaison des tissus sains avoisinants les tumeurs. Il s'avérait en outre que cette importante expression de la protéine était significativement corrélée avec la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques et avec des stades de la maladie [226]. Aussi, on peut supposer que la diminution de l'expression de SAM68 (sous sa forme native) induite par l'extrait résulterait en une diminution de la prolifération et de la survie des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, confirmant ainsi le potentiel anticancéreux de l'extrait.

D'autre part, il a été constaté dans le cas du cancer de la prostate que la tyrosine-phosphorylation de SAM68 augmentait [191]. De même, Gorla et al. ont montré que SAM68 pouvait être tyrosine-phosphorylée par les oncoprotéines RET(PTC2) dans le cas des carcinomes thyroïdiens [222]. Il a également été montré que SAM68 pouvait être exprimée sous une forme acétylée dans des cellules de cancer du sein [201]. Cependant, aucune étude n'a été réalisée concernant les modifications post-traductionnelles subit par SAM68 dans le cas du CPNPC. Il serait donc pertinent de vérifier si

l'extrait provoque une augmentation de la production d'une forme de SAM68 modifiée par phosphorylation, acétylation, méthylation, ou sumoylation au détriment de la forme native, ce qui pourrait expliquer pourquoi l'expression de cette dernière sous sa forme native diminue.

Dans un second temps, les résultats démontrent que SAM68, sous sa forme native, est exprimée dans les fractions nucléaires mais pas dans les fractions cytoplasmiques. Suite à une stimulation à l'extrait, l'expression de SAM68 diminue de 50 à 80% dans les fractions nucléaires dépendamment de la concentration d'extrait utilisée, au même titre qu'elle diminue dans les fractions cellulaires totales. La diminution de l'expression de la forme native de SAM68 induite par l'extrait, semble donc être cantonnée au compartiment nucléaire bien qu'il s'agisse d'une supposition, l'expérience devant être répétée. Cependant, il a été montré pour de nombreuses lignées de cellules cancéreuses que SAM68 possédait des propriétés pro-oncogéniques en modulant de la transcription de certains gènes cancer-spécifiques, oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs [208, 214]. Ainsi, on peut supposer que la diminution de l'expression de la protéine sous sa forme native, induite par l'extrait, dans le noyau des cellules d'adénocarcinome pulmonaire résulterait en une diminution subséquente de la transcription d'oncogènes et/ou l'augmentation de la transcription de gènes suppresseurs de tumeurs, permettant ainsi d'expliquer les propriétés antiprolifératives de l'extrait sur ce modèle cellulaire.

D'autre part, la détection d'une protéine de poids moléculaire plus élevé que celui de la forme native, et dont l'expression semble augmenter dans les fractions non-nucléaires tout en restant constante dans les fractions totales et nucléaires, semble fournir d'autres informations quant à l'état de la protéine dans le compartiment cytoplasmique. Cette protéine, pourrait être une forme de SAM68 ayant subi des modifications post-traductionnelles quant à la forme native, d'où l'augmentation de son poids de 68 à 70 kDa. En effet, l'anticorps utilisé ici pour détecter SAM68, était spécifiquement dirigé contre les régions localisées en C-terminal, entre les acides aminés 331 à 443 de la protéine. Comme décrit au chapitre 1, section 2, les régions présentes dans partie de la protéine incluse entre les acides aminés 331 et 443, sont le site de tyrosine phosphorylation [149, 151]. On peut donc supposer que le composé stimulerait la tyrosine-phosphorylation de SAM68 dans le cytoplasme et de ce fait, contribuerait à moduler l'activité de la protéine dans ce compartiment. Cette forme particulière de SAM68 étant également détectée, de façon constante dans les fractions nucléaires et totales, on

peut supposer que la protéine est présente conjointement sous sa forme native et modifiée dans le compartiment nucléaire, fait qui n'est pas observé dans le compartiment cytoplasmique.

En outre, l'activité et la localisation de SAM68 sont modulées par les modifications post-traductionnelles que la protéine subit, notamment la tyrosine phosphorylation. De façon générale, la tyrosine-phosphorylation de SAM68 inhibe sa capacité de liaison avec l'ARN, sa capacité d'homodimérisation mais augmente son interaction avec les protéines de signalisation [163, 181]. On peut donc supposer que l'extrait induit une inhibition de la capacité de liaison de SAM68 à l'ARN, via sa tyrosine-phosphorylation dans le compartiment cytoplasmique. Il faut cependant considérer ces conclusions avec réserve puisque les bandes relatives à cette protéine de plus fort poids moléculaire n'ont pas été quantifiées. Il est également nécessaire de répéter l'expérience en utilisant par exemple, un anticorps polyclonal anti-SAM68, permettant ainsi de mettre en évidence la présence éventuelle de différentes formes modifiées de la protéine.

De plus amples travaux permettraient en outre de déterminer si l'activité de la protéine en terme de transduction du signal et à sa capacité à se lier à l'ARN sont effectivement modifiées en réponse au traitement avec l'extrait.

## CHAPITRE 5 DISCUSSION ET PERSPECTIVES GÉNÉRALES DU PROJET

La majeure partie des cancers du poumon diagnostiqués, principale cause de décès par cancer dans le monde, sont imputables au cancer du poumon non-à-petites cellules. L'efficacité des outils thérapeutiques actuellement utilisés dans le traitement de cette maladie reste relative sans compter les nombreux effets secondaires induit par leur emploi, d'où la nécessité de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques. De nombreuses études indiquent que les composés issus de produits naturels, tels que les bufadienolides issus des plantes du genre *Helleborus*, constituent une alternative thérapeutique intéressante contre le CPNPC[232]. Ainsi, l'objectif de ce projet de recherche était de déterminer le potentiel anticancéreux d'un extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus*, dans le cas du CPNPC et le cas échéant, d'en caractériser le mécanisme d'action et l'activité anti-tumorale *in vivo*.

De ce fait, il s'agissait dans un premier temps d'évaluer l'activité cytotoxique, donc le potentiel anticancéreux de l'extrait, *in vitro* sur plusieurs modèles de cellules cancéreuses de poumon et de fibroblastes normaux de poumon. Comme reporté auparavant pour un extrait d'une autre plante du genre *Helleborus*, *Helleborus orientalis* [123], les résultats obtenus montraient qu'en comparaison avec un anticancéreux classique utilisé dans le traitement du CPNPC (étoposide), l'extrait possédait une cytotoxicité élevée chez les lignées cellulaires de cancer du poumon humain et chez les lignées cellulaires saines. L'étude démontrait également que l'extrait d'*Helleborus orientalis* comportaient des composés bien identifiés et séparés les uns des autres et que certains de ces composés étaient sélectifs pour les cellules de mélanome ou de carcinome épidermoïde utilisées dans l'étude. Ainsi, la séparation et l'identification de composés particuliers présents dans l'extrait permettraient de distinguer les éléments cytotoxiques non-sélectifs, des éléments cytotoxiques bien sélectifs des cellules cancéreuses. Les résultats indiquaient également que l'extrait était environ 5 fois moins cytotoxique pour la lignée cellulaire cancéreuse A549-dox-r résistante à la doxorubicine (un autre anticancéreux classique) que pour la lignée cellulaire cancéreuse A549 non-résistante. Ceci indique que l'extrait pourrait être moins actif pour les cas de CPNPC chimiorésistants que pour leurs homologues non-résistants.

D'autre part, les résultats obtenus indiquaient que la cytotoxicité de l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* était particulièrement élevée pour la lignée cellulaire A549, un modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain. En comparaison des cellules A549, l'extrait était environ six fois moins cytotoxique pour la lignée cellulaire NCI-H23, un autre modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, ce qui suggère que l'extrait pourrait être sélectif d'un certain type d'adénocarcinome pulmonaire. Il serait donc judicieux d'évaluer la cytotoxicité de l'extrait sur d'autres modèles de lignées d'adénocarcinome pulmonaire humain comme par exemple les cellules NCI-H2228 (ATCC® CRL-5935™) ou encore les cellules NCI-H1975 (ATCC® CRL-5908™), afin de déterminer si l'extrait est bien sélectif d'un sous-type particulier d'adénocarcinome pulmonaire humain.

La cytotoxicité de l'extrait sur les cellules de CPNPC ayant été démontrée, le projet avait pour deuxième objectif de caractériser le mécanisme d'action de l'extrait sur un modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire, modèle pour lequel le composé démontrait une très forte toxicité. Les résultats montraient que pour ce modèle, les cellules A549, l'extrait induisait une diminution drastique de la viabilité cellulaire et la mort cellulaire par apoptose via un ralentissement du cycle cellulaire en phase G<sub>2</sub>/M. De nombreux anticancéreux agissent en induisant la mort des cellules cancéreuses par apoptose. Particulièrement, il a été reporté que divers extraits issus de plusieurs plantes du genre *Helleborus*, parmi lesquelles, *Helleborus niger*, provoquaient la mort de cellules leucémiques par apoptose [129]. Ceci confirme la capacité de l'extrait à agir en tant qu'anticancéreux via l'induction de la mort cellulaire incluant l'apoptose dans le cas d'un modèle d'adénocarcinome pulmonaire. Toutefois, les pourcentages de cellules mortes à l'issue de l'évaluation de la viabilité cellulaire après stimulation des A549 avec des concentrations croissantes d'extrait (jusqu'à 80% de mortalité cellulaire) étaient bien plus élevés que les pourcentages de cellules apoptotiques obtenus après évaluation du type de mort cellulaire par cytométrie en flux (jusqu'à 35% de cellules en apoptose). Il est donc nécessaire de discriminer les cellules mortes par apoptose des cellules mortes par nécrose ou autophagie. Ces résultats suggèrent que l'extrait induit la mort cellulaire dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain, mais pas de façon apoptose spécifique.

Il était en outre pertinent de constater que le ralentissement du cycle des cellules d'adénocarcinome pulmonaire provoqué par l'extrait affectait la phase G<sub>2</sub>/M de préparation et de déclenchement de la

mitose. En effet, concernant l'induction d'un arrêt ou d'un ralentissement du cycle cellulaire par les bufadienolides (composés présents dans l'extrait), il avait seulement été rapporté jusqu'à présent, que la bufaline (bufadienolide aux propriétés anti-tumorales connues) induisait un arrêt du cycle de cellules du cancer du sein [120, 233]. Cet arrêt affectait la phase en phase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> du cycle de ces cellules. Dans un même temps, les résultats ont montré que l'extrait provoquait une diminution significative allant de 50 à 90% de l'expression de la protéine de liaison à l'ARN, SAM68, sous sa forme native (sans modifications post-traductionnelles). Or, il a été constaté dans la lignée cellulaire DT40, que de faibles quantités de cette protéine, sous sa forme native, étaient corrélées avec une élongation de la phase G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire [167]. De ce fait, on peut supposer que l'induction d'un ralentissement du cycle des cellules d'adénocarcinome pulmonaire en phase G<sub>2</sub>/M par l'extrait interviendrait par diminution de l'expression de la protéine SAM68, sous sa forme native.

Dans le but de caractériser le mécanisme d'action de l'extrait, le projet de recherche avait pour dernier objectif d'en évaluer l'effet sur le transcriptome de cellules d'adénocarcinome pulmonaire. À ce titre, les résultats ont démontré que l'extrait induisait de nombreux changements transcriptomiques chez des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain. Particulièrement, les résultats ont montré que parmi les transcrits dont l'expression était fortement régulés dans les cellules A549, KRAS, SOS1, MYC et PIK3CB étaient moins exprimés en comparaison des cellules non traitées. L'analyse transcriptomique indiquait également que chez les cellules A549 traitées dans les mêmes conditions, FOXO3 et RASSF1 étaient plus exprimés en comparaison des cellules contrôles.

Or, dans le cas du CPNPC, la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK est fréquemment activée notamment par des mutations activatrices du gène KRAS, aboutissant ainsi à la prolifération aberrante des cellules cancéreuses [234]. KRAS, un membre de la famille des proto-oncogènes RAS, est de plus, l'oncogène le plus fréquemment muté dans le cas de l'adénocarcinome pulmonaire humain [235, 236]. Par ailleurs, au niveau de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK, SOS1 active RAS via sa liaison au GTP [237]. Deux des principaux effecteurs de cette voie de signalisation sont RASSF1, un gène suppresseur de tumeur et le proto-oncogène MYC. Il a été démontré que RASSF1 permettait d'arrêter le cycle cellulaire et d'induire l'apoptose en conditions normales et induisait une diminution de la formation de tumeur *in vivo* dans le cas du CPNPC [236, 238]. Il a

également été rapporté que RASSF1 était inactivé dans le cas du CPNPC et que cette inactivation était étroitement liée à l'activation du gène KRAS, contribuant ainsi à la transformation maligne [239]. Dans le cas du CPNPC, MYC est couramment activée, soit par amplification soit par surexpression, ce qui conduit à une prolifération cellulaire incontrôlée [240-242].

D'autre part, la tumorigenèse du CPNPC implique également l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui a été associée à des tumeurs de haut grade et un stade avancé de la maladie [83, 243]. Cette voie peut être activée par la liaison des protéines PI3K, dont PIK3CB fait partie, à RAS, et est connue pour promouvoir la prolifération cellulaire, la croissance, la survie et l'invasion des cellules tumorales [244-246]. FOXO3 est un effecteur de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui en provoque l'inhibition [83]. Il s'avère en outre que l'inhibition de l'expression de ce facteur de transcription est nécessaire à la transformation cellulaire, à l'angiogenèse et à la progression tumorale, supportant ainsi son rôle de suppresseur de tumeur [247-249].

On peut donc supposer que les propriétés anticancéreuses de l'extrait, soit sa capacité à induire la mort cellulaire et à inhiber la prolifération cellulaire, serait basée sur la modulation d'événements moléculaires précis. L'extrait pourrait ainsi agir en tant qu'inhibiteur de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK, via l'inhibition de l'expression de KRAS et SOS1 initialement, conduisant subséquemment à l'inhibition de l'expression de MYC et à la surexpression de RASSF1. L'extrait pourrait aussi induire dans un second temps, la surexpression de FOXO3 par modulation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Une confirmation de l'expression des transcrits cités précédemment par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (qRT-PCR) et immunobuvardage de type *Western* est cependant nécessaire pour confirmer ces hypothèses *in vitro* chez les cellules A549 et *in vivo* chez des souris porteuses de tumeur du poumon LLC1.

Il a par ailleurs été constaté qu'au sein des différentes lignées cellulaires appartenant à l'adénocarcinome pulmonaire humain (A549 et NCI-H23), les profils d'expression des oncogènes et des transcrits différaient. Notamment, les lignées A549 et NCI-H23 comportaient des niveaux de c-MYC différents, les A549 exprimant bien moins l'oncogène ou le transcrit correspondant que les NCI-H23 [250]. Les NCI-H23 exprimaient de plus, L-MYC, transcrit que les A549 n'exprimaient pas du

tout. Ces différences transcriptomiques de base pourraient expliquer pourquoi l'extrait était plus cytotoxique pour la lignée A549 que pour la lignée NCI-H23.

Les résultats ont également démontré que l'extrait induisait une diminution allant de 50 à 90% de l'expression de la forme native de la protéine SAM68, dont les propriétés pro-oncogéniques ont été démontrées chez de nombreuses lignées de cellules cancéreuses humaines pour lesquelles elle permettrait la prolifération et la survie cellulaire [214]. Il a également été constaté que l'inactivation de SAM68, conduisant à la surexpression des protéines p21/p27, à l'inhibition de la kinase AKT, aboutissait à l'activation subséquente des facteurs de transcriptions de la famille FOXO et à l'apoptose cellulaire [170]. Or, les résultats démontrent que l'extrait induit effectivement une augmentation de l'expression du facteur de transcription FOXO 3, potentiel marqueur de pronostic favorable dans le cas du cancer du sein [251] et dont le rôle de suppresseur de tumeur a été constaté dans le cas du cancer colorectal [252]. L'extrait pourrait donc induire une diminution de la viabilité cellulaire et provoquer l'apoptose des cellules d'adénocarcinome du poumon via la diminution de l'expression de la protéine SAM68 (sous sa forme native) et la surexpression de FOXO3.

De plus amples travaux permettraient de déterminer si la diminution dose-dépendante de la viabilité des cellules cancéreuses et leur mort cellulaire induites par l'extrait et médiée par la diminution de l'expression de SAM68 sous sa forme native, sont en rapport avec une stimulation de la dégradation, une inhibition de la synthèse par des voies de signalisation localisées en amont ou encore une inhibition de la phosphorylation de la protéine, modification post-traductionnelle modulant l'activité de la protéine. Il serait également intéressant de déterminer si la diminution de l'expression de SAM68 sous sa forme native, induite par l'extrait, se produit en parallèle de l'augmentation de l'expression de SAM68 sous une forme ayant subi des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation ou encore la sumoylation. L'anticorps utilisé pour les expériences d'immunobuvardage de type *Western* était en effet monoclonal et dirigé contre la forme native de SAM68, soit n'ayant pas subi de modifications post-traductionnelles. De plus, les *Western blots* relatifs à l'évaluation de l'effet de l'extrait sur la localisation subcellulaire de SAM68 révèlent la présence, bien que peu visibles, de bandes de plus fort poids moléculaire que la protéine native, suggérant que la protéine détectée serait une forme ayant subi des modifications post-

traductionnelles. L'intensité de ces bandes, bien que relativement constantes dans les fractions totales et nucléaires contrôles et résultant des cellules A549 traitées avec l'extrait, semblaient augmenter avec la concentration de l'extrait dans les fractions cytoplasmiques. Considérant que l'anticorps utilisé dans ces expériences était spécifiquement dirigé contre la région comprise entre les acides aminés 331 à 443 (sites de tyrosine phosphorylation), on peut supposer que l'extrait induirait l'augmentation progressive de l'expression d'une forme de SAM68 modifiée post-traductionnellement dans le compartiment cytoplasmique. Les modifications post-traductionnelles de la protéine modifiant l'activité de la protéine, notamment sa capacité de liaison à l'ARN, on peut supposer que l'extrait serait à l'origine d'une modification d'activité de la protéine en plus d'une diminution de l'expression de la protéine sous sa forme native de 68 kDa. Une mesure de l'activité de liaison de SAM68 à l'ARN après stimulation de cellules de CPNPC avec des concentrations croissantes d'extrait, permettrait donc de vérifier ces hypothèses.

Concernant le mécanisme d'action de l'extrait dans les cellules d'adénocarcinome de poumon, il serait pertinent de déterminer le partenaire d'interaction directe de l'extrait.

Le dernier objectif du projet présenté dans ce mémoire était l'évaluation *in vivo* de l'activité anti-tumorale de l'extrait chez des souris C57BL/6 NCrI porteuses de tumeur du carcinome pulmonaire de Lewis. L'étude *in vivo* a révélé que l'extrait exerçait à une faible dose, des effets antitumoraux significatifs chez des souris C57BL/6 NCrI porteuses de tumeur du carcinome pulmonaire de Lewis. Lorsque les animaux étaient traités avec 1 mg/kg d'extrait entre le jour 1 et le jour 4 ou entre le jour 7 et le jour 10, les tumeurs étaient en effet réduites d'environ 50% en termes de masse. L'étude démontrait également que l'extrait était peu toxique puisqu'il n'induisait aucune perte significative de poids chez les animaux traités, au contraire du cisplatine qui entraînait une perte significative de poids d'environ 5% chez les animaux traités. Il a également été constaté que l'administration de 2,5 mg/kg et de 5 mg/kg d'extrait résultait en un effet diurétique important chez les souris porteuses de tumeurs du poumon. Ces données renseignent sur les propriétés d'élimination de l'extrait par le métabolisme puisque les bufadiénolides, composés présents dans l'extrait, sont connus pour leur propriétés diurétiques et leur action sur l'excrétion rénale de sodium [253]. Ces résultats suggèrent donc que l'extrait enrichi d'*Helleborus caucasicus* constituerait un outil thérapeutique probant dans le traitement du CPNPC.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Le cancer du poumon est la principale cause de décès imputable au cancer à travers le monde. La catégorie de cancer du poumon majoritairement diagnostiquée, soit, le cancer du poumon non-à-petites cellules est une maladie d'une extrême complexité de par les dérégulations génétiques et moléculaires qu'il sous-tend. Il n'existe à l'heure actuelle, aucun traitement permettant la guérison de la maladie.

Les expérimentations réalisées au cours de ce projet de recherche ont démontré *in vitro* et *in vivo*, qu'un extrait enrichi issu d'une plante endémique de la Géorgie, *Helleborus caucasicus*, possédait des propriétés anticancéreuses certaines. Les résultats obtenus sur un modèle de cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain ont démontré que cet extrait induisait une importante diminution de la viabilité cellulaire, la mort cellulaire incluant l'apoptose, via un ralentissement de leur cycle en phase G2/M, de nombreux changements transcriptomiques suggérant l'inhibition de la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK, ainsi que la diminution de l'expression de la protéine de liaison à l'ARN SAM68, sous sa forme native de 68 kDa. Ces résultats suggèrent donc que cet extrait pourrait être un candidat thérapeutique intéressant contre le CPNPC. Il serait intéressant de caractériser le partenaire d'interaction directe de l'extrait, de même que les cibles moléculaires et d'identifier précisément les composés responsables de cette activité anti-tumorale.



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. G.Karp, *Biologie moléculaire et cellulaire*. Éditions de Boeck, ed. è. édition. 2010, Bruxelles. 818.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. de-Thé, G., *Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma worldwide: the causal relationship revisited*. IARC Sci Publ, 1985(60): p. 165-76.
5. Hanahan, D.a.W., R. A., *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
6. Malthiery, Y. and F. Savagner, [*Energy metabolism of the cancer cell: example of mitochondria-rich endocrine tumors*]. Ann Endocrinol (Paris), 2006. **67**(3): p. 205-13.
7. Stewart B.W. and Wild C.P., editors. *World Cancer Report 2014*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. World Health Organization; 2014.
8. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
9. Massague, J., *G1 cell-cycle control and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 298-306.
10. Kastan, M.B. and J. Bartek, *Cell-cycle checkpoints and cancer*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 316-23.
11. Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland, *On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 773-85.
12. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 131-49.
13. Norbury, C. and P. Nurse, *Animal cell cycles and their control*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 441-70.
14. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(3): p. 153-66.
15. Sherr, C.J., *G1 phase progression: cycling on cue*. Cell, 1994. **79**(4): p. 551-5.
16. Ohtsubo, M., A.M. Theodoras, J. Schumacher, J.M. Roberts, and M. Pagano, *Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2612-24.
17. Girard, F., U. Strausfeld, A. Fernandez, and N.J. Lamb, *Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1169-79.
18. Walker, D.H. and J.L. Maller, *Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication*. Nature, 1991. **354**(6351): p. 314-7.
19. King, R.W., P.K. Jackson, and M.W. Kirschner, *Mitosis in transition*. Cell, 1994. **79**(4): p. 563-71.
20. Arellano, M. and S. Moreno, *Regulation of CDK/cyclin complexes during the cell cycle*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(4): p. 559-73.
21. Jeffrey, P.D., A.A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, and N.P. Pavletich, *Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex*. Nature, 1995. **376**(6538): p. 313-20.
22. Paulovich, A.G. and L.H. Hartwell, *A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in S. cerevisiae in response to DNA damage*. Cell, 1995. **82**(5): p. 841-7.
23. Lew, D.J. and S. Kornbluth, *Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(6): p. 795-804.

24. Carnero, A. and G.J. Hannon, *The INK4 family of CDK inhibitors*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **227**: p. 43-55.
25. Polyak, K., M.H. Lee, H. Erdjument-Bromage, A. Koff, J.M. Roberts, P. Tempst, and J. Massague, *Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals*. Cell, 1994. **78**(1): p. 59-66.
26. Harper, J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell, and et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(4): p. 387-400.
27. Lee, M.H., I. Reynisdottir, and J. Massague, *Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution*. Genes Dev, 1995. **9**(6): p. 639-49.
28. Hengst, L. and S.I. Reed, *Inhibitors of the Cip/Kip family*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. **227**: p. 25-41.
29. Pardee, A.B., *A restriction point for control of normal animal cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1286-90.
30. Buchkovich, K., L.A. Duffy, and E. Harlow, *The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle*. Cell, 1989. **58**(6): p. 1097-105.
31. Kato, J., H. Matsushime, S.W. Hiebert, M.E. Ewen, and C.J. Sherr, *Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4*. Genes Dev, 1993. **7**(3): p. 331-42.
32. Brehm, A., E.A. Miska, D.J. McCance, J.L. Reid, A.J. Bannister, and T. Kouzarides, *Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 597-601.
33. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
34. Agarwal, M.L., W.R. Taylor, M.V. Chernov, O.B. Chernova, and G.R. Stark, *The p53 network*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 1-4.
35. Ko, L.J. and C. Prives, *p53: puzzle and paradigm*. Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1054-72.
36. Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 379-93.
37. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
38. McDonald, E.R., 3rd and W.S. El-Deiry, *Cell cycle control as a basis for cancer drug development (Review)*. Int J Oncol, 2000. **16**(5): p. 871-86.
39. Miller, C. and H.P. Koeffler, *P53 mutations in human cancer*. Leukemia, 1993. **7 Suppl 2**: p. S18-21.
40. Hall, M. and G. Peters, *Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer*. Adv Cancer Res, 1996. **68**: p. 67-108.
41. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
42. Ouyang, L., Z. Shi, S. Zhao, F.T. Wang, T.T. Zhou, B. Liu, and J.K. Bao, *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif, 2012. **45**(6): p. 487-98.
43. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
44. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.

45. Grimm, S., B.Z. Stanger, and P. Leder, *RIP and FADD: two "death domain"-containing proteins can induce apoptosis by convergent, but dissociable, pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10923-7.
46. Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Kramer, and M.E. Peter, *Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor*. EMBO J, 1995. **14**(22): p. 5579-88.
47. Saelens, X., N. Festjens, L. Vande Walle, M. van Gurp, G. van Loo, and P. Vandenabeele, *Toxic proteins released from mitochondria in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2861-74.
48. Cai, J., J. Yang, and D.P. Jones, *Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1366**(1-2): p. 139-49.
49. Chinnaiyan, A.M., *The apoptosome: heart and soul of the cell death machine*. Neoplasia, 1999. **1**(1): p. 5-15.
50. Sakahira, H., M. Enari, and S. Nagata, *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 96-9.
51. King, K.L. and J.A. Cidlowski, *Cell cycle regulation and apoptosis*. Annu Rev Physiol, 1998. **60**: p. 601-17.
52. Kerr, J.F., C.M. Winterford, and B.V. Harmon, *Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy*. Cancer, 1994. **73**(8): p. 2013-26.
53. Cheng, J., T. Zhou, C. Liu, J.P. Shapiro, M.J. Brauer, M.C. Kiefer, P.J. Barr, and J.D. Mountz, *Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule*. Science, 1994. **263**(5154): p. 1759-62.
54. Cefai, D., R. Schwaninger, M. Balli, T. Brunner, and C.D. Gimmi, *Functional characterization of Fas ligand on tumor cells escaping active specific immunotherapy*. Cell Death Differ, 2001. **8**(7): p. 687-95.
55. *Comité consultatif de la Société canadienne du cancer : Statistiques canadiennes sur le cancer 2014. Toronto (Ontario) : Société canadienne du cancer, 2014.*
56. Khuder, S.A., *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. Lung Cancer, 2001. **31**(2-3): p. 139-48.
57. Dela Cruz, C.S.T., L. T. and Matthay, R. A., *Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention*. Clin Chest Med, 2011. **32**(4): p. 605-44.
58. Cooley, M.E., *Symptoms in adults with lung cancer. A systematic research review*. J Pain Symptom Manage, 2000. **19**(2): p. 137-53.
59. Waldman, S.A. and A. Terzic, *Pharmacology and therapeutics: principles to practice*. 2009, Chicago: Saunders/Elsevier. 1536.
60. Hirshberg, B.B., I.; Glazer, M. and Kramer, M. R., *Hemoptysis: etiology, evaluation, and outcome in a tertiary referral hospital*. Chest, 1997. **112**(2): p. 440-4.
61. Hanna, N.S., F. A.; Fossella, F. V.; Pereira, J. R.; De Marinis, F.; von Pawel, J.; Gatzemeier, U.; Tsao, T. C.; Pless, M.; Muller, T.; Lim, H. L.; Desch, C.; Szondy, K.; Gervais, R.; Shaharyar,; Manegold, C.; Paul, S.; Paoletti, P.; Einhorn, L. and Bunn, P. A., Jr., *Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy*. J Clin Oncol, 2004. **22**(9): p. 1589-97.
62. Travis, W.D., *Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas*. Mod Pathol, 2012. **25 Suppl 1**: p. S18-30.
63. Stupp, R.M., C.; Turrisi, A. T., 3rd; Perry, M. C. and Leyvraz, S., *Small cell lung cancer: state of the art and future perspectives*. Lung Cancer, 2004. **45**(1): p. 105-17.

64. J. Barata F and Costa, A.F., [*Small cell lung cancer--state of the art and future perspectives*]. Rev Port Pneumol, 2007. **13**(4): p. 587-604.
65. Jackman, D.M.a.J., B. E., *Small-cell lung cancer*. Lancet, 2005. **366**(9494): p. 1385-96.
66. Hirsch, F.R.M., M. J.; Aisner, S.; Campobasso, O.; Elema, J. D.; Gazdar, A. F.; Mackay, B.; Nasiell, M.; Shimosato, Y. and Steele, R. H., *Histopathologic classification of small cell lung cancer. Changing concepts and terminology*. Cancer, 1988. **62**(5): p. 973-7.
67. Travis, D.W., E. Brambilla, H.K. Müller-Hermelink, and C.C. Harris, *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, ed. IARC Press. 2004 Lyon. 341.
68. Molina, J.R.Y., P.; Cassivi, S. D.; Schild, S. E. and Adjei, A. A., *Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship*. Mayo Clin Proc, 2008. **83**(5): p. 584-94.
69. Bray, F.I.a.W., E., *Lung cancer mortality trends in 36 European countries: secular trends and birth cohort patterns by sex and region 1970-2007*. Int J Cancer, 2010. **126**(6): p. 1454-66.
70. Devesa, S.S.B., F.; Vizcaino, A. P. and Parkin, D. M., *International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising*. Int J Cancer, 2005. **117**(2): p. 294-9.
71. Travis, W.D., E. Brambilla, M. Noguchi, A.G. Nicholson, K. Geisinger, Y. Yatabe, C.A. Powell, D. Beer, G. Riely, K. Garg, J.H. Austin, V.W. Rusch, F.R. Hirsch, J. Jett, P.C. Yang, and M. Gould, *International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary*. Proc Am Thorac Soc, 2011. **8**(5): p. 381-5.
72. Travis, W.D., E. Brambilla, and G.J. Riely, *New pathologic classification of lung cancer: relevance for clinical practice and clinical trials*. J Clin Oncol, 2013. **31**(8): p. 992-1001.
73. Travis, W.D., *Pathology of lung cancer*. Clin Chest Med, 2002. **23**(1): p. 65-81, viii.
74. Travis, W.D., R.I. Linnoila, M.G. Tsokos, C.L. Hitchcock, G.B.J. Cutler, L. Nieman, G. Chrousos, H. Pass, and J. Doppman, *Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases*. Am J Surg Pathol, 1991. **15**(6): p. 529-53.
75. Sholl, L.M., *Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics*. Curr Opin Pulm Med, 2014. **20**(4): p. 324-31.
76. Perez-Moreno, P., E. Brambilla, R. Thomas, and J.C. Soria, *Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(9): p. 2443-51.
77. Larsen, J.E. and J.D. Minna, *Molecular biology of lung cancer: clinical implications*. Clin Chest Med, 2011. **32**(4): p. 703-40.
78. Merlino, G.T., Y.H. Xu, S. Ishii, A.J. Clark, K. Semba, K. Toyoshima, T. Yamamoto, and I. Pastan, *Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells*. Science, 1984. **224**(4647): p. 417-9.
79. Stephens, P., C. Hunter, G. Bignell, S. Edkins, H. Davies, J. Teague, C. Stevens, S. O'Meara, R. Smith, A. Parker, A. Barthorpe, M. Blow, L. Brackenbury, A. Butler, O. Clarke, J. Cole, E. Dicks, A. Dike, A. Drozd, K. Edwards, S. Forbes, R. Foster, K. Gray, C. Greenman, K. Halliday, K. Hills, V. Kosmidou, R. Lugg, A. Menzies, J. Perry, R. Petty, K. Raine, L. Ratford, R. Shepherd, A. Small, Y. Stephens, C. Tofts, J. Varian, S. West, S. Widaa, A. Yates, F. Brasseur, C.S. Cooper, A.M. Flanagan, M. Knowles, S.Y. Leung, D.N. Louis, L.H. Looijenga, B. Malkowicz, M.A. Pierotti, B. Teh, G. Chenevix-Trench, B.L. Weber, S.T. Yuen, G. Harris, P. Goldstraw, A.G. Nicholson, P.A. Futreal, R. Wooster, and M.R. Stratton, *Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours*. Nature, 2004. **431**(7008): p. 525-6.

80. Sordella, R.B., D. W.; Haber, D. A. and Settleman, J., *Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways*. Science, 2004. **305**(5687): p. 1163-7.
81. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
82. Greulich, H., *The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies*. Genes Cancer, 2010. **1**(12): p. 1200-10.
83. Fumarola, C., M.A. Bonelli, P.G. Petronini, and R.R. Alfieri, *Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer*. Biochem Pharmacol, 2014.
84. Lavielle, J.P., S. Gazzeri, C. Riva, E. Reyt, C. Brambilla, and E. Brambilla, *p53 mutations and p53, Waf-1, Bax and Bcl-2 expression in field cancerization of the head and neck*. Anticancer Res, 1998. **18**(6B): p. 4741-9.
85. Otterson, G.A., R.A. Kratzke, A. Coxon, Y.W. Kim, and F.J. Kaye, *Absence of p16INK4 protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wildtype RB*. Oncogene, 1994. **9**(11): p. 3375-8.
86. Agathangelou, A., W.N. Cooper, and F. Latif, *Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers*. Cancer Res, 2005. **65**(9): p. 3497-508.
87. Ji, L. and J.A. Roth, *Tumor suppressor FUS1 signaling pathway*. J Thorac Oncol, 2008. **3**(4): p. 327-30.
88. Wistuba, I., C. Behrens, A.K. Virmani, G. Mele, S. Milchgrub, L. Girard, J.W.r. Fondon, H.R. Garner, B. McKay, F. Latif, M.I. Lerman, S. Lam, A.F. Gazdar, and J.D. Minna, *High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints*. Cancer Res, 2000. **60**(7): p. 1949-60.
89. Shaw, R.J., N. Bardeesy, B.D. Manning, L. Lopez, M. Kosmatka, R.A. DePinho, and L.C. Cantley, *The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling*. Cancer Cell, 2004. **6**(1): p. 91-9.
90. Ding, L., G. Getz, D.A. Wheeler, E.R. Mardis, M.D. McLellan, K. Cibulskis, C. Sougnez, H. Greulich, D.M. Muzny, M.B. Morgan, L. Fulton, R.S. Fulton, Q. Zhang, M.C. Wendl, M.S. Lawrence, D.E. Larson, K. Chen, D.J. Dooling, A. Sabo, A.C. Hawes, H. Shen, S.N. Jhangiani, L.R. Lewis, O. Hall, Y. Zhu, T. Mathew, Y. Ren, J. Yao, S.E. Scherer, K. Clerc, G.A. Metcalf, B. Ng, A. Milosavljevic, M.L. Gonzalez-Garay, J.R. Osborne, R. Meyer, X. Shi, Y. Tang, D.C. Koboldt, L. Lin, R. Abbott, T.L. Miner, C. Pohl, G. Fewell, C. Haipek, H. Schmidt, B.H. Dunford-Shore, A. Kraja, S.D. Crosby, C.S. Sawyer, T. Vickery, S. Sander, J. Robinson, W. Winckler, J. Baldwin, L.R. Chirieac, A. Dutt, T. Fennell, M. Hanna, B.E. Johnson, R.C. Onofrio, R.K. Thomas, G. Tonon, B.A. Weir, X. Zhao, L. Ziaugra, M.C. Zody, T. Giordano, M.B. Orringer, J.A. Roth, M.R. Spitz, Wistuba, II, B. Ozenberger, P.J. Good, A.C. Chang, D.G. Beer, M.A. Watson, M. Ladanyi, S. Broderick, A. Yoshizawa, W.D. Travis, W. Pao, M.A. Province, G.M. Weinstock, H.E. Varmus, S.B. Gabriel, E.S. Lander, R.A. Gibbs, M. Meyerson, and R.K. Wilson, *Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma*. Nature, 2008. **455**(7216): p. 1069-75.
91. Ferrara, N., *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. Endocr Rev, 2004. **25**(4): p. 581-611.
92. Kaya, A., A. Ciledag, B.E. Gulbay, B.M. Poyraz, G. Celik, E. Sen, H. Savas, and I. Savas, *The prognostic significance of vascular endothelial growth factor levels in sera of non-small cell lung cancer patients*. Respir Med, 2004. **98**(7): p. 632-6.
93. Frias, C., C. Garcia-Aranda, C. De Juan, A. Moran, P. Ortega, A. Gomez, F. Hernando, J.A. Lopez-Asenjo, A.J. Torres, M. Benito, and P. Iniesta, *Telomere shortening is associated with*

- poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer.* Lung Cancer, 2008. **60**(3): p. 416-25.
94. Lang-Lazdunski, L., *Surgery for nonsmall cell lung cancer.* Eur Respir Rev, 2013. **22**(129): p. 382-404.
  95. Boggs, D.H., S. Feigenberg, R. Walter, D. Wissing, B. Patel, T. Wu, and L. Rosen, *Stereotactic radiotherapy using tomotherapy for early-stage non-small cell lung carcinoma: Analysis of intrafraction tumour motion.* J Med Imaging Radiat Oncol, 2014.
  96. Grutters, J.P., A.G. Kessels, M. Pijls-Johannesma, D. De Ruyscher, M.A. Joore, and P. Lambin, *Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: a meta-analysis.* Radiother Oncol, 2010. **95**(1): p. 32-40.
  97. Reboul, F.L., *Radiotherapy and chemotherapy in locally advanced non-small cell lung cancer: preclinical and early clinical data.* Hematol Oncol Clin North Am, 2004. **18**(1): p. 41-53.
  98. Rang, H.P. and M. Dale, *Pharmacology* ed. f. edition. 2003: Churchill Livingstone.
  99. Page, C.P. and G. Cheymol, *Pharmacologie intégrée.* 1999: De Boeck université.
  100. McElnay, P. and E. Lim, *Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC.* J Thorac Dis, 2014. **6**(Suppl 2): p. S224-S227.
  101. Hildebrandt, M.A., J. Gu, and X. Wu, *Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in NSCLC.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2009. **5**(7): p. 745-55.
  102. Altmann, K.H., *Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs.* Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(4): p. 424-31.
  103. Liebmann, J.E., J.A. Cook, C. Lipschultz, D. Teague, J. Fisher, and J.B. Mitchell, *Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol) in human tumour cell lines.* Br J Cancer, 1993. **68**(6): p. 1104-9.
  104. Hande, K.R., *Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor.* Eur J Cancer, 1998. **34**(10): p. 1514-21.
  105. Cerqueira, N.M., P.A. Fernandes, and M.J. Ramos, *Understanding ribonucleotide reductase inactivation by gemcitabine.* Chemistry, 2007. **13**(30): p. 8507-15.
  106. Jordan, M.A. and L. Wilson, *Microtubules as a target for anticancer drugs.* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(4): p. 253-65.
  107. Schiller, J.H., D. Harrington, C.P. Belani, C. Langer, A. Sandler, J. Krook, J. Zhu, and D.H. Johnson, *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2002. **346**(2): p. 92-8.
  108. Rahmani, R., R. Samak, P. Bore, and J.P. Cano, *[Clinical pharmacokinetics of vinca alkaloids].* Bull Cancer, 1988. **75**(2): p. 195-200.
  109. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail, *Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia.* J Am Chem Soc, 1971. **93**(9): p. 2325-7.
  110. Fuchs, D.A. and R.K. Johnson, *Cytologic evidence that taxol, an antineoplastic agent from Taxus brevifolia, acts as a mitotic spindle poison.* Cancer Treat Rep, 1978. **62**(8): p. 1219-22.
  111. Sehgal, S.N., H. Baker, and C. Vezina, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization.* J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 727-32.
  112. Boffa, D.J.L., F.; Thomas, D.; Yang, H.; Sharma, V. K.; Lagman, M. and Suthanthiran, M., *Rapamycin inhibits the growth and metastatic progression of non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 293-300.
  113. Kwitkowski, V.E.P., T. M.; Ibrahim, A.; Farrell, A. T.; Justice, R.; Mitchell, S. S.; Sridhara, R. and Pazdur, R., *FDA approval summary: temsirolimus as treatment for advanced renal cell carcinoma.* Oncologist, 2010. **15**(4): p. 428-35.

114. Basmadjian, C.Z., Q.; Bentouhami, E.; Djehal, A.; Nebigil, C. G.; Johnson, R. A.; Serova, M.; de Gramont, A.; Faivre, S.; Raymond, E. and Desaubry, L. G., *Cancer wars: natural products strike back*. Front Chem, 2014. **2**: p. 20.
115. Ueda, H., T. Manda, S. Matsumoto, S. Mukumoto, F. Nishigaki, I. Kawamura, and K. Shimomura, *FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by Chromobacterium violaceum No. 968. III. Antitumor activities on experimental tumors in mice*. J Antibiot (Tokyo), 1994. **47**(3): p. 315-23.
116. Furumai, R., A. Matsuyama, N. Kobashi, K.H. Lee, M. Nishiyama, H. Nakajima, A. Tanaka, Y. Komatsu, N. Nishino, M. Yoshida, and S. Horinouchi, *FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases*. Cancer Res, 2002. **62**(17): p. 4916-21.
117. Zhu, L., Z. Yang, S. Wang, and Y. Tang, [*Kanglaite for Treating Advanced Non-small-cell Lung Cancer: A Systematic Review.*]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi, 2009. **12**(3): p. 208-15.
118. Mijatovic, T., E. Van Quaquebeke, B. Delest, O. Debeir, F. Darro, and R. Kiss, *Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1776**(1): p. 32-57.
119. Newman, R.A., P. Yang, A.D. Pawlus, and K.I. Block, *Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents*. Mol Interv, 2008. **8**(1): p. 36-49.
120. Krenn, L. and B. Kopp, *Bufadienolides from animal and plant sources*. Phytochemistry, 1998. **48**(1): p. 1-29.
121. Steyn, P.S. and F.R. Van Heerden, *Bufadienolides of plant and animal origin*. Nat Prod Rep, 1998. **15**(4): p. 397-413.
122. Mimaki, Y., K. Watanabe, C. Sakuma, H. Sakagami, and Y. Sashida, *Novel Polyoxygenated Spirostanol Glycosides from the Rhizomes of Helleborus orientalis*. Helvetica Chimica Acta, 2003. **86**(2): p. 398-407.
123. Watanabe, K., Y. Mimaki, H. Sakagami, and Y. Sashida, *Bufadienolide and spirostanol glycosides from the rhizomes of helleborus orientalis*. J Nat Prod, 2003. **66**(2): p. 236-41.
124. Mimaki, Y., Y. Matsuo, K. Watanabe, and H. Sakagami, *Furostanol glycosides from the rhizomes of Helleborus orientalis*. J Nat Med, 2010. **64**(4): p. 452-9.
125. Milbradt, A.G., F. Kerek, L. Moroder, and C. Renner, *Structural characterization of hellethionins from Helleborus purpurascens*. Biochemistry, 2003. **42**(8): p. 2404-11.
126. Vochita, G., C.T. Mihai, D. Gherghel, D. Iurea, G. Roman, G.L. Radu, and p. Rotinberg, *New potential antitumoral agents of polyphenolic nature obtained from Helleborus purpurascens by membranary micro- and ultrafiltration techniques*. Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza", Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara, 2011. **12**(2): p. 41-51.
127. Moreno, Y., B. L., A. Katz, W. Miklos, A. Cimmino, D.M. Tal, E. Ainbinder, M. Zehl, E. Urban, A. Evidente, B. Kopp, W. Berger, O. Feron, S. Karlish, and R. Kiss, *Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase*. Mol Cancer, 2013. **12**: p. 33.
128. Lindholm, P., J. Gullbo, P. Claeson, U. Goransson, S. Johansson, A. Backlund, R. Larsson, and L. Bohlin, *Selective cytotoxicity evaluation in anticancer drug screening of fractionated plant extracts*. J Biomol Screen, 2002. **7**(4): p. 333-40.
129. Jesse, P., G. Mottke, J. Eberle, G. Seifert, G. Henze, and A. Prokop, *Apoptosis-inducing activity of Helleborus niger in ALL and AML*. Pediatr Blood Cancer, 2009. **52**(4): p. 464-9.
130. Rosselli, S., A. Maggio, M. Bruno, V. Spadaro, C. Formisano, C. Irace, C. Maffettone, and N. Mascolo, *Furostanol saponins and ecdysones with cytotoxic activity from Helleborus bocconei ssp. intermedius*. Phytother Res, 2009. **23**(9): p. 1243-9.

131. Cakar, J., A. Paric, D. Vidic, A. Haveric, S. Haveric, M. Maksimovic, and K. Bajrovic, *Antioxidant and antiproliferative activities of Helleborus odorus Waldst. & Kit, H. multifidus Vis. and H. hercegovinus Martinis*. Nat Prod Res, 2011. **25**(20): p. 1969-74.
132. Cheng, W., Y.F. Tan, H.Y. Tian, X.W. Gong, K.L. Chen, and R.W. Jiang, *Two new bufadienolides from the rhizomes of Helleborus thibetanus with inhibitory activities against prostate cancer cells*. Nat Prod Res, 2014. **28**(12): p. 901-908.
133. Yang, J., Y.H. Zhang, F. Miao, L. Zhou, and W. Sun, *Two new bufadienolides from the rhizomes of Helleborus thibetanus Franch*. Fitoterapia, 2010. **81**(6): p. 636-9.
134. Muzashvili, T., A. Skhirtladze, T. Sulakvelidze, M. Benidze, V. Mshviladze, J. Legault, A. Pichette, and E. Kemertelidze, *Cytotoxic activity of Helleborus caucasicus A. Br. Georgia Chem. J.*, 2006. **6**: p. 684-685.
135. Thomas, A.R., A.; Lopez-Chavez, A.; Wang, Y. and Giaccone, G., *From targets to targeted therapies and molecular profiling in non-small cell lung carcinoma*. Ann Oncol, 2013. **24**(3): p. 577-85.
136. Rosen, L.S., *VEGF-targeted therapy: therapeutic potential and recent advances*. Oncologist, 2005. **10**(6): p. 382-91.
137. Cohen, M.H., J. Gootenberg, P. Keegan, and R. Pazdur, *FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) plus Carboplatin and Paclitaxel as first-line treatment of advanced/metastatic recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer*. Oncologist, 2007. **12**(6): p. 713-8.
138. Keating, G.M. and A. Santoro, *Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma*. Drugs, 2009. **69**(2): p. 223-40.
139. Maemondo, M., A. Inoue, K. Kobayashi, S. Sugawara, S. Oizumi, H. Isobe, A. Gemma, M. Harada, H. Yoshizawa, I. Kinoshita, Y. Fujita, S. Okinaga, H. Hirano, K. Yoshimori, T. Harada, T. Ogura, M. Ando, H. Miyazawa, T. Tanaka, Y. Saijo, K. Hagiwara, S. Morita, and T. Nukiwa, *Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR*. N Engl J Med, 2010. **362**(25): p. 2380-8.
140. Ou, S.H., C.H. Bartlett, M. Mino-Kenudson, J. Cui, and A.J. Iafrate, *Crizotinib for the treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: a success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology*. Oncologist, 2012. **17**(11): p. 1351-75.
141. Molckovsky, A. and L.L. Siu, *First-in-class, first-in-human phase I results of targeted agents: highlights of the 2008 American society of clinical oncology meeting*. J Hematol Oncol, 2008. **1**: p. 20.
142. Maulik, G., P. Madhiwala, S. Brooks, P.C. Ma, T. Kijima, E.V. Tibaldi, E. Schaefer, K. Parmar, and R. Salgia, *Activated c-Met signals through PI3K with dramatic effects on cytoskeletal functions in small cell lung cancer*. J Cell Mol Med, 2002. **6**(4): p. 539-53.
143. Brognard, J., A.S. Clark, Y. Ni, and P.A. Dennis, *Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation*. Cancer Res, 2001. **61**(10): p. 3986-97.
144. Taylor, S.J. and D. Shalloway, *An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 867-71.
145. Lukong, K.E. and S. Richard, *Sam68, the KH domain-containing superSTAR*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2003. **1653**(2): p. 73-86.
146. Vernet, C. and K. Artzt, *STAR, a gene family involved in signal transduction and activation of RNA*. Trends in Genetics, 1997. **13**(12): p. 479-484.

147. Chen, T., Boisvert, F. M., Bazett-Jones, D. P., and Richard, S., *A role for the GSG domain in localizing Sam68 to novel nuclear structures in cancer cell lines*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(9): p. 3015-33.
148. Huang, S., *Review: Perinucleolar Structures*. Journal of Structural Biology, 2000. **129**(2-3): p. 233-240.
149. Wong, G., O. Muller, R. Clark, L. Conroy, M.F. Moran, P. Polakis, and F. McCormick, *Molecular cloning and nucleic acid binding properties of the GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62*. Cell, 1992. **69**(3): p. 551-8.
150. Lee, J. and J.G. Burr, *Salpalpha and Salpbeta, growth-arresting homologs of Sam68*. Gene, 1999. **240**(1): p. 133-47.
151. Di Fruscio, M., T. Chen, and S. Richard, *Characterization of Sam68-like mammalian proteins SLM-1 and SLM-2: SLM-1 is a Src substrate during mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2710-5.
152. Chen, T.D., B. B.; Herrera, C.; Lasko, P. and Richard, S., *Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 5707-18.
153. Zorn, A.M. and P.A. Krieg, *The KH domain protein encoded by quaking functions as a dimer and is essential for notochord development in Xenopus embryos*. Genes Dev, 1997. **11**(17): p. 2176-90.
154. Burd, C.G. and G. Dreyfuss, *Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins*. Science, 1994. **265**(5172): p. 615-21.
155. Meyer, N.H., K. Tripsianes, M. Vincendeau, T. Madl, F. Kateb, R. Brack-Werner, and M. Sattler, *Structural basis for homodimerization of the Src-associated during mitosis, 68-kDa protein (Sam68) Qua1 domain*. J Biol Chem, 2010. **285**(37): p. 28893-901.
156. Sette, C., *Post-translational regulation of star proteins and effects on their biological functions*. Adv Exp Med Biol, 2010. **693**: p. 54-66.
157. Bedford, M.T., R. Reed, and P. Leder, *WW domain-mediated interactions reveal a spliceosome-associated protein that binds a third class of proline-rich motif: the proline glycine and methionine-rich motif*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(18): p. 10602-7.
158. Macias, M.J., S. Wiesner, and M. Sudol, *WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands*. FEBS Lett, 2002. **513**(1): p. 30-7.
159. Bedford, M.T., A. Frankel, M.B. Yaffe, S. Clarke, P. Leder, and S. Richard, *Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16030-6.
160. Ebersole, T.A., Q. Chen, M.J. Justice, and K. Artzt, *The quaking gene product necessary in embryogenesis and myelination combines features of RNA binding and signal transduction proteins*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 260-5.
161. Wu, S.T., G.H. Sun, D.S. Hsieh, A. Chen, H.I. Chen, S.Y. Chang, and D. Yu, *Correlation of CD44v5 expression with invasiveness and prognosis in renal cell carcinoma*. J Formos Med Assoc, 2003. **102**(4): p. 229-33.
162. Ishidate, T., S. Yoshihara, Y. Kawasaki, B.C. Roy, K. Toyoshima, and T. Akiyama, *Identification of a novel nuclear localization signal in Sam68*. FEBS Lett, 1997. **409**(2): p. 237-41.
163. Chen, T., B.B. Damaj, C. Herrera, P. Lasko, and S. Richard, *Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(10): p. 5707-18.

164. Pillay, I., H. Nakano, and S.V. Sharma, *Radical inhibits tyrosine phosphorylation of the mitotic Src substrate Sam68 and retards subsequent exit from mitosis of Src-transformed cells*. Cell Growth Differ, 1996. **7**(11): p. 1487-99.
165. Barlat, I., F. Maurier, M. Duchesne, E. Guitard, B. Tocque, and F. Schweighoffer, *A role for Sam68 in cell cycle progression antagonized by a spliced variant within the KH domain*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3129-32.
166. Resnick, R.J., S.J. Taylor, Q. Lin, and D. Shalloway, *Phosphorylation of the Src substrate Sam68 by Cdc2 during mitosis*. Oncogene, 1997. **15**(11): p. 1247-53.
167. Li, Q.H., I. Haga, T. Shimizu, M. Itoh, T. Kurosaki, and J. Fujisawa, *Retardation of the G2-M phase progression on gene disruption of RNA binding protein Sam68 in the DT40 cell line*. FEBS Lett, 2002. **525**(1-3): p. 145-50.
168. Taylor, S.J., R.J. Resnick, and D. Shalloway, *Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis*. BMC Cell Biol, 2004. **5**: p. 5.
169. Busa, R., M.P. Paronetto, D. Farini, E. Pierantozzi, F. Botti, D.F. Angelini, F. Attisani, G. Vespasiani, and C. Sette, *The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4372-82.
170. Song, L., L. Wang, Y. Li, H. Xiong, J. Wu, J. Li, and M. Li, *Sam68 up-regulation correlates with, and its down-regulation inhibits, proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells*. J Pathol, 2010. **222**(3): p. 227-37.
171. Jauliac, S., F. Mazerolles, N. Jabado, A. Pallier, F. Bernard, J. Peake, A. Fischer, and C. Hivroz, *Ligands of CD4 inhibit the association of phospholipase Cgamma1 with phosphoinositide 3 kinase in T cells: regulation of this association by the phosphoinositide 3 kinase activity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(10): p. 3183-91.
172. Latour, S. and A. Veillette, *Proximal protein tyrosine kinases in immunoreceptor signaling*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(3): p. 299-306.
173. Hawkins, J. and A. Marcy, *Characterization of Itk tyrosine kinase: contribution of noncatalytic domains to enzymatic activity*. Protein Expr Purif, 2001. **22**(2): p. 211-9.
174. Sanchez-Margalet, V., C. Martin-Romero, J. Santos-Alvarez, R. Goberna, S. Najib, and C. Gonzalez-Yanes, *Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action*. Clin Exp Immunol, 2003. **133**(1): p. 11-9.
175. Sanchez-Margalet, V. and S. Najib, *Sam68 is a docking protein linking GAP and PI3K in insulin receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **183**(1-2): p. 113-21.
176. Ramakrishnan, P. and D. Baltimore, *Sam68 is required for both NF-kappaB activation and apoptosis signaling by the TNF receptor*. Mol Cell, 2011. **43**(2): p. 167-79.
177. Micheau, O. and J. Tschopp, *Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes*. Cell, 2003. **114**(2): p. 181-90.
178. Wang, L., F. Du, and X. Wang, *TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways*. Cell, 2008. **133**(4): p. 693-703.
179. Fumagalli, S., N.F. Totty, J.J. Hsuan, and S.A. Courtneidge, *A target for Src in mitosis*. Nature, 1994. **368**(6474): p. 871-4.
180. Sanchez-Margalet, V. and C. Martin-Romero, *Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway*. Cell Immunol, 2001. **211**(1): p. 30-6.
181. Derry, J.J., S. Richard, H. Valderrama Carvajal, X. Ye, V. Vasioukhin, A.W. Cochrane, T. Chen, and A.L. Tyner, *Sik (BRK) phosphorylates Sam68 in the nucleus and negatively regulates its RNA binding ability*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(16): p. 6114-26.

182. Andreotti, A.H., S.C. Bunnell, S. Feng, L.J. Berg, and S.L. Schreiber, *Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family*. *Nature*, 1997. **385**(6611): p. 93-7.
183. Bunnell, S.C., P.A. Henry, R. Kolluri, T. Kirchhausen, R.J. Rickles, and L.J. Berg, *Identification of Itk/Tsk Src homology 3 domain ligands*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(41): p. 25646-56.
184. Lang, V., D. Mege, M. Semichon, H. Gary-Gouy, and G. Bismuth, *A dual participation of ZAP-70 and scr protein tyrosine kinases is required for TCR-induced tyrosine phosphorylation of Sam68 in Jurkat T cells*. *Eur J Immunol*, 1997. **27**(12): p. 3360-7.
185. Richard, S., D. Yu, K.J. Blumer, D. Hausladen, M.W. Olszowy, P.A. Connelly, and A.S. Shaw, *Association of p62, a multifunctional SH2- and SH3-domain-binding protein, with src family tyrosine kinases, Grb2, and phospholipase C gamma-1*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(1): p. 186-97.
186. Maa, M.C., T.H. Leu, B.J. Trandel, J.H. Chang, and S.J. Parsons, *A protein that is highly related to GTPase-activating protein-associated p62 complexes with phospholipase C gamma*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(8): p. 5466-73.
187. Taylor, S.J., M. Anafi, T. Pawson, and D. Shalloway, *Functional interaction between c-Src and its mitotic target, Sam 68*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(17): p. 10120-4.
188. Lawe, D.C., C. Hahn, and A.J. Wong, *The Nck SH2/SH3 adaptor protein is present in the nucleus and associates with the nuclear protein SAM68*. *Oncogene*, 1997. **14**(2): p. 223-31.
189. Trub, T., J.D. Frantz, M. Miyazaki, H. Band, and S.E. Shoelson, *The role of a lymphoid-restricted, Grb2-like SH3-SH2-SH3 protein in T cell receptor signaling*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(2): p. 894-902.
190. Lukong, K.E., D. Larocque, A.L. Tyner, and S. Richard, *Tyrosine phosphorylation of sam68 by breast tumor kinase regulates intranuclear localization and cell cycle progression*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(46): p. 38639-47.
191. Paronetto, M.P., D. Farini, I. Sammarco, G. Maturo, G. Vespasiani, R. Geremia, P. Rossi, and C. Sette, *Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(4): p. 1243-51.
192. Matter, N., P. Herrlich, and H. Konig, *Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68*. *Nature*, 2002. **420**(6916): p. 691-5.
193. Lee, S.C., H.J. Harn, T.S. Lin, K.T. Yeh, Y.C. Liu, C.S. Tsai, and Y.L. Cheng, *Prognostic significance of CD44v5 expression in human thymic epithelial neoplasms*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **76**(1): p. 213-8; discussion 218.
194. Cote, J., F.M. Boisvert, M.C. Boulanger, M.T. Bedford, and S. Richard, *Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(1): p. 274-87.
195. Stallcup, M.R., *Role of protein methylation in chromatin remodeling and transcriptional regulation*. *Oncogene*, 2001. **20**(24): p. 3014-20.
196. Espejo, A., J. Cote, A. Bednarek, S. Richard, and M.T. Bedford, *A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions*. *Biochem J*, 2002. **367**(Pt 3): p. 697-702.
197. McBride, A.E. and P.A. Silver, *State of the arg: protein methylation at arginine comes of age*. *Cell*, 2001. **106**(1): p. 5-8.
198. Gary, J.D. and S. Clarke, *RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1998. **61**: p. 65-131.

199. Polotskaia, A., M. Wang, S. Patschan, F. Addabbo, J. Chen, and M.S. Goligorsky, *Regulation of arginine methylation in endothelial cells: role in premature senescence and apoptosis*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(20): p. 2524-30.
200. Rho, J., S. Choi, C.-R. Jung, and D.-S. Im, *Arginine methylation of Sam68 and SLM proteins negatively regulates their poly(U) RNA binding activity*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2007. **466**(1): p. 49-57.
201. Babic, I., A. Jakymiw, and D.J. Fujita, *The RNA binding protein Sam68 is acetylated in tumor cell lines, and its acetylation correlates with enhanced RNA binding activity*. *Oncogene*, 2004. **23**(21): p. 3781-9.
202. Babic, I., E. Cherry, and D.J. Fujita, *SUMO modification of Sam68 enhances its ability to repress cyclin D1 expression and inhibits its ability to induce apoptosis*. *Oncogene*, 2006. **25**(36): p. 4955-64.
203. Liu, K., L. Li, P.E. Nisson, C. Gruber, J. Jessee, and S.N. Cohen, *Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with sam68 protein deficiency in cultured murine fibroblasts*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(51): p. 40195-201.
204. Paronetto, M.P., J.P. Venables, D.J. Elliott, R. Geremia, P. Rossi, and C. Sette, *Tr-kit promotes the formation of a multimolecular complex composed by Fyn, PLCgamma1 and Sam68*. *Oncogene*, 2003. **22**(54): p. 8707-15.
205. Paronetto, M.P., M. Cappellari, R. Busa, S. Pedrotti, R. Vitali, C. Comstock, T. Hyslop, K.E. Knudsen, and C. Sette, *Alternative splicing of the cyclin D1 proto-oncogene is regulated by the RNA-binding protein Sam68*. *Cancer Res*, 2010. **70**(1): p. 229-39.
206. Biscardi, J.S., R.C. Ishizawar, C.M. Silva, and S.J. Parsons, *Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2000. **2**(3): p. 203-10.
207. Irby, R.B. and T.J. Yeatman, *Role of Src expression and activation in human cancer*. *Oncogene*, 2000. **19**(49): p. 5636-42.
208. Rajan, P., L. Gaughan, C. Dalglish, A. El-Sherif, C.N. Robson, H.Y. Leung, and D.J. Elliott, *The RNA-binding and adaptor protein Sam68 modulates signal-dependent splicing and transcriptional activity of the androgen receptor*. *J Pathol*, 2008. **215**(1): p. 67-77.
209. Knudsen, K.E., *The cyclin D1b splice variant: an old oncogene learns new tricks*. *Cell Div*, 2006. **1**: p. 15.
210. Burd, C.J., C.E. Petre, L.M. Morey, Y. Wang, M.P. Revelo, C.A. Haiman, S. Lu, C.M. Fenoglio-Preiser, J. Li, E.S. Knudsen, J. Wong, and K.E. Knudsen, *Cyclin D1b variant influences prostate cancer growth through aberrant androgen receptor regulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(7): p. 2190-5.
211. Busa, R. and C. Sette, *An emerging role for nuclear RNA-mediated responses to genotoxic stress*. *RNA Biol*, 2010. **7**(4): p. 390-6.
212. Busa, R., R. Geremia, and C. Sette, *Genotoxic stress causes the accumulation of the splicing regulator Sam68 in nuclear foci of transcriptionally active chromatin*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(9): p. 3005-18.
213. Derry, J.J., G.S. Prins, V. Ray, and A.L. Tyner, *Altered localization and activity of the intracellular tyrosine kinase BRK/Sik in prostate tumor cells*. *Oncogene*, 2003. **22**(27): p. 4212-20.
214. Bielli, P., R. Busa, M.P. Paronetto, and C. Sette, *The RNA-binding protein Sam68 is a multifunctional player in human cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(4): p. R91-R102.

215. Richard, S., G. Vogel, M.E. Huot, T. Guo, W.J. Muller, and K.E. Lukong, *Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis*. *Oncogene*, 2008. **27**(4): p. 548-56.
216. Zhang, Z., J. Li, H. Zheng, C. Yu, J. Chen, Z. Liu, M. Li, M. Zeng, F. Zhou, and L. Song, *Expression and cytoplasmic localization of SAM68 is a significant and independent prognostic marker for renal cell carcinoma*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(10): p. 2685-93.
217. Paronetto, M.P., F. Zalfa, F. Botti, R. Geremia, C. Bagni, and C. Sette, *The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 14-24.
218. Grange, J., V. Boyer, R. Fabian-Fine, N.B. Fredj, R. Sadoul, and Y. Goldberg, *Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex*. *J Neurosci Res*, 2004. **75**(5): p. 654-66.
219. Locatelli, A., K.A. Lofgren, A.R. Daniel, N.E. Castro, and C.A. Lange, *Mechanisms of HGF/Met signaling to Brk and Sam68 in breast cancer progression*. *Horm Cancer*, 2012. **3**(1-2): p. 14-25.
220. Barker, K.T., L.E. Jackson, and M.R. Crompton, *BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas*. *Oncogene*, 1997. **15**(7): p. 799-805.
221. Ostrander, J.H., A.R. Daniel, and C.A. Lange, *Brk/PTK6 signaling in normal and cancer cell models*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(6): p. 662-9.
222. Gorla, L., M. Cantù, F. Miccichè, C. Patelli, P. Mondellini, M.A. Pierotti, and I. Bongarzone, *RET oncoproteins induce tyrosine phosphorylation changes of proteins involved in RNA metabolism*. *Cellular Signalling*, 2006. **18**(12): p. 2272-2282.
223. Huot, M.E., C.M. Brown, N. Lamarche-Vane, and S. Richard, *An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(7): p. 1933-43.
224. Cheung, N., L.C. Chan, A. Thompson, M.L. Cleary, and C.W. So, *Protein arginine-methyltransferase-dependent oncogenesis*. *Nat Cell Biol*, 2007. **9**(10): p. 1208-15.
225. So, C.W., C. Caldas, M.M. Liu, S.J. Chen, Q.H. Huang, L.J. Gu, M.H. Sham, L.M. Wiedemann, and L.C. Chan, *EEN encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to MLL in human leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(6): p. 2563-8.
226. Zhang, Z., Y. Xu, N. Sun, M. Zhang, J. Xie, and Z. Jiang, *High Sam68 expression predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer*. *Clin Transl Oncol*, 2014.
227. Lukong, K.E. and S. Richard, *Targeting the RNA-binding protein Sam68 as a treatment for cancer?* *Future Oncol*, 2007. **3**(5): p. 539-44.
228. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural products as sources of new drugs over the last 25 years*. *J Nat Prod*, 2007. **70**(3): p. 461-77.
229. Slingerland, M., C. Cerella, H.J. Guchelaar, M. Diederich, and H. Gelderblom, *Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials*. *Invest New Drugs*, 2013. **31**(4): p. 1087-94.
230. Virology toolbox: the western blot. 2010 [cited 2014 10/06]; Available from: <http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>.
231. Leinco Technologies Inc. General Western Blot Protocol. 2006 [cited 2014 10/06]; Available from: [http://www.leinco.com/general\\_wb](http://www.leinco.com/general_wb).
232. Gao, H., R. Popescu, B. Kopp, and Z. Wang, *Bufadienolides and their antitumor activity*. *Nat Prod Rep*, 2011. **28**(5): p. 953-69.

233. Huang, W.W., J.S. Yang, S.J. Pai, P.P. Wu, S.J. Chang, F.S. Chueh, M.J. Fan, S.M. Chiou, H.M. Kuo, C.C. Yeh, P.Y. Chen, M. Tsuzuki, and J.G. Chung, *Bufalin induces G0/G1 phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2012. **732**(1–2): p. 26–33.
234. Larsen, J.E.a.M., J. D., *Molecular biology of lung cancer: clinical implications*. Clin Chest Med, 2011. **32**(4): p. 703-40.
235. Rodenhuis, S., R.J. Slebos, A.J. Boot, S.G. Evers, W.J. Mooi, S.S. Wagenaar, P.C. van Bodegom, and J.L. Bos, *Incidence and possible clinical significance of K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung*. Cancer Res, 1988. **48**(20): p. 5738-41.
236. Kim, D.H., J.S. Kim, J.H. Park, S.K. Lee, Y.I. Ji, Y.M. Kwon, Y.M. Shim, J. Han, and J. Park, *Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutation in primary non-small cell lung cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(19): p. 6206-11.
237. Chardin, P., J.H. Camonis, N.W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M.H. Wigler, and D. Bar-Sagi, *Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2*. Science, 1993. **260**(5112): p. 1338-43.
238. Hesson, L.B., W.N. Cooper, and F. Latif, *The role of RASSF1A methylation in cancer*. Dis Markers, 2007. **23**(1-2): p. 73-87.
239. Chen, H., M. Suzuki, Y. Nakamura, M. Ohira, S. Ando, T. Iida, T. Nakajima, A. Nakagawara, and H. Kimura, *Aberrant methylation of RASGRF2 and RASSF1A in human non-small cell lung cancer*. Oncol Rep, 2006. **15**(5): p. 1281-5.
240. Richardson, G.E. and B.E. Johnson, *The biology of lung cancer*. Semin Oncol, 1993. **20**(2): p. 105-27.
241. Adhikary, S. and M. Eilers, *Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(8): p. 635-45.
242. Nau, M.M., B.J. Brooks, Jr., D.N. Carney, A.F. Gazdar, J.F. Battey, E.A. Sausville, and J.D. Minna, *Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(4): p. 1092-6.
243. Scrima, M., C. De Marco, F. Fabiani, R. Franco, G. Pirozzi, G. Rocco, M. Ravo, A. Weisz, P. Zoppioli, M. Ceccarelli, G. Botti, D. Malanga, and G. Viglietto, *Signaling networks associated with AKT activation in non-small cell lung cancer (NSCLC): new insights on the role of phosphatidylinositol-3 kinase*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e30427.
244. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. **7**(8): p. 606-19.
245. Hay, N., *The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer*. Cancer Cell, 2005. **8**(3): p. 179-83.
246. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
247. Paik, J.H., R. Kollipara, G. Chu, H. Ji, Y. Xiao, Z. Ding, L. Miao, Z. Tothova, J.W. Horner, D.R. Carrasco, S. Jiang, D.G. Gilliland, L. Chin, W.H. Wong, D.H. Castrillon, and R.A. DePinho, *FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis*. Cell, 2007. **128**(2): p. 309-23.
248. Brunet, A., A. Bonni, M.J. Zigmond, M.Z. Lin, P. Juo, L.S. Hu, M.J. Anderson, K.C. Arden, J. Blenis, and M.E. Greenberg, *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.

249. Yang, J.Y., C.S. Zong, W. Xia, H. Yamaguchi, Q. Ding, X. Xie, J.Y. Lang, C.C. Lai, C.J. Chang, W.C. Huang, H. Huang, H.P. Kuo, D.F. Lee, L.Y. Li, H.C. Lien, X. Cheng, K.J. Chang, C.D. Hsiao, F.J. Tsai, C.H. Tsai, A.A. Sahin, W.J. Muller, G.B. Mills, D. Yu, G.N. Hortobagyi, and M.C. Hung, *ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 138-48.
250. Kiefer, P.E., B. Wegmann, M. Bacher, C. Erbil, H. Heidtmann, and K. Havemann, *Different pattern of expression of cellular oncogenes in human non-small-cell lung cancer cell lines*. J Cancer Res Clin Oncol, 1990. **116**(1): p. 29-37.
251. Jiang, Y., L. Zou, W.Q. Lu, Y. Zhang, and A.G. Shen, *Foxo3a expression is a prognostic marker in breast cancer*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70746.
252. Bullock, M.D., A. Bruce, R. Sreekumar, N. Curtis, T. Cheung, I. Reading, J.N. Primrose, C. Ottensmeier, G.K. Packham, G. Thomas, and A.H. Mirnezami, *FOXO3 expression during colorectal cancer progression: biomarker potential reflects a tumour suppressor role*. Br J Cancer, 2013. **109**(2): p. 387-94.
253. Doris, P.A. and A.Y. Bagrov, *Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress*. Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **218**(3): p. 156-67.