



**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
U.F.R. DE MEDECINE**

Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : **Biologie Cellulaire et moléculaire**

Présentée par

Kahina MEDJBER

Soutenue publiquement le 30 janvier 2012

**Etude de l'implication des récepteurs nicotiniques à
l'acétylcholine dans le développement des cancers
pulmonaires non à petites cellules**

Directeur de thèse

M. le Docteur Jean-Marie ZAHM

Devant le jury :

Mme le Docteur Marina PRETOLANI (Paris)
M. le Professeur Jean-François BERNAUDIN (Paris)
M. le Docteur Uwe MASKOS (Paris)
M. le Professeur François LEBARGY (Reims)
M. le Docteur Jean-Marie TOURNIER (Reims)
M. le Docteur Jean-Marie ZAHM (Reims)

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Etude de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans le développement des cancers pulmonaires non à petites cellules

Résumé

La progression tumorale est caractérisée par deux processus clés, la prolifération et l'invasion cellulaires. Les nAChRs, activés par la nicotine et ses nitrosamines dérivées (NNN et NNK), modulent les concentrations calciques intracellulaires et activent *in vitro* la prolifération, l'apoptose, la migration et l'invasion de lignées cellulaires tumorales. Dans cette étude, nous montrons, en utilisant des cultures primaires de cellules dérivées de cancers pulmonaires non à petites cellules (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes), que les nAChRs $\alpha 7$ régulent différemment la prolifération cellulaire en fonction du stade de différenciation des tumeurs. Le nAChR $\alpha 7$ agit comme répresseur de la prolifération cellulaire dans les tumeurs bien différenciées et dans l'épithélium respiratoire normal, alors que dans les tumeurs peu différenciées, il stimule la prolifération cellulaire en réponse à la nicotine. A l'inverse, le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ n'est que partiellement impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire aussi bien dans les tumeurs pulmonaires que dans l'épithélium respiratoire normal. Les nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ sont tous les deux impliqués dans la stimulation de l'invasion des cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes. Le polymorphisme non-synonyme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ induit une mutation au niveau d'un acide aminé hautement conservé (D398N). De nombreuses études d'association pangénomiques lient ce polymorphisme au développement des cancers pulmonaires. Dans cette étude nous montrons que les nAChRs exprimant la sous-unité $\alpha 5$ mutée (D398N) **altèrent la prolifération et la différenciation des cellules respiratoires** et modulent **l'invasion des cellules tumorales, en synergie avec les nAChRs $\alpha 7$.**

Mot clés : récepteurs nicotiniques, cancers pulmonaires non à petites cellules, progression tumorale, polymorphisme rs16969968

Study of the involvement of nicotinic acetylcholine receptors in the development of non-small cell lung cancer

Abstract

Tumor progression is characterized by two key processes, cell proliferation and invasion. Nicotinic receptors, activated by nicotine and its derived nitrosamines (NNK and NNN) modulate intracellular calcium concentrations and activate *in vitro* proliferation, apoptosis, migration and invasion of tumor cell lines. In this study, we show, by using primary cell cultures from lung cancer tumors, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma, that nAChR $\alpha 7$ differently regulates cell proliferation according to the state of tumor differentiation. The $\alpha 7$ nAChRs acts as a repressor of cell proliferation in differentiated lung cancer tissues and in the normal respiratory epithelium, while it stimulates cell proliferation in response to nicotine, in poorly differentiated tumors. Conversely, the $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ nAChR is only partially involved in the regulation of cell proliferation in lung cancers and in the normal respiratory epithelium. The $\alpha 7$ and $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ nAChRs are both involved in the *in vitro* invasion process of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Non-synonymous polymorphism rs16969968 in the CHRNA5 gene induces a mutation in a highly conserved amino acid (D398N). Many genome-wide association studies have demonstrated the relationship between this polymorphism and the incidence of lung cancer. In this study, we show that nAChRs, expressing the mutated $\alpha 5$ subunit (D398N), are involved in the alteration of the proliferation and the differentiation state of respiratory epithelial cells, and also modulate tumor cell invasion, in synergy with the $\alpha 7$ nAChRs.

Key words : nicotinic receptors, non-small cell lung cancers, tumor progression, polymorphism rs16969968

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	8
LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	10
LISTE DES ILLUSTRATIONS	12
LISTE DES TABLEAUX	16
INTRODUCTION.....	16
A- Introduction générale	16
I- Appareil respiratoire	16
I-1 Anatomie de l'appareil respiratoire	16
I-1 Histologie de l'épithélium respiratoire	18
I-1.1 L'épithélium trachéo-bronchique de surface	18
a) Les cellules ciliées	18
b) Les cellules caliciformes ou sécrétoires	20
c) Cellules basales.....	21
d) Les cellules neuro-endocrines	22
II- Fonctions de l'épithélium respiratoire	26
II-1 Intégrité de la barrière épithéliale.....	26
II-2 Clairance mucociliaire.....	28
II-3 Défense immunitaire de l'appareil respiratoire	28
B- Les cancers broncho-pulmonaires	25
I- Epidémiologie.....	25
II- Etiologie.....	26
III- Histologie des lésions précancéreuses bronchiques	27
IV- Classification des cancers broncho-pulmonaires	28
IV-1 Classification anatomopathologique des cancers broncho-pulmonaires selon l'OMS (2004)	29
IV-1.1 Les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC)	29
IV-1.2 Cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)	30
a) Carcinomes épidermoïdes ou malpighiens	30
b) Adénocarcinomes	30
c) Les carcinomes à grandes cellules	31
IV-2 Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'IUCC (2009) ...	31
V- La progression tumorale	34

C-	Le système cholinergique de l'appareil respiratoire	36
I-	Le système cholinergique neuronal	36
I-1	Généralités	36
I-2	L'acétylcholine neuronale.....	36
II-	Le système cholinergique non-neuronal dans les cellules épithéliales respiratoires.	37
II-1	Généralités.....	37
II-2	L'acétylcholine non-neuronale : synthèse et sécrétion	38
III-	Les récepteurs à l'acétylcholine	39
III-1	Les récepteurs muscariniques.....	39
III-2	Les récepteurs nicotiques	40
III-2.1	Structure générale des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine	41
III-2.2	Diversité des nAChRs	42
III-2.3	Les Transitions allostériques des récepteurs nicotiques	44
III-2.4	Les différents ligands des nAChRs.....	45
III-2.5	Distribution des récepteurs nicotiques dans l'épithélium respiratoire de surface	48
III-2.6	Rôles des nAChRs dans l'épithélium respiratoire normal	49
a)	nAChRs et morphogénèse pulmonaire	49
b)	nAChRs et l'adhérence cellulaire	50
c)	nAChRs et prolifération cellulaire.....	51
d)	nAChRs et migration cellulaire	51
III-2.7	Expression des nAChRs dans les cancers broncho-pulmonaires.....	52
III-2.8	Rôle des nAChRs dans les cancers broncho-pulmonaires	53
a)	nAChRs et prolifération des cellules tumorales	53
b)	nAChRs et apoptose cellulaire	54
c)	nAChRs et migration/invasion des cellules tumorales.....	55
d)	nAChRs et angiogénèse.....	55
D-	Les cancers broncho-pulmonaires et le polymorphisme des nAChRs.....	56
I-	Généralités	56
II-	Le polymorphisme nucléotidique des nAChRs	56
III-	Rôle du polymorphisme CHRNA3/A5/B4 dans les cancers broncho-pulmonaires..	58
	OBJECTIFS DE L'ETUDE	59
	MATERIELS ET METHODES	61

I-	Tissus bronchiques humains normaux et tumoraux	61
II-	Immunohistochimie	61
II-1	Réalisation des cryo-coupes	61
II-2	Anticorps utilisés.....	61
II-3	Mode opératoire	62
III-	Analyse transcriptionnelle par RT-PCR	63
III-1	Extraction de l'ARN à partir des tissus normaux et tumoraux	63
III-2	La RT-PCR.....	63
III-3	Migration et révélation des produits de RT-PCR.....	65
IV-	Analyse de la régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire par les nAChRs.....	65
IV-1	Culture cellulaire	65
IV-1.1	Dissociation des cellules épithéliales bronchiques normales.....	65
IV-1.2	Dissociation des cellules tumorales	66
IV-1.3	Conditions de culture	66
IV-2	Test de prolifération MTT	66
IV-3	Test d'invasion en chambre de Boyden	67
IV-4	Caractérisation des cellules tumorales	68
IV-4.1	Mode opératoire	69
IV-4.2	La coloration Papanicolaou.....	70
IV-4.3	Coloration de Feulgen.....	71
V-	Analyse du rôle du polymorphisme des nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ dans la progression tumorale	72
V-1	La construction des lentivirus	72
V-2	Infection des souris avec les lentivirus.....	73
V-3	Modèle de régénération in vivo de l'épithélium trachéal de souris	73
V-4	Lignées cellulaires.....	74
V-5	Conditions de culture	74
V-6	Culture primaire des cellules respiratoires	74
V-7	Génotypage du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$	75
V-8	Analyse de la migration cellulaire.....	76
VI-	Analyses statistiques	77
	RESULTATS	78

A-	Implication des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la progression des cancers pulmonaires non à petites cellules.....	78
I-	Expression des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans les tissus bronchiques humain sains et tumoraux	78
I-1	Expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les tissus bronchiques humains normaux.....	78
I-2	Expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.....	79
I-3	Analyse par RT-PCR de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ et $\beta 4$ dans les tissus bronchiques normaux et tumoraux	81
II-	Régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire par les nAChR $\alpha 7$ et nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$	84
II-1	Caractérisation des cellules tumorales isolées	84
a)	L'immunocytochimie	84
b)	Colorations de Papanicolaou et de Feulgen.....	85
II-2	Etude <i>in vitro</i> de la régulation de la prolifération des cellules bronchiques normales et tumorales par les nAChRs	87
II-2.1	Les voies de signalisations impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire	89
II-3	Etude <i>in vitro</i> de la régulation de l'invasion des cellules tumorales par les nAChRs	91
II-3.1	Caractérisation des cellules de la face supérieure et inférieure des membranes de Boyden.....	91
II-3.2	Analyse en chambres de Boyden de l'invasion des cellules tumorales.....	92
B-	Etude de l'implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ dans le développement des cancers broncho-pulmonaires	93
I-	Etude <i>in vivo</i> de la régénération de l'épithélium trachéal des souris KO $\alpha 5$	93
II-	Etude <i>in vivo</i> du rôle du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs dans la régénération de l'épithélium trachéal murin.	94
III-	Etude de l'implication du polymorphisme D398N dans la régulation de la prolifération cellulaire.....	95
IV-	Etude de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la migration et de l'invasion cellulaires	98

DISCUSSION	101
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	111
BIBLIOGRAPHIE	113

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

$\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Regulates Airway Epithelium Differentiation by Controlling Basal Cell Proliferation. Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloëz-Tayarani I, Changeux JP, Bulet H, Terryn C, Coraux C, Zahm JM, Birembaut P, Tournier JM. Am J Pathol, 2009 ; 175(5):1868-82.

$\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor regulates CFTR chloride channel function in the human airway epithelium. Kamel Maouche, Kahina Medjber, Jean-Marie Zahm, Franck Delavoie, Jacqueline Roux, Christine Terryn, Isabelle Cloëz-Tayarani, Jean-Pierre Changeux, Christelle Coraux, Uwe Maskos, Philippe Birembaut and Jean-Marie Tournier. (En cours de rédaction)

Communications orales

Medjber K , Maouche K , Collet S, Zahm JM, Tournier JM et Birembaut P. Etude de l'expression et de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans les cancers broncho-pulmonaires. Journées de Recherche respiratoire 2011 (J2R 2011). Toulouse, France 21 et 22 octobre 2011

Medjber K , Maouche K , Collet S, Zahm JM, Tournier JM et Birembaut P. Etude de l'expression et de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans les cancers broncho-pulmonaires. Journée des jeunes chercheurs. Reims, France, 20 mai 2011

Medjber K , Tournier JM, Zahm JM, et Birembaut P. Etude de l'expression et de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans les cancers broncho-pulmonaires. Journée des jeunes chercheurs à Reims le 29 avril 2010

Communications par voie d'affiche

Medjber K , Maouche K , Collet S, Zahm JM, Tournier JM et Birembaut P. Etude de l'expression et de l'implication des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine dans les cancers broncho-pulmonaires. Journées de Recherche respiratoire 2011 (J2R 2011). Toulouse, France, 21 et 22 octobre 2011

Medjber K , Maouche K, Tournier JM, Zahm JM et Birembaut P. Potential roles of nicotinic acetylcholine receptors in the progression of lung cancers. Third International Symposium on Non-neuronal Acetylcholine. Groningen, Pays Bas, 24, 25 et 26 aout 2011.

Medjber K, Maouche K, Tournier JM, Zahm JM et Birembaut P. Expression des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine dans les cancers broncho-pulmonaires. Journées de recherche respiratoire (J2R). Nantes, France, 15 et 16 octobre 2010.

Medjber K, Maouche K, Tournier J-M, Zahm JM et Birembaut P. Expression of nicotinic acetylcholine receptors in Non-Small Cell Lung Cancers. International Symposium of the Federative Research Institute N°53 : Cell-Microenvironment Interactions. Reims, France, 7, 8 et 9 juin 2010.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BAD	Bcl2 antagonist of cell death
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BEBM	Bronchial epithelial cell basal medium
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	Bovine serum albumin
BTX	Bungarotoxine
Cadhérine E	Cadhérine épithéliale
CarAT	Carnitine acétyltransférase
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming units
ChAT	Choline-acétyltransférase
CHT	Choline Transporter
CK	Cytokératine
CO ₂	Dioxyde de carbone
D.O.	Densité optique
DAPI	4', 6'-diamino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMPP	Diméthylphenylpiperazine
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
FT	Facteur Tissulaire
g	Gramme
h	Heure
GFP	Green Fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GSI-B4	<i>Griffonia simplicifolia</i> Isolectin B4
HBEC	Human bronchial epithelial cells
HEPES	4(2hydroxyethyl) 1piperazineethanesulfonic acid
Hex	Hexaméthonium
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
J	Jour
kb	Kilobase
KO	Knock Out
L	Litre
Lenti	Lentivirus
LPS	Lipopolysaccharide
LTB ₄	Leukotriene B4
M	Molaire (mol/L)
mAChRs	Muscarinic acetylcholine receptors

MAP	Mitogeneactivated protein
MEK	MAP kinase / ERK kinase
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
MLA	Méthyllylaconitine
mm	Millimètre
M	Mole par litre
MTT	MethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
MMP	Métalloprotéinase
nAChRs	Nicotinic acetylcholine receptors
NANC	Non-Adrénérique Non-Cholinergique
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
nM	Nanomole par litre
NMDA	N-méthyl-D-aspartic acide
NO ₂	Dioxyde d'azote
OCT	Optimum cutting temperature compound
OCT	Organic cation transporters
<i>p</i>	Probabilité d'erreur
pb	Paire de base
PBS	Phosphatebuffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE	Phycoerethrin
pH	Potentiel hydrogène
PI3K	Phosphatidylinositol 3kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
Ras	Raspberry
RT	Reverse transcription
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sec	Seconde
siRNA	Small interfering RNA
SO ₂	Dioxyde de soufre
SVF	Sérum de veau foetal
Taq	Thermophilus aquaticus DNA polymérase
TFF	Trefoil factor family peptide
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TTF	Thyroid transcription factor
U	Unité
VACHT	Vesicular acetylcholine transporter
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
ZO	Zonula occludens
µg	Microgramme
µM	Micromole par litre
µm	Micromètre

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des figures

Figure 1: Schéma de l'appareil respiratoire

Figure 2: Schéma des différents épithéliums des voies aériennes inférieures

Figure 3: Les différents types cellulaires de l'épithélium trachéo-bronchique humain.

Figure 4: Transport mucociliaire

Figure 5: Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.

Figure 6: Les cellules basales et parabasales de l'épithélium trachéo-bronchique

Figure 7: Les cellules neuroendocrines de l'épithélium trachéo-bronchique

Figure 8: Organisation des complexes jonctionnels des cellules épithéliales

Figure 9: Schéma de défense immunitaire de l'appareil respiratoire

Figure 10: Taux d'incidence et de mortalité des cancers les plus fréquemment diagnostiqués en France dans les deux sexes.

Figure 11: Histologie des lésions pré-néoplasiques bronchiques

Figure 12: Coupe histologique d'une tumeur bronchique à petite cellule

Figure 13: Exemple de carcinomes épidermoïdes malpighiens bien différenciés (A) ou peu différenciés (B).

Figure 14: Exemple d'adénocarcinomes bien différenciés (A) ou peu différenciés (B).

Figure 15: Exemple d'atteinte et du développement du cancer du poumon selon le stade TNM

Figure 16: Schéma des étapes de la progression tumorale

Figure 17: Innervation cholinergique du poumon

Figure 18: Schéma des différents composants du système cholinergique neuronal.

Figure 19: Expression et synthèse de l'acétylcholine (ACh) dans les différentes formes de vies.

Figure 20: Schéma d'organisation d'une sous-unité nicotinique et de l'arrangement d'un récepteur nicotinique de l'acétylcholine.

Figure 21: Représentation schématique du site primaire et complémentaire de liaison des agonistes des nAChRs de type musculaire.

Figure 22: Transitions allostériques des nAChRs

Figure 23: Représentation schématique d'un récepteur nicotinique et des sites de liaison des agonistes, antagonistes et des modulateurs allostériques.

Figure 24: Distribution des différentes sous-unités nicotiniques dans les voies aériennes respiratoires

Figure 25: Représentation schématique des différentes fonctions des nAChR dans l'épithélium respiratoire humain

Figure 26: Le nAChR $\alpha 7$ et les hétéropentamères de type $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ régulent la prolifération et l'apoptoses des cellules tumorales pulmonaires non à petites cellules

Figure 27: Le nAChR $\alpha 7$ régule l'apoptose des cellules tumorales des cancers bronchiques à petites cellules

Figure 28: Représentation schématique des différentes voies de signalisation activées par les nAChRs

Figure 29: Représentation schématique du cluster 15q25-1 contenant les gènes CHRNA3, CHRNA5 et CHRNB4 codants respectivement pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$

Figure 30: La Séquence nucléotidique et protéique contenant le site du polymorphisme rs16969968

Figure 31: Schémas des étapes de RT-PCR

Figure 32: Schéma du système d'invasion en chambre de Boyden

Figure 33: Description du lentivirus pTK431

Figure 34: Infection intratrachéal des souris KO $\alpha 5$ avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 (WT) et $\alpha 5$ -D398N et lésion de l'épithélium trachéal par instillation intranasale au polidocanol.

Figure 35: Procédé automatisé d'extraction de l'ADN.

Figure 36: Expression des sous-unités nicotiniques $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans l'épithélium bronchique de surface et dans les glandes de la sous-muqueuse bronchique.

Figure 37: Expression de la sous-unité $\alpha 7$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.

Figure 38: Expression de la sous-unité $\beta 2$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.

Figure 39: Localisation des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

Figure 40: Etude de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules

Figure 41: Etude de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ en fonction du stade de différenciation des tumeurs.

Figure 42: Localisation par double marquage du nAChR $\alpha 7$ et du Ki67 dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

Figure 43: Exemple d'analyse par immunocytochimie de l'expression des cytokératines et de la vimentine des cellules cytocentrifugées (cytopins).

Figure 44: Coloration de Papanicolaou

Figure 45: Analyse de la ploïdie des cellules tumorales isolées

Figure 46: Coloration de Feulgen

Figure 47: Morphologie des cellules bronchiques normales et des cellules tumorales

Figure 48: Etude in vitro de la régulation de la prolifération des cellules bronchiques normales et tumorales par les nAChRs

Figure 49: Analyse des voies de signalisations impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules de l'épithélium respiratoire.

Figure 50: Analyse par immunocytochimie de l'expression des cytokératines et de la vimentine dans les cellules des faces supérieure et inférieure des membranes de chambres de Boyden.

Figure 51: Etude de l'invasion des cellules tumorales dérivées des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes, bien et peu différenciés.

Figure 52: Régénération de l'épithélium trachéal de souris contrôles (WT) et KO $\alpha 5$.

Figure 53: Régénération de l'épithélium trachéal de souris KO $\alpha 5$ transduites avec les lentivirus exprimant la GFP, la sous-unité $\alpha 5$ sauvage (D398) ou mutée (D398N).

Figure 54: Analyse de la prolifération des cellules de souris KO $\alpha 5$ infectées in vitro avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N

Figure 55: Analyse in vitro de la prolifération des cellules de souris KO $\alpha 5$ infectées in vivo avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N

Figure 56: Analyse de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régulation de la prolifération des lignées cellulaires HBE4, B2B et NCI-H1299

Figure 57: Analyse de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ des nChRs dans la migration cellulaire

Figure 58: Analyse de l'effet des drogues nicotiques (α -conotoxine MII, micamylamine, α -bungarotoxine et la nicotine) sur l'invasion des cellules tumorales en relation avec le génotype de la sous-unité $\alpha 5$ (WT ou HET+SNP)

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des tumeurs broncho-pulmonaires par stades

Tableau 2 : Représentation non exhaustive, des différentes combinaisons observées *in vitro* ou *in vivo* chez les vertébrés.

Tableau 3 : Les agonistes des nAChRs

Tableau 4 : Les antagonistes et les modulateurs allostériques positifs des nAChRs

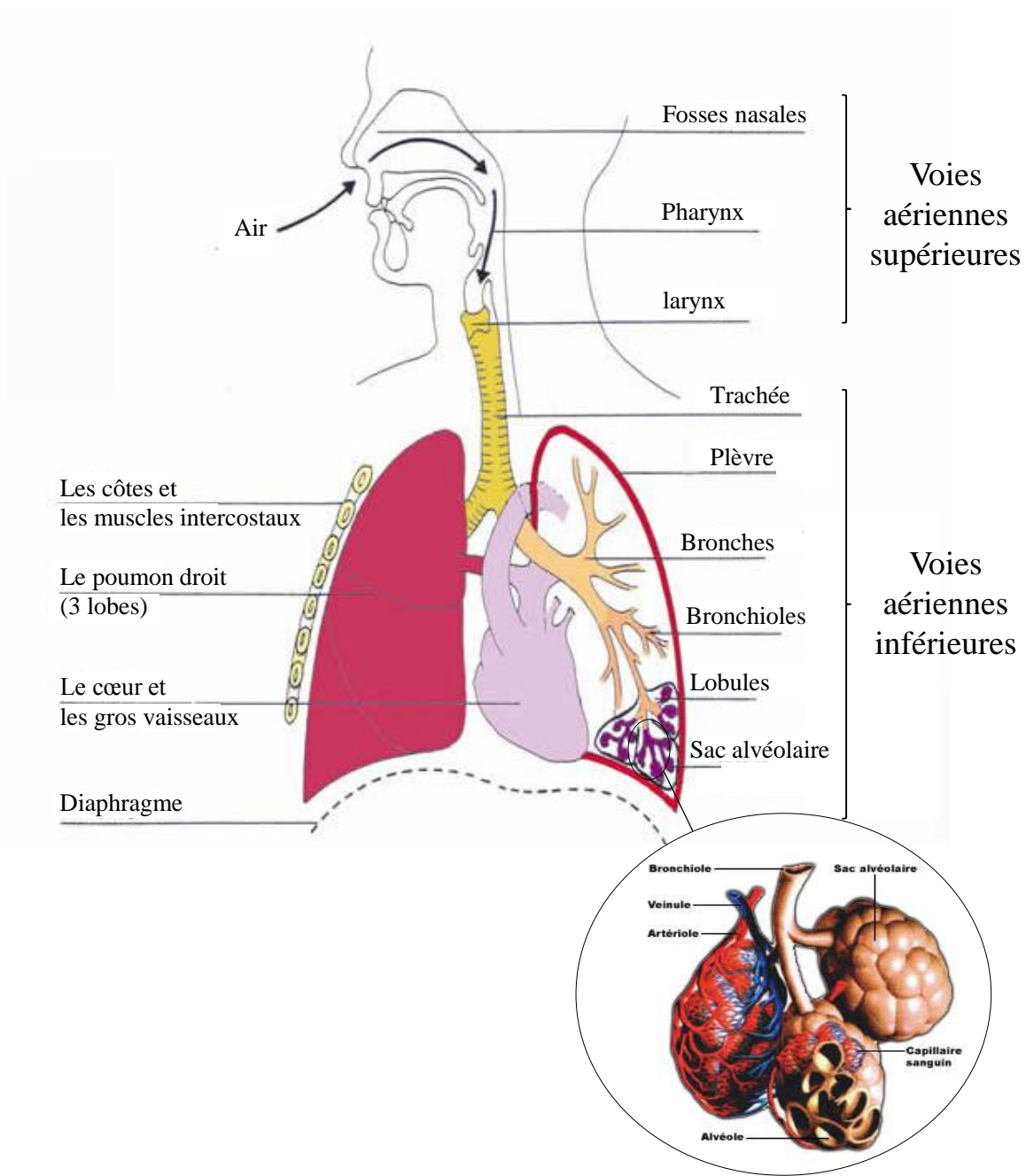
Tableau 6 : Températures d'hybridation, durée et nombre de cycles des différentes amorces utilisées.

Tableau 7 : Inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération

Tableau 8 : Mode opératoire de la coloration Papanicolaou (PPN)

Tableau 9 : Mode opératoire de la coloration Feulgen

Tableau 10 : Séquences des amorces et taille de l'amplicon du gène CHRNA5



<http://pacp-tpe.blogspot.com/2009/02/i-incidence-du-cancer-des-poumons.html>

Figure 1: Schéma de l'appareil respiratoire

INTRODUCTION

A- Introduction générale

I- Appareil respiratoire

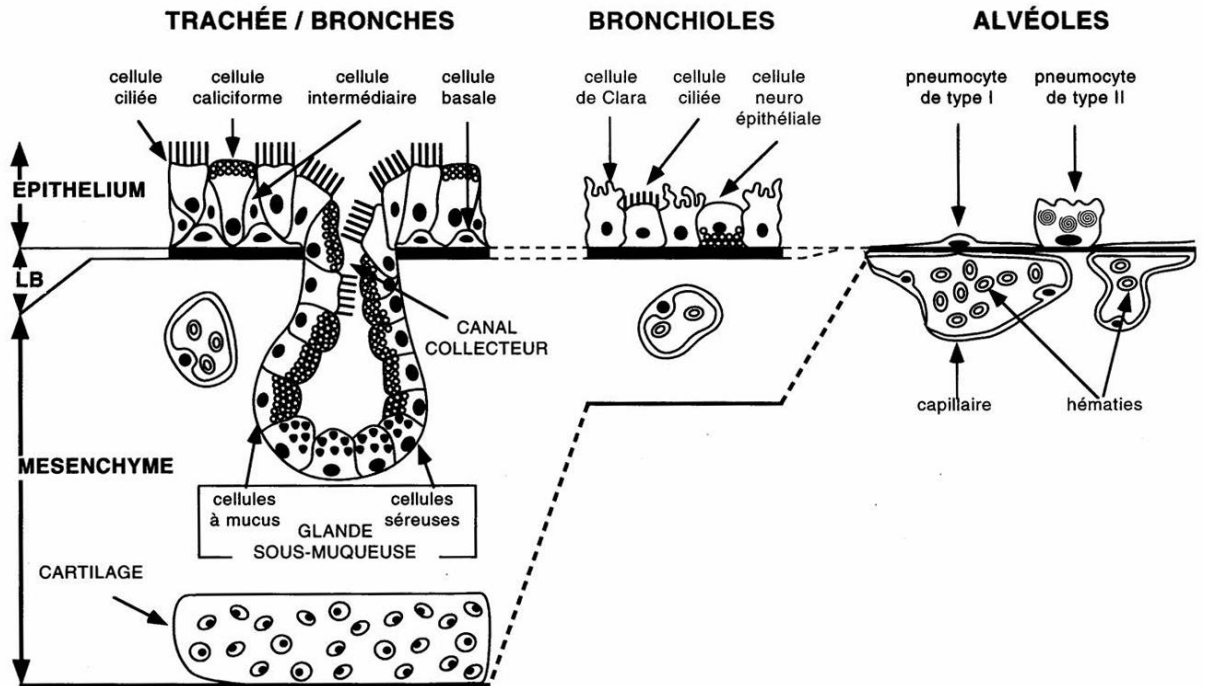
I-1 Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire a principalement pour rôle d'oxygéner le sang et d'expulser en échange, les déchets gazeux, constitués majoritairement par le CO₂. Le système respiratoire est composé de deux parties, les voies aériennes supérieures et les voies aériennes inférieures.

Les voies aériennes supérieures correspondent à l'ensemble des conduits permettant à l'air d'accéder aux poumons : la cavité nasale (qui permet de réchauffer, d'humidifier et de filtrer l'air), la cavité buccale, le pharynx et le larynx.

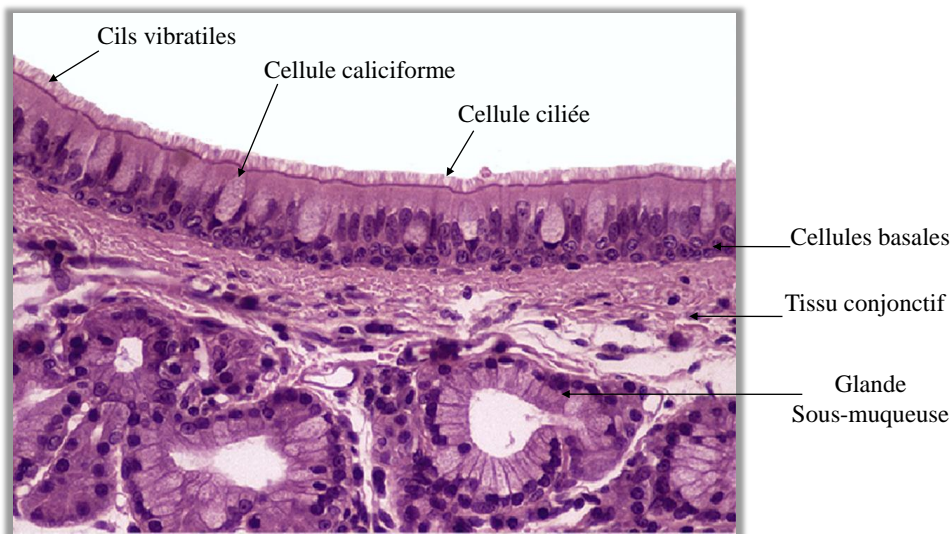
Les voies aériennes inférieures correspondent à un arbre inversé, qui s'étend depuis la trachée jusqu'aux bronchioles. La trachée se divise en deux bronches souches qui pénètrent dans le hile des deux poumons et se ramifient en bronches lobaires. Ainsi, au fur et mesure de leur progression intra-pulmonaire, les bronches se divisent de manière dichotomique en bronches segmentaires, puis en petites bronches, pour enfin aboutir aux bronchioles qui se terminent par les alvéoles pulmonaires (dont le nombre chez l'homme est de 300 millions) au niveau desquelles ont lieu les échanges gazeux (**Figure 1**).

Plus on pénètre dans le poumon, plus les bronches diminuent de taille et deviennent plus musculaires que cartilagineuses. La paroi des voies aériennes est très bien adaptée à la conduction car elle permet d'associer rigidité, flexibilité et extensibilité. La paroi des voies aériennes est formée de différentes couches cellulaires dont la composition et la répartition varient de la trachée aux bronchioles afin de s'adapter au mieux au diamètre des voies aériennes et à leur fonction.



Thèse delphine GRAS, 2006

Figure 2: Schéma des différents épithéliums des voies aériennes inférieures



Thèse Kamel MAOUCHE, 2006

Figure 3: Les différents types cellulaires de l'épithélium trachéo-bronchique humain.

Introduction

I-1 Histologie de l'épithélium respiratoire

L'appareil respiratoire humain est tapissé d'un épithélium dont l'organisation morphologique diffère selon sa localisation dans les voies aériennes. La composition cellulaire varie en fonction de sa position dans l'arbre respiratoire, où chaque cellule aura des propriétés spécifiques. L'épithélium des voies aériennes inférieures contient trois types d'épithélium : l'épithélium trachéo-bronchique, cylindrique pseudostratifié, l'épithélium bronchiolaire, cylindrique simple puis cubique simple au niveau des bronchioles terminales, et l'épithélium alvéolaire, simple, (**Figure 2**).

I-1.1 L'épithélium trachéo-bronchique de surface

L'épithélium trachéo-bronchique de surface est un épithélium cylindrique pseudostratifié composés principalement de 4 types cellulaires qui reposent sur la lame basale, cependant toutes n'atteignent pas la lumière bronchique. Cet épithélium est composé de cellules ciliées, de cellules caliciformes mucosécrétantes, de cellules basales et de cellules neuroendocrines (Breeze et Wheeldon 1977), qui sont reliées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires formant un ensemble cohésif et jouant un rôle de barrière mécanique de protection vis-à-vis des pathogènes inhalés ou des aérocontaminants.

a) Les cellules ciliées

Les cellules ciliées représentent la population cellulaire la plus abondante de l'épithélium trachéo-bronchique (Spina 1998). Ce sont des cellules cylindriques polarisées, avec un pôle apical qui comporte 200 à 300 cils vibratiles (Rhodin 1966) et des microvillosités visibles uniquement en microscopie électronique. Les cellules ciliées sont riches en canaux ioniques membranaires et en mitochondries qui produisent l'ATP nécessaire au battement des cils. Les cellules ciliées sont directement ancrées à la lame basale via des contacts non jonctionnels ou indirectement par des desmosomes qui les lient aux cellules basales (Shebani *et al.* 2005). Les cellules ciliées ont pour origine les cellules basales (Ayers et Jeffery 1988) ou sécrétoires (Evans et Plopper 1988) et constituent une entité cellulaire différenciée (Kauffman 1980; McDowell *et al.* 1983) (**Figure 3**). Toutefois, les cellules ciliées peuvent présenter une plasticité de leur phénotype au cours de la réparation de l'épithélium respiratoire bronchiolaire. Lorsque l'épithélium bronchiolaire est lésé, les

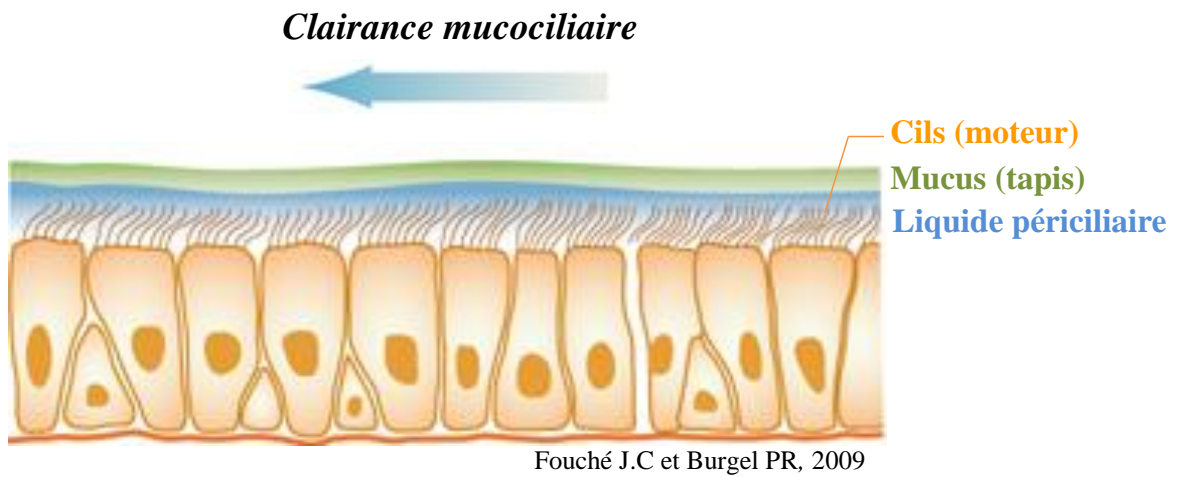
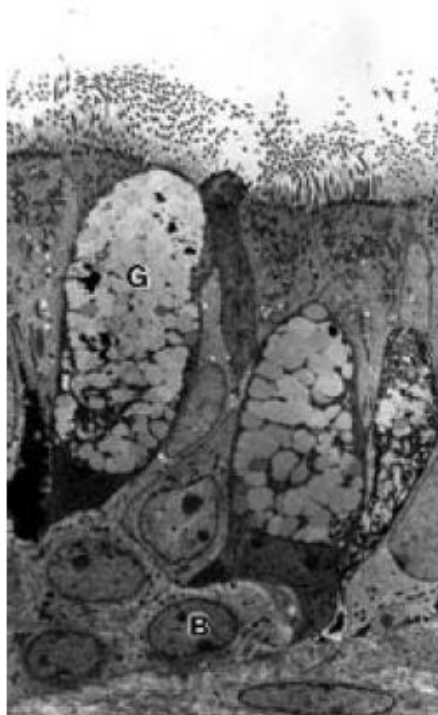


Figure 4: Transport mucociliaire



Jeffery et Li, 1997

Figure 5: Morphologie des cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire en microscopie électronique à transmission.

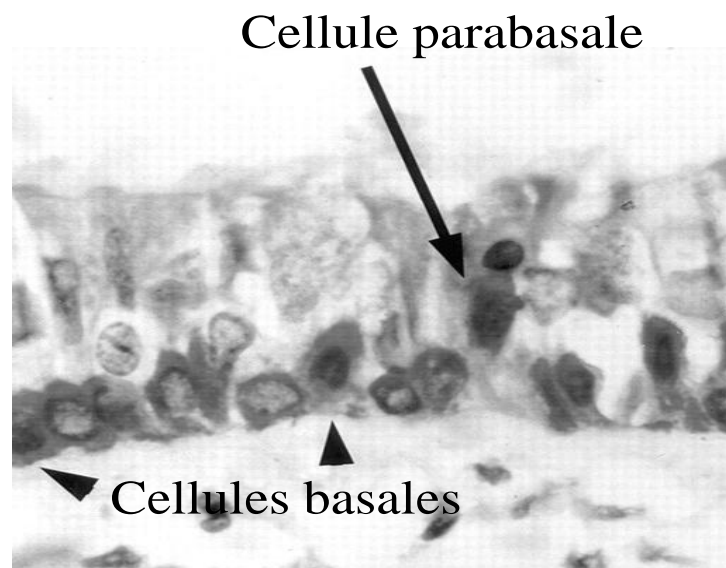
G : cellule sécrétoire, B : cellule basale.

Introduction

cellules ciliées se transdifférencient, migrent, prolifèrent pour enfin se redifférencier en un épithélium bronchiolaire fonctionnel (Park *et al.* 2006). Le principal rôle des cellules ciliées est d'assurer la clairance mucociliaire qui permet d'éliminer les aéro-contaminants et les micro-organismes. Cette fonction est assurée par un couplage efficace entre les cils vibratiles animés d'un mouvement synchrone et par le mucus en contact direct avec le pôle apical des cellules ciliées (**Figure 4**). La clairance mucociliaire peut être altérée par différentes substances toxiques, comme celles contenues dans la fumée de cigarette. Les cellules ciliées sont également impliquées dans les échanges ioniques (Puchelle *et al.* 1992), le transport d'eau (Nadel 1985) et dans la sécrétion de macromolécules (Varsano *et al.* 1987).

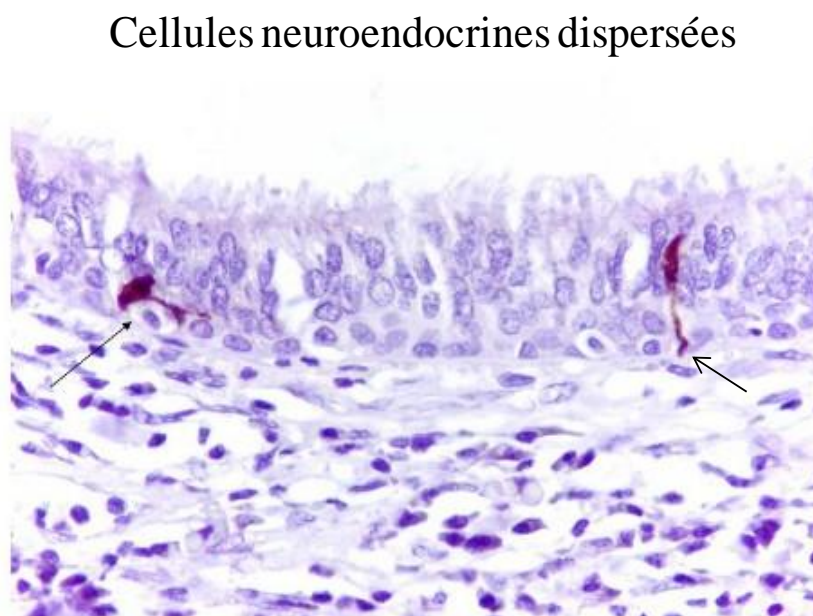
b) Les cellules caliciformes ou sécrétoires

Les cellules caliciformes chez l'homme sont moins abondantes que les cellules ciliées, on retrouve un ratio d'une cellule sécrétoire pour environ cinq cellules ciliées (Breeze et Wheeldon 1977; Wanner *et al.* 1996) soit une densité moyenne estimée entre 6000 et 7000 cellules caliciformes par mm² au niveau de la trachée, un nombre qui diminue tout le long des voies aériennes jusqu'aux bronchioles (Ellefsen et Tos 1972). En microscopie électronique, les cellules caliciformes présentent un pôle apical dilaté, clair et peu dense aux électrons (**Figure 5**). Le noyau des cellules caliciformes a un aspect triangulaire (dont la base est apicale et le sommet basal) et se loge dans la partie inférieure des cellules (tiers inférieur de l'épithélium). Les cellules caliciformes sont remplies de grains de sécrétion riches en mucines qui participent, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses, à la formation du mucus (Verdugo 1990). Celui-ci permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (Jeffery 1983). La régulation de la production et de la sécrétion de mucus est fondamentale pour le bon fonctionnement de l'épuration muco-ciliaire. Les cellules caliciformes sont également capables de produire des protéines à activité anti-bactérienne telles que les IgA sécrétoires (Goodman *et al.* 1981), la peroxydase (Christensen et Hayes 1982). Chez les fumeurs, on peut observer une hyperplasie de cellules caliciformes (Rogers 2003), indiquant un potentiel prolifératif des cellules caliciformes (Ayers et Jeffery 1988).



Boers *et al*, 1998

Figure 6: cellules basales et parabasales de l'épithélium trachéo-bronchique



<http://www.respir.com/images/histologieCellNeuroEndoc1.asp>

Figure 7: Les cellules neuroendocrines de l'épithélium trachéo-bronchique

Les cellules neuroendocrines sont révélées par immunohistochimie de la protéine « chromogranine A » connue pour être exclusivement localisée dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines.

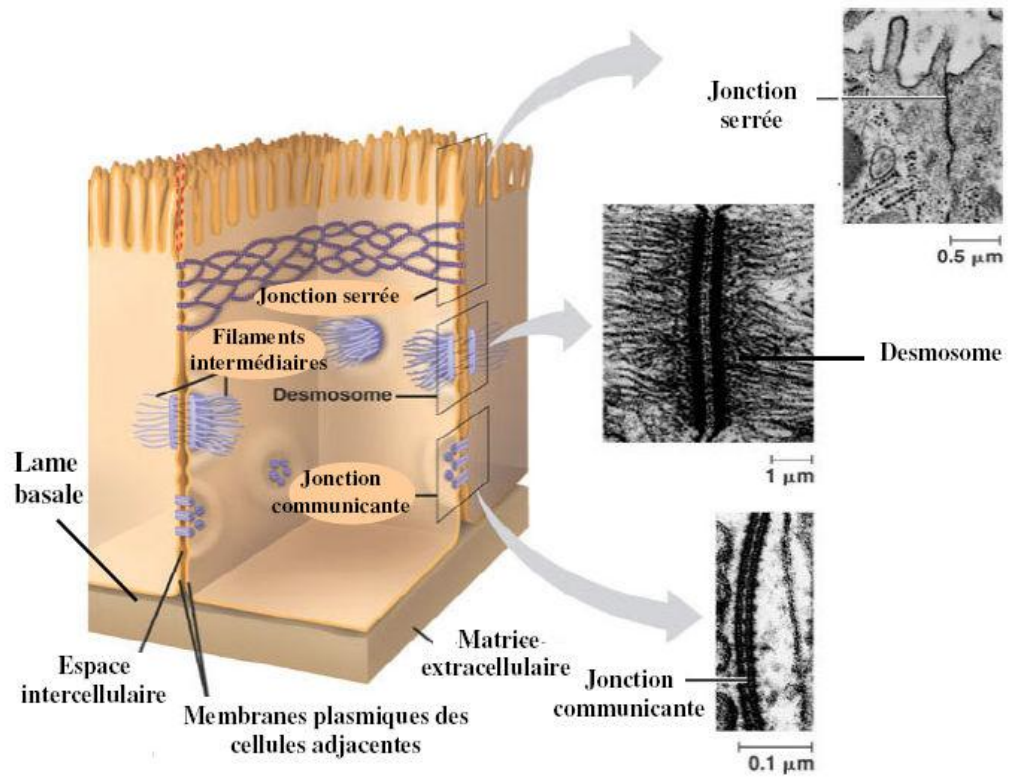
c) Cellules basales

Les cellules basales représentent approximativement 30 % de la population cellulaire de l'épithélium respiratoire humain bronchique (Rock *et al.* 2009). Elles sont localisées dans la partie basale de l'épithélium bronchique, en contact direct avec la lame basale, qu'elles recouvrent à 90 % (Mercer *et al.* 1994) (**Figure 6**). Cependant leur proportion se réduit depuis les voies aériennes proximales jusqu'aux voies aériennes périphériques (Baldwin 1994). Ce sont de petites cellules arrondies ou pyramidales, avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Elles assurent la cohésion de l'épithélium respiratoire bronchique en se liant aux cellules cylindriques ciliées et caliciformes par des jonctions intercellulaires : les desmosomes. Elles sont elles-mêmes solidement ancrées sur la lame basale par la présence d'hémidesmosomes assurant ainsi la stabilité de l'épithélium à la membrane basale (Shebani *et al.* 2005). Les cellules basales sont caractérisées de manière spécifique par la présence de filaments intermédiaires du cytosquelette tels que les cytokératines 5 (Daniely *et al.* 2004), 13 (Dupuit *et al.* 1995), 14 (Nakajima *et al.* 1998; Dupuit *et al.* 2000) et 17 (Nakajima *et al.* 1998) et par la présence du marqueur p63 (Daniely *et al.* 2004). Ces cellules sont généralement considérées comme peu différenciées. Leur capacité à proliférer (Boers *et al.* 1998) et à régénérer l'épithélium bronchique humain *in vivo*, *ex vivo* et *in vitro* font d'elles des cellules progénitrices de l'épithélium respiratoire de surface (Avril-Delplanque *et al.* 2005; Hajj *et al.* 2007).

Une autre population cellulaire dite parabasale ou intermédiaire est retrouvée localisée entre les cellules basales et cylindriques (Boers *et al.* 1998). Elle constitue 7 % de la population totale des cellules de l'épithélium bronchique. Elles sont ancrées à la lame basale sans jamais atteindre la lumière trachéo-bronchique. L'étude en microscopie électronique à transmission indique des similitudes morphologiques avec les cellules basales mais leur noyau se situe en position suprabasale. En microscopie optique, ces cellules ne présentent aucune caractéristique de cellules ciliées ni de cellules caliciformes (Breeze et Wheeldon 1977, 1977; Mercer *et al.* 1994). La fonctionnalité de ces cellules n'est pas encore bien définie. Cependant, d'après les travaux de Donnelly, elles contribueraient au renouvellement des cellules cylindriques dans la mesure où elles seraient des cellules basales en cours de différenciation (Donnelly *et al.* 1982) (**Figure 6**).

d) Les cellules neuro-endocrines

Les cellules neuro-endocrines sont retrouvées tout le long de l'épithélium des voies aériennes, leur nombre est maximal lors de la période néonatale puis régresse à 1 cellule pour 2500 cellules épithéliales (Gosney *et al.* 1988). De forme pyramidale, les cellules neuro-endocrines sont en contact avec la lame basale et présentent un noyau en position apicale et des granules de sécrétion au pôle basal ainsi que des prolongements cytoplasmiques atteignant la lumière des voies respiratoires (Weichselbaum *et al.* 2005) (**Figure 7**). Ces cellules sont observées isolées ou regroupées sous forme d'îlots innervés, appelées corps neuro-épithéliaux (NEB), localisés principalement au niveau des bifurcations des voies aériennes. Dans l'appareil respiratoire, les cellules neuroendocrines sont majoritairement des cellules sécrétrices de sérotonine ainsi que d'hormones peptidiques (calcitonine, leu-enképhaline, bombésine) (Cutz *et al.* 1981). Différentes fonctions sont attribuées aux cellules neuroendocrines : 1) rôle dans la croissance et le développement du poumon, une fonction assurée partiellement par la bombésine (neuropeptide également appelé gastrin-releasing peptide GRP) et la calcitonine (Sunday *et al.* 1990), 2) contrôle de la tonicité du muscle bronchique grâce à la sécrétion de la sérotonine et de la bombésine (Wharton *et al.* 1978; Polak *et al.* 1993) et 3) Rôle paracrine dans la prolifération cellulaire de l'épithélium respiratoire : les cellules neuroendocrines constitueraient une niche de cellules souches (NEB) indispensables dans les processus de réparation de l'épithélium respiratoire (Stevens *et al.* 1997).



Thèse delphine GRAS, 2006

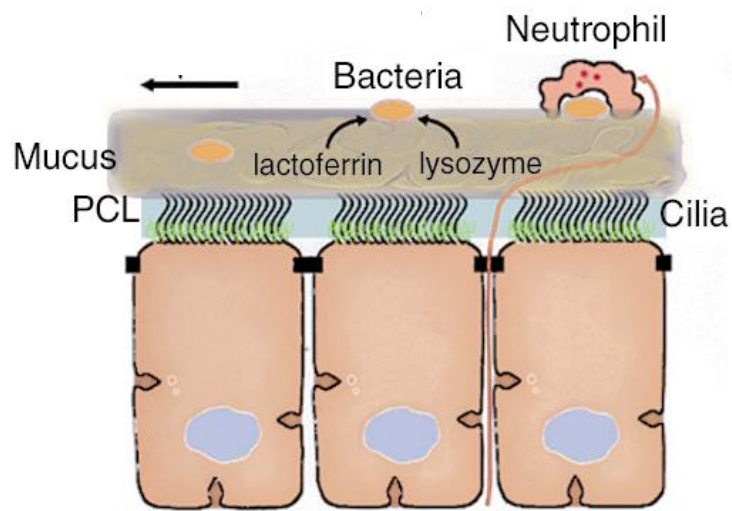
Figure 8: Organisation des complexes jonctionnels des cellules épithéliales

II- Fonctions de l'épithélium respiratoire

En contact permanent avec l'environnement extérieur et continuellement exposé aux agents pathogènes, l'épithélium respiratoire protège notre organisme en constituant une véritable barrière de défense. Cette propriété est assurée physiquement par les cellules épithéliales qui constituent un ensemble très cohésif grâce à de nombreux systèmes de jonctions intercellulaires. Les aérocontaminants inhalés sont également éliminés d'une part à l'aide du processus de clairance mucociliaire qui combine la sécrétion du mucus et les battements ciliaires, et d'autre part par la sécrétion de molécules de défenses antimicrobiennes à large spectre associée à une réponse immunitaire adaptée.

II-1 Intégrité de la barrière épithéliale

L'intégrité et l'étanchéité de l'épithélium est assurée par plusieurs complexes jonctionnels : 1) les jonctions serrées, qui déterminent une barrière physiologique entre le compartiment extérieur et intérieur de l'organisme en limitant le passage de molécules (Gumbiner, 1993) et elles établissent également la polarité de la cellule en déterminant les régions basolatérales et apicales des cellules (Tsukita *et al.* 2001). 2) Les jonctions adhérentes (ou intermédiaires), qui forment une sorte de ceinture et sont impliquées dans l'adhérence cellulaire, 3) les desmosomes, qui assurent la cohésion de l'épithélium (Evans et Plopper 1988; Leube et Rustad 1991; Brézillon *et al.* 1997) et contribuent via l'ancrage des filaments intermédiaires au potentiel contractile des cellules épithéliales (Franke *et al.* 1989; Yamada et Geiger 1997; Ivanov *et al.* 2001). 4) Les jonctions communicantes, qui permettent l'échange de petites molécules (tels le Ca^{2+} , l'AMPc etc..) entre deux cellules adjacentes (Saez *et al.* 1986; Kumar et Gilula 1996) et 5) les hémidesmosomes, qui lient les cellules basales à la lame basale et forment des structures dynamiques, interviennent au cours des processus de remodelage tissulaire par un assemblage et désassemblage de l'édifice moléculaire (intégrine $\alpha\beta4$ /laminine 5 et collagène XVII/desmoplakine) permettant ainsi de maintenir l'intégrité du tissu épithélial (Tsuruta *et al.* 2003) (**Figure 8**).



Knowles et Boucher, 2002

Figure 9: Schéma de défense immunitaire de l'appareil respiratoire

Une infection bactérienne peut être éliminée par clairance mucociliaire ou faire intervenir des molécules antibactériennes comme la lactoferrine ou des lysozymes. Des neutrophiles peuvent également être attirés vers le lieu de l'infection et phagocyter les bactéries.

PCL: liquide périciliaire.

II-2 Clairance mucociliaire

La clairance mucociliaire est le premier mécanisme de défense inné des voies aériennes (Knowles et Boucher 2002). L'épithélium respiratoire est composé de deux principaux types cellulaires : les cellules ciliées et les cellules sécrétoires qui sont les acteurs primordiaux du processus de clairance mucociliaire. Les voies aériennes sont recouvertes de mucus (sécrété par les cellules de Clara, les cellules glandulaires ou les cellules caliciformes) qui a pour rôle de piéger les débris cellulaires ou les pathogènes inhalés et ensuite de les évacuer hors des voies aériennes à l'aide du battement coordonné et orienté des cils. La clairance mucociliaire agit comme un vaste tapis roulant. Les particules xénobiotiques et autres pathogènes sont piégés et englobés dans le mucus (Rose *et al.* 2001). Les battements ciliaires coordonnés poussent le mucus et les agents étrangers piégés des voies aériennes distales vers le carrefour aéro-pharyngé où ils sont éliminés par déglutition ou par la toux (Zahm *et al.* 1989). L'efficacité de l'épuration mucociliaire est dépendante d'un équilibre idéal entre un système coordonné de transport d'eau et d'ions, la quantité et les qualités viscoélastiques du mucus et du liquide périciliaire, le nombre de cellules ciliées, la fréquence des battements et le mouvement coordonné et orienté des cils (Puchelle *et al.* 1992; Randell et Boucher 2006).

II-3 Défense immunitaire de l'appareil respiratoire

Afin d'éliminer les nombreux pathogènes amenés au cours de la respiration, deux types de réponses immunitaires participent à la protection du poumon : les défenses immunitaires innées et acquises. La période de clairance des pathogènes par le transport mucociliaire peut prendre quelques heures. Dans ces conditions, les bactéries vont proliférer à la surface des voies aériennes. Cela implique que ce mécanisme seul n'est pas assez efficace pour protéger l'épithélium de toute infection (Knowles et Boucher 2002). C'est pourquoi l'immunité innée se met en place en tant que première ligne de défense, en sécrétant des substances anti-microbiennes endogènes à large spectre dans le liquide de surface (Kaliner 1991) et supprimant ainsi la croissance bactérienne durant cette période. Les principales molécules anti-bactériennes sécrétées sont la transferrine (lactoferrine), le lysozyme et le SLPI (secretory leukoproteinase inhibitor), ainsi que des défensines et le LL-37 (cathélicidine humaine) en quantités moins importantes (Hiemstra 2001; Schutte et McCray 2002) (**Figure 9**).

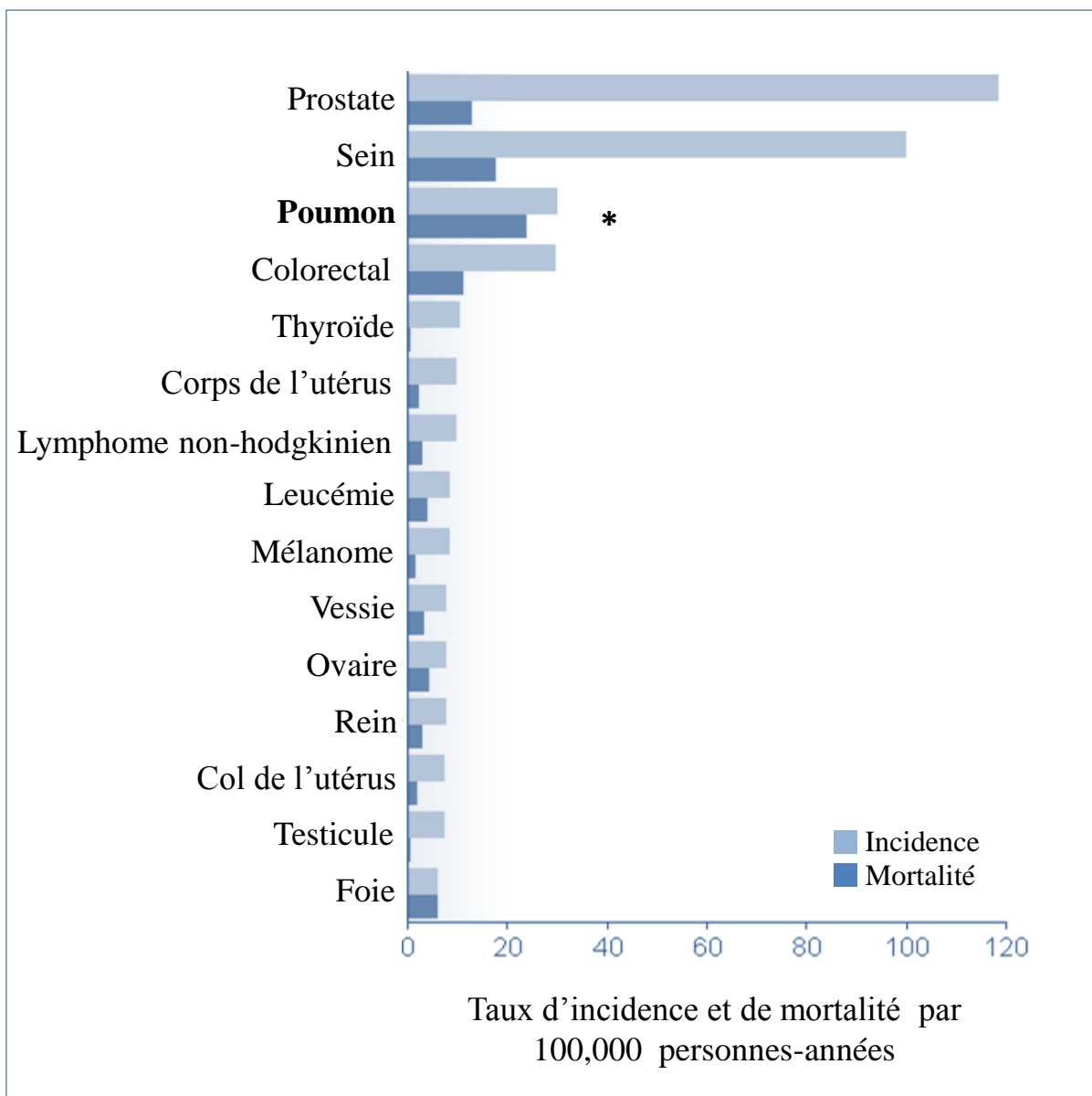


Figure 10: Taux d'incidence et de mortalité des cancers les plus fréquemment diagnostiqués en France dans les deux sexes.

Le cancer du poumon est le 3^{ème} cancer le plus fréquent, cependant il représente la première cause de mortalité par cancer (adapté d'après GLOBACAN 2008).

Introduction

Dans le cas où l'élimination des pathogènes n'a pas été efficace au cours de la réponse innée une réponse adaptative se met en place. Elle fait intervenir des facteurs chimioattractants tels que les interleukines comme l'IL-8 et des cellules immunitaires telles que les macrophages, les cellules dendritiques, les polynucléaires neutrophiles (PNN) ou les cellules lymphocytaires (T et B) capables de phagocyter les agents infectieux et de les éliminer.

B- Les cancers broncho-pulmonaires

I- Epidémiologie

Le cancer est un véritable problème de santé publique dans le monde, avec une estimation de 12,7 millions de nouveaux cas et 7,6 millions de décès en 2008. Dans le monde, le cancer du sein chez les femmes et le cancer du poumon chez les hommes sont les cancers les plus fréquemment diagnostiqués et la cause majeure de mortalité pour les deux sexes (Jemal *et al.* 2011).

En France, le cancer du poumon est également considéré comme un problème majeur de santé publique, il arrive en 3^{ème} position parmi les cancers les plus fréquemment diagnostiqués en 2008 mais reste la première cause de décès par cancer (**Figure 10**) (GLOBACAN 2008). Malheureusement cette tendance n'a pas cessé d'augmenter depuis 2008, et les données d'incidence et de mortalité de l'Institut de Veille Sanitaire pour 2011 montrent que chez l'homme, même si le cancer de la prostate est le plus fréquent avec 71 000 nouveaux cas devant le cancer du poumon (27 500 cas), ce dernier entraîne environ 21 000 décès contre 8 700 pour le cancer de la prostate. Chez la femme, le cancer du sein reste toujours le plus fréquent avec 53 000 nouveaux cas, et le plus mortel malgré une baisse de la mortalité ces 15 dernières années, avec 11 500 décès en 2011. Chez la femme, le cancer du poumon n'arrive qu'en 3^{ème} position après le cancer colorectal, avec 12 000 cas, lequel devrait être la cause de 8 100 décès. Le taux de survie globale à 5 ans pour le cancer du poumon est fortement corrélé au stade d'avancement de la tumeur, il varie de 70% pour les bas grades jusqu'à 5% pour les stades métastatiques.

II- Etiologie

Le développement du cancer en général et des cancers broncho-pulmonaires en particulier est le résultat de l'action de nombreux facteurs de risque comme : l'hérédité, le choix de vie et l'exposition à des substances carcinogènes présentes dans l'environnement. Ainsi le développement d'un cancer bronchique peut être favorisé par des caractéristiques propres à l'individu (âge, facteurs génétiques, antécédents d'affections respiratoires) ou par des types de comportements et d'habitudes de vie. En général, plus l'intensité et la durée de l'exposition à un facteur de risque sont grandes, plus la probabilité de développer un cancer est élevée.

Dès 1950, Doll R et Hill AB ont émis l'hypothèse que le tabac serait la cause du développement du cancer du poumon (DOLL et HILL 1950). Un soupçon confirmé des années plus tard, par des études épidémiologiques et biologiques montrant que le tabac, sous toutes ses formes (cigarette, cigare et pipe, narguilé, bidi) serait responsable de 9 cancers du poumon sur 10. Le cancer du poumon est donc l'un des rares cancers pour lequel le principal facteur de risque est parfaitement identifié. Lors de sa combustion, le tabac dégage plus de 4000 substances chimiques parmi lesquelles 400 sont des produits toxiques et plus de 40 sont des cancérigènes susceptibles d'être impliqués dans le développement des cancers chez les fumeurs (Kiyohara et Ohno 2010) (INCa). Un fumeur a de 20 à 40 fois plus de probabilité de développer un cancer du poumon en comparaison à une personne n'ayant jamais fumé. Il a également été montré que les risques de développer un cancer bronchique diminuent après l'arrêt du tabac (Ozlü et Bülbül 2005). Enfin, les patients ayant arrêté de fumer au moment du diagnostic répondent plus favorablement aux différents traitements (Cataldo *et al.* 2010). Si le tabagisme actif est responsable de 90% des cancers pulmonaires, le tabagisme passif est également dangereux et serait responsable d'une augmentation de 15% à 25% du risque de développer un cancer du poumon (Smith et Beh 2011).

En plus du tabac, de nombreuses substances de nature chimique, physique et biologique sont actuellement recensés comme étant cancérigènes tels l'amiante, les poussières de cobalt, le nickel, l'arsenic, le radon, le cadmium, et. (Brüske-Hohlfeld 2009). Ces substances sont capables de favoriser la survenue plus précoce de certains cancers ou encore d'augmenter leur fréquence d'apparition.

Introduction

L'Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) estime à 15% les cancers du poumon d'origine professionnelle.

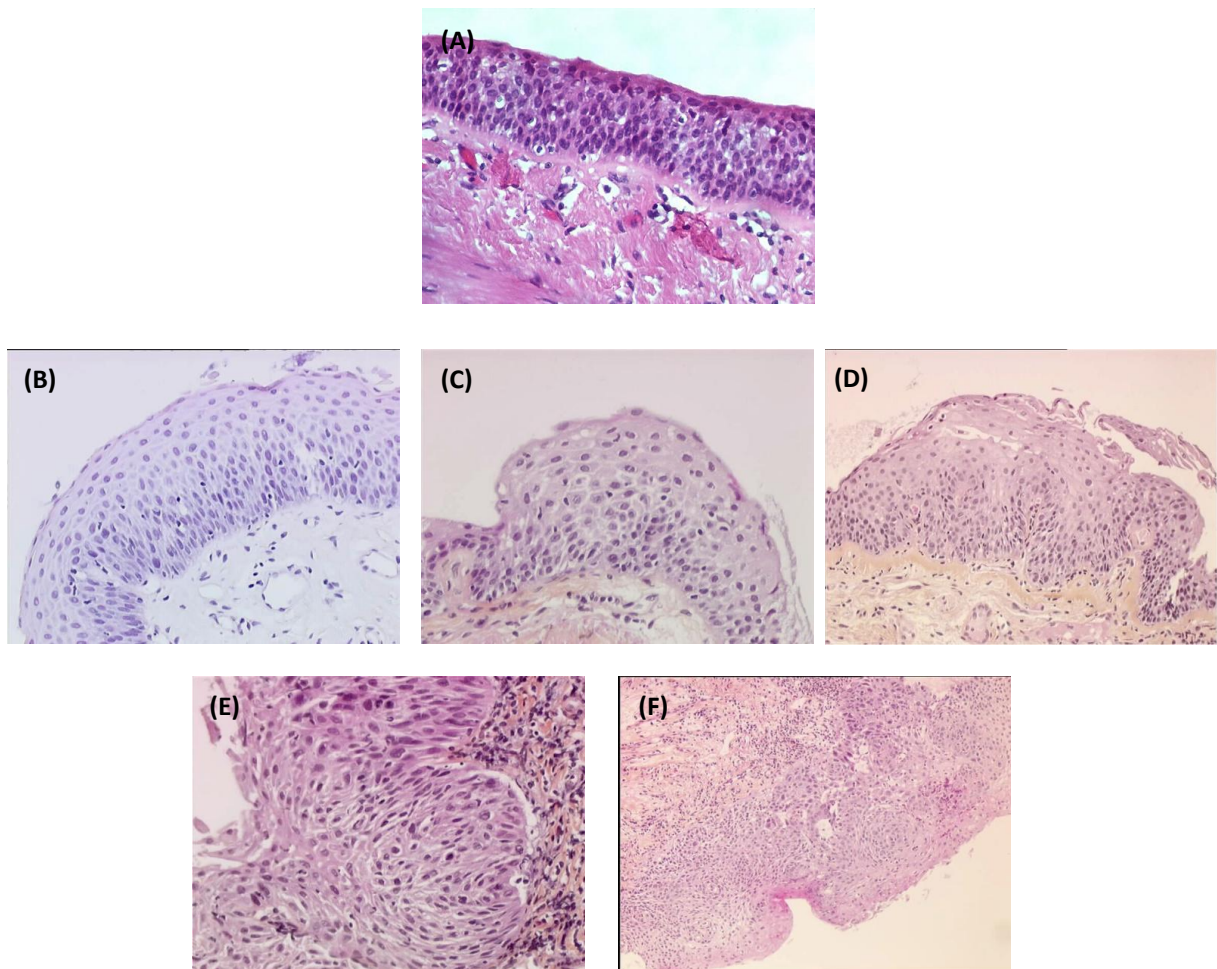
Les caractéristiques génétiques des individus peuvent également influencer, en association avec d'autres facteurs, le développement des cancers broncho-pulmonaires. De nombreuses altérations génétiques sont retrouvées dans les différents types de cancers pulmonaires, par exemple des mutations somatiques au niveau du récepteur EGFR, des amplifications des oncogènes tels k-Ras et B-Raf (Shigematsu et Gazdar 2006; Pao et Girard 2011), et des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs tels p53 et Rb (Kitamura *et al.* 2009; Mogi et Kuwano 2011; Olivier et Taniere 2011). Des polymorphismes nucléotidiques ainsi que des anomalies chromosomiques peuvent également être impliqués dans le développement des cancers broncho-pulmonaires.

III- Histologie des lésions précancéreuses bronchiques

Chez le fumeur et les sujets à haut risque de cancer bronchique, les cancers invasifs sont précédés d'une série de modifications de l'épithélium des bronches en réponse à une irritation chronique combinée à l'inhalation de carcinogènes. Ces modifications apparaissent en foyer avec une transition abrupte de l'épithélium normal à un épithélium pathologique.

Ces modifications pré-néoplasiques consistent au plan histologique, en l'apparition d'une hyperplasie des cellules basales, d'une métaplasie épidermoïde malpighienne et de dysplasies qualifiées de "légères", "modérées" et "sévères" puis de carcinome *in situ*, en fonction des anomalies cytonucléaires et du degré de désorganisation de l'épithélium. Ces étapes sont caractérisées par des altérations morphologiques de l'épithélium de surface de plus en plus sévères. Une filiation longitudinale entre chacune de ces altérations, bien que probable, n'a jamais été démontrée formellement par une étude longitudinale.

Hyperplasie des cellules basales : Le revêtement épithélial conserve son caractère cylindrique bien différencié, mucosécrétant et cilié. Les cellules basales se disposent en plusieurs couches régulières.



<http://www.chu-rouen.fr/pneumo/aspend.htm>

Figure 11: Histologie des lésions pré-néoplasiques bronchiques

A : métaplasie épidermoïde malpighienne, B : dysplasie légère, C : dysplasie modérée, D : dysplasie sévère, E : carcinome *in situ* ., F : carcinome micro-invasif

Introduction

Métaplasie épidermoïde malpighienne : Les éléments épithéliaux ébauchent une maturation de type épidermoïde prenant un aspect polyédrique. Au niveau des couches superficielles les noyaux sont parallèles à la lame basale. L'épithélium présente une hauteur augmentée (**Figure 11-A**).

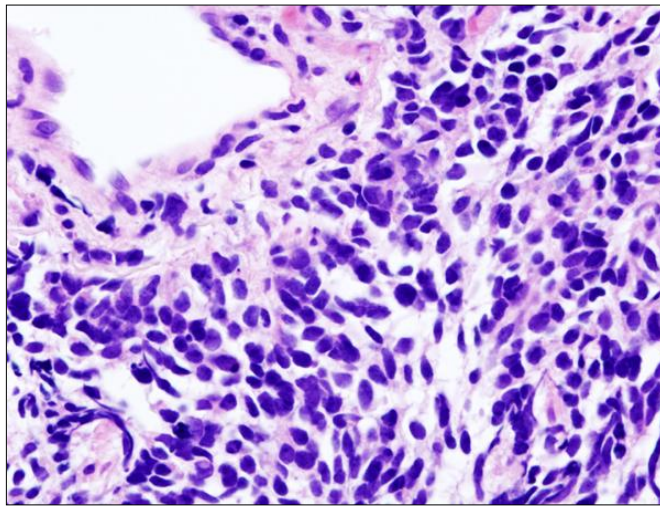
Dysplasie légère : Le revêtement épithélial est en métaplasie malpighienne, bien différencié, avec une maturation régulière avec un pôle apical en dôme. Quelques noyaux sont anormalement volumineux dans les couches les plus profondes. Il existe une discrète désorganisation architecturale. Absence de mitoses (**Figure 11-B**).

Dysplasie modérée : L'épithélium métaplasique conserve une maturation régulière avec quelques noyaux anormalement denses et volumineux au niveau des couches superficielles, associée ou non à une hyperkératose. L'épaisseur de l'épithélium est toujours augmentée. Les mitoses sont observées au premier tiers de l'épithélium (**Figure 11-C**).

Dysplasie sévère : L'épithélium de revêtement présente un pléomorphisme cellulaire marqué et la chromatine est grossière. L'architecture est irrégulière sans maturation cellulaire avec des anomalies nucléocytoplasmiques marquées sur toute la hauteur de la muqueuse. Les noyaux sont de taille irrégulière, hyperchromatiques et les mitoses occupent la totalité de l'épithélium dont l'épaisseur est importante. (**Figure 11-D**).

Carcinome in-situ : Le revêtement épithélial est le siège d'une prolifération cellulaire intra-épithéliale avec des désorganisations de l'architecture. Les éléments tumoraux présentent des atypies nucléocytoplasmiques avec de nombreuses mitoses. La membrane basale est respectée (**Figure 11-E**).

Carcinome micro-invasif : Prolifération épithéliale de cellules atypiques avec des anomalies nucléocytoplasmiques marquées. Ces cellules forment des massifs et la lame basale paraît rompue. Dans le chorion, un infiltrat inflammatoire constituant un stroma tumoral et une hypervascularisation capillaire sont observés (**Figure 11-F**).



http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Lung_small_cell_carcinoma_%281%29_by_core_needle_biopsy.jpg

Figure 12: Coupe histologique d'une tumeur bronchique à petite cellule

IV- Classification des cancers broncho-pulmonaires

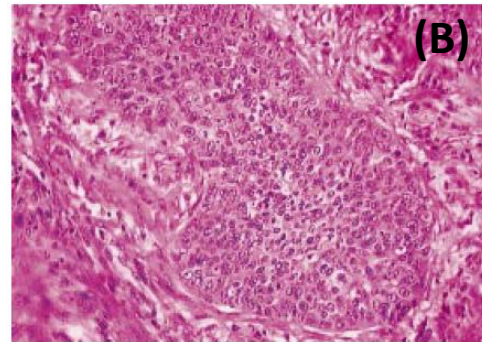
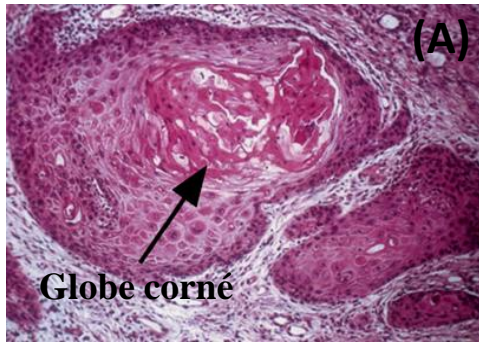
Les cancers du poumon présentent une grande disparité en termes de morphologie, de comportement biologique, de temps de doublement, de dissémination métastatique, de réponse aux traitements ou de taux de survie (Singh *et al.* 2011). Différents modes de classification ont été proposés afin de 1) distinguer les différents types de cancers pulmonaires rencontrés et 2) de délivrer un diagnostic complet aux patients pour les inclure dans des protocoles thérapeutiques. Les classifications les plus fréquemment utilisées sont celle de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la classification histopathologique TNM.

IV-1 Classification anatomopathologique des cancers broncho-pulmonaires selon l'OMS (2004)

La classification anatomopathologique de l'OMS des tumeurs broncho-pulmonaires est basée sur des critères morphologiques en microscopie optique, qui peuvent être complétés par des études d'immunohistochimie. Elle permet essentiellement d'orienter les stratégies thérapeutiques. Elle classe les cancers broncho-pulmonaires en deux principales familles: les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC) et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC).

IV-1.1 Les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC)

Les CBPC représentent 20% des cancers bronchiques. Ce sont des tumeurs dites neuroendocrines, se développant à partir des cellules neuroendocrines de l'épithélium de surface et exprimant ainsi les marqueurs de différenciation neuroendocrine: la synaptophysine, l'énolase neurone-spécifique (NSE), la chromogranine A et les molécules d'adhérence N-CAM (neural cellular adhesion molecule). Elles sont constituées de petites cellules avec un rapport nucléocytoplasmique très élevé (**Figure 12**). La chromatine apparaît finement granuleuse dissimulant les nucléoles. Ce sont des tumeurs de haut grade de malignité avec un index mitotique très élevée. 95% des CBCP sont liés au tabac, ils sont en général diagnostiqués à un stade avancé du fait de la rapidité d'évolution. Ces cancers sont le plus souvent traités par chimiothérapie et leur pronostic reste très sombre. La survie de ces patients n'excède pas 2,5 ans.



Groussard O et Daste G, 2001

Figure 13: Exemple de carcinomes épidermoïdes malpighiens bien différenciés (A) ou peu différenciés (B). Coloration hématoxyline-éosine.

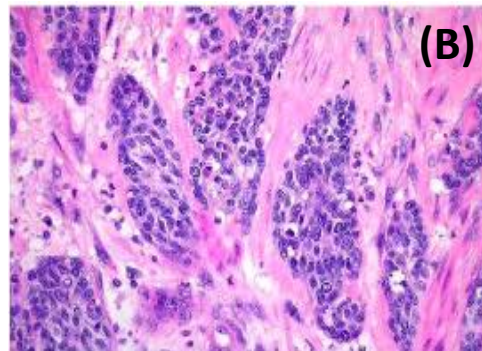
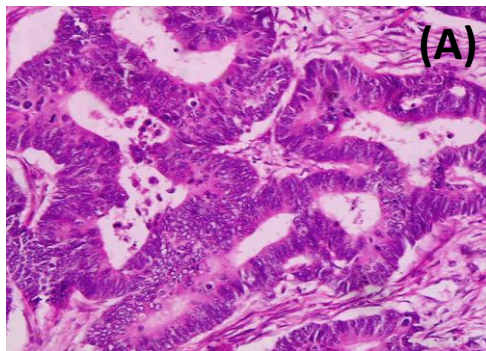


Figure 14: Exemple d'adénocarcinomes bien différenciés (A) ou peu différenciés (B). Coloration hématoxyline-éosine.

IV-1.2 Cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC)

Ce sont les cancers les plus fréquents et ils représentent 80% de l'ensemble des cancers bronchiques. La famille des cancers bronchiques non à petites cellules regroupe 3 sous-types : les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes à grandes cellules, qui sont classés en fonction de leurs différences histologiques et des origines cellulaires à partir desquelles ces cancers se développent.

a) Carcinomes épidermoïdes ou malpighiens

Ils se développent habituellement dans les grosses bronches situées dans la partie proximale du poumon et prennent naissance à partir de lésions métaplasiques. Ce sont des tumeurs malignes dont la synthèse de kératine par les cellules tumorales est une principale caractéristique. La différenciation malpighienne se manifeste également par la présence de grandes cellules quadrangulaires à limites nettes étroitement unies par des ponts d'union. En fonction du degré de kératinisation, la formation de globes cornés et de la présence ou non de ponts d'union, les carcinomes épidermoïdes malpighiens sont qualifiés de bien (>50%), moyennement (50% à 20%) ou peu différenciés (<20%) (**Figure 13**). Ce type histologique représente approximativement 35% des carcinomes bronchiques et est fortement lié au tabac.

b) Adénocarcinomes

L'incidence des adénocarcinomes n'a pas cessé d'augmenter et devient actuellement la forme prédominante du cancer du poumon. Ils représentent actuellement 40% des cancers bronchiques. Il s'agit de tumeurs périphériques survenant sur les bronches périphériques et les alvéoles, mais ils peuvent également se développer dans les grosses bronches à partir de l'épithélium de surface ou des glandes sous-muqueuses. Les adénocarcinomes sont également qualifiés de bien (>50%), moyennement (50% à 20%) et peu différencié (<20%) en fonction de la présence ou non de structures glandulaires (**Figure 14**). Il existe actuellement 5 sous-types classés selon leur architecture en forme acineuse, papillaire, bronchiolo-alvéolaire, solide ou mixte. Les adénocarcinomes sont généralement composés de cellules de grandes tailles, cubiques, cylindriques ou polygonales. Les noyaux sont volumineux, vésiculeux, souvent hypernucléolés et contiennent parfois une inclusion. Ils sont caractérisés par la production de mucus qui varie d'un cas à l'autre, et dans une même tumeur, d'un territoire à

Introduction

l'autre. Elle peut se présenter sous forme de vastes plages de mucus, de matériel muqueux dans les lumières glandulaires ou de vacuoles intracytoplasmiques.

c) Les carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules sont des tumeurs malignes de diagnostic d'exclusion. Leur aspect diffère de celui du cancer bronchique à petites cellules et des carcinomes à différenciation épidermoïde ou glandulaire, et se distingue des autres tumeurs par leur caractère indifférencié. Ce type de carcinome se développe n'importe où dans le poumon (au niveau central ou périphérique, pouvant envahir la plèvre ou les structures adjacentes) et représentent environ 5% à 10% des cancers bronchiques. 90% des carcinomes à grandes cellules sont liés au tabac. L'aspect histologique est varié rappelant parfois les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes ou les carcinomes neuroendocrines, sans en posséder les critères morphologiques formels. Les cellules sont généralement de grande taille possédant des noyaux volumineux, vésiculeux, pourvus d'un nucléole. Il existe plusieurs variantes des carcinomes à grandes cellules, parmi elles: les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules, les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules composites, les carcinomes basaloïdes, les carcinomes de type lympho-épithélial, les carcinomes à cellules claires et les carcinomes à grandes cellules et rhabdoïdes.

IV-2 Classification TNM des cancers broncho-pulmonaires selon l'IUCC (2009)

La classification **TNM** (pour **T**umor **N**ode **M**etastasis) est un système international, proposé pour la première fois par le chirurgien français Pierre Denoix entre 1943 et 1952, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique. Plusieurs révisions ont été publiées, la dernière étant la septième édition en 2009. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (extension local, **T**), dans les ganglions lymphatiques adjacents (**N**) et à distance pour d'éventuelles métastases (**M**). Chaque lettre est affectée d'un coefficient allant de 0 à 4. Les caractéristiques de cette classification sont répertoriées dans les tableaux suivants.

Introduction

Le descripteur T : Tumeur primitive

TX	Tumeur dont la présence : <ul style="list-style-type: none"> • ne peut être évaluée • ou est démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage bronchique sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie
T0	Pas d'évidence de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion plus proximale que la bronchique lobaire (c-à-d pas la bronche souche)
T1a	Tumeur de 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension
T1b	Tumeur de plus de 2 cm sans dépasser 3 cm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes : <ul style="list-style-type: none"> • atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène. • invasion de la plèvre viscérale. • présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre l'ensemble du poumon.
T2a	Tumeur de plus de 3 cm sans dépasser 5 cm dans sa plus grande dimension
T2b	Tumeur de plus de 5 cm sans dépasser 7 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur de plus de 7 cm ; <ul style="list-style-type: none"> • ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris la tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale, pleural ou pariétal ou le péricarde ; • ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; • ou tumeur associée à une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive du poumon entier ; • ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe
T4	Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, œsophage, corps vertébral, carène; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint

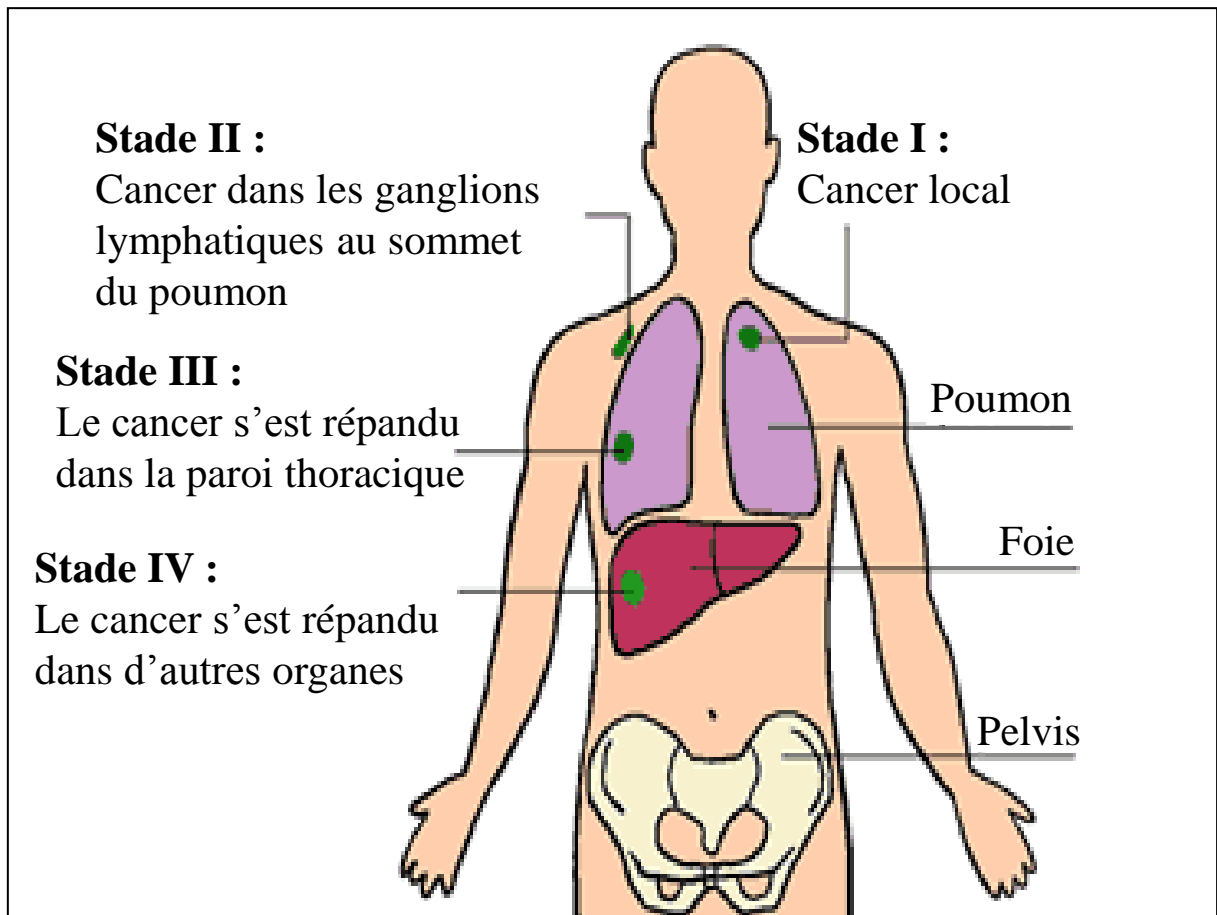


Figure 15: Exemple d'atteinte et du développement du cancer du poumon selon le stade TNM

Introduction

Le descripteur N : Ganglions lymphatiques régionaux

NX	Les ganglions ne peuvent pas être évalués
N0	Pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale
N1	Métastase dans les ganglions lymphatiques intrapulmonaires, péribronchiques et/ou hilaires ipsilatéraux, y compris par envahissement direct
N2	Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux ipsilatéraux et/ou sous-carinaux
N3	Métastase dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sous-claviculaires ipsilatéraux ou controlatéraux

Le descripteur M : Métastase à distance

M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastases
M1a	Nodule(s) tumoral distinct dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
M1b	Métastases à distance

Les cancers bronchiques métastasent généralement vers le cerveau, les os, le foie, les glandes surrénales et le poumon. A chaque cancer un score est attribué, il se compose de trois lettres et de 3 chiffres. A chaque score TNM correspond un degré d'évolution du cancer (**tableau 1**) en effet, la progression tumorale est définie en fonction de stades allant de I à IV suivant la gravité du cancer. Le stade I étant utilisé pour définir les cancers les moins invasifs sans envahissement ganglionnaire et le stade IV pour les cancers les plus agressifs avec présence de métastases (**Figure 15**). Cet établissement de stades constitue donc un préalable indispensable à la prise en charge d'un cancer bronchique primitif.

Introduction

Stades	Statut TNM		
Cancer occulte	TX	N0	M0
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1a, b	N0	M0
Stade IB	T2a	N0	M0
Stage IIA	T1a, b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stade IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T1a,b; T2a,b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stade IIIB	T4	N2	M0
	Tout T	N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 1 : Classification des tumeurs broncho-pulmonaires par stades

V- La progression tumorale

La progression tumorale est un long processus qui implique une succession d'évènements complexes. Hanahan et Weinberg décrivent ce processus comme comprenant six étapes clés acquises au cours du développement tumorale dans un ordre qui peut être variable : indépendance vis- à-vis des signaux de croissance, résistance aux signaux anti-prolifératifs, résistance à l'apoptose, induction de l'angiogénèse, acquisition d'un potentiel répliatif illimité et invasion/métastase tumorale (Hanahan et Weinberg 2011).

En premier lieu, Les cellules épithéliales respiratoires normales subissent des altérations génétiques successives aboutissant à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces cellules ainsi transformées prolifèrent de façon anarchique et forment une tumeur primaire, appelée carcinome *in situ*, qui reste confinée au sein de la couche épithéliale. Lors du processus d'invasion tumorale, certaines cellules tumorales acquièrent la capacité de franchir la membrane basale et d'envahir le tissu conjonctif (le stroma) sous-jacent à l'épithélium. L'acquisition de propriétés migratoires et invasives par les cellules épithéliales tumorales peut ainsi aboutir à la formation d'un carcinome invasif. Ces modifications sont caractéristiques d'un phénomène appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Parmi ces nombreuses modifications, on observe notamment une

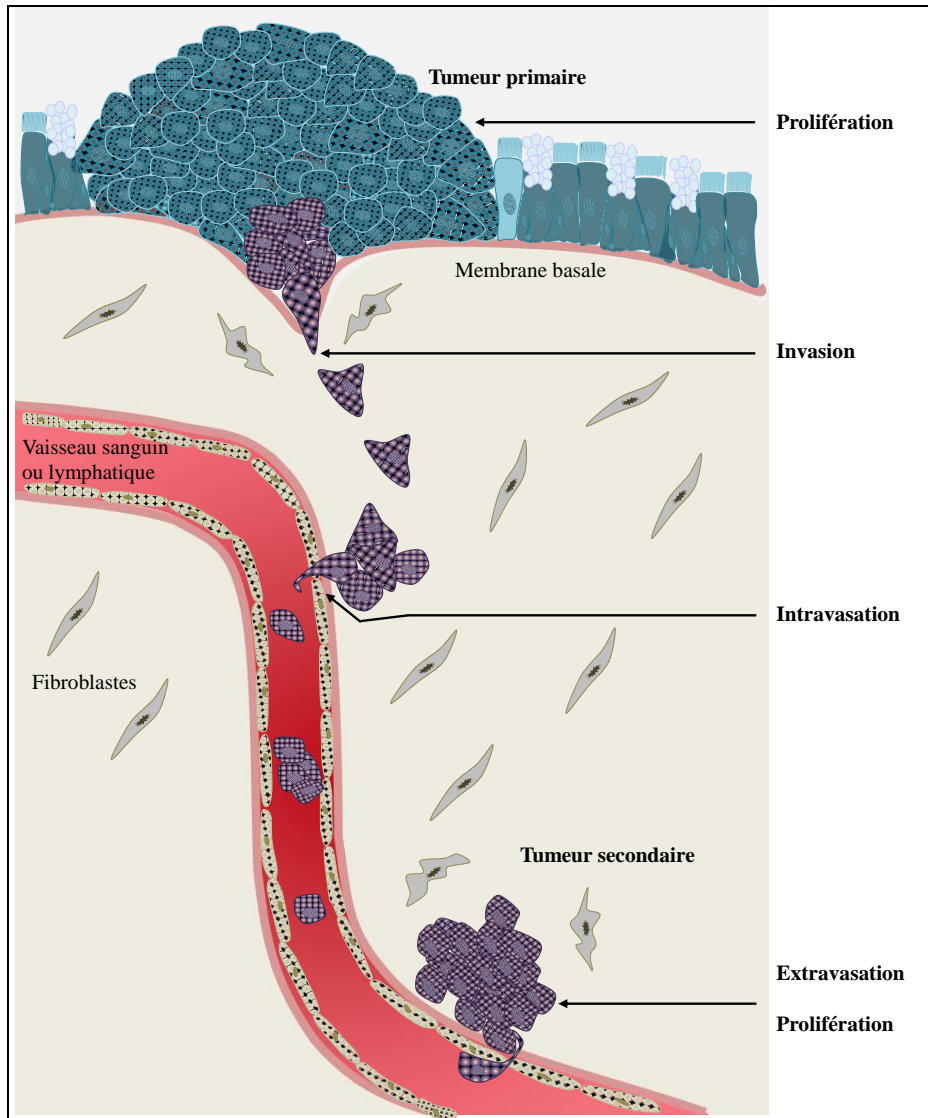


Figure 16: Schéma des étapes de la progression tumorale

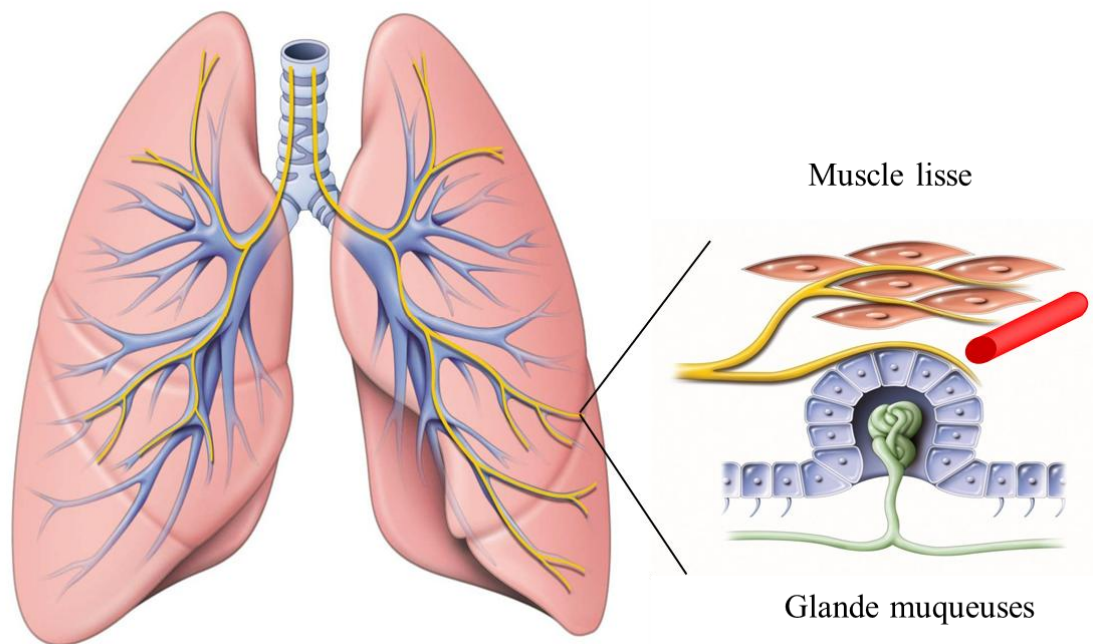
Introduction

réorganisation ou une disparition des complexes d'adhérence intercellulaire (jonctions serrées, jonctions adhérentes, desmosomes) et la capacité à dégrader et remodeler la matrice extracellulaire. Certaines de ces cellules tumorales invasives peuvent atteindre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques présents au sein de la tumeur et ainsi former des métastases à distance. Lors de cette étape, les cellules tumorales infiltrent les vaisseaux par intravasation pour être transporté vers d'autres organes. Une grande majorité de ces cellules circulantes est éliminée par le système immunitaire. Les autres, lorsqu'elles atteignent des vaisseaux de petite taille, s'arrêtent, traversent l'endothélium vasculaire (extravasation) et envahissent l'organe cible. A ce stade, la cellule cancéreuse peut alors être détruite par le système immunitaire ou rester « silencieuse » pendant de nombreuses années. A un moment donné, les phénomènes de prolifération deviennent plus importants que les phénomènes d'apoptose. La tumeur se développe en taille, les métastases sont décelables au niveau clinique et un nouveau cycle permettant la formation des métastases vers d'autres organes peut encore recommencer **(Figure 16)**

La formation de nouveaux vaisseaux, ou angiogenèse, est également une étape importante dans la progression tumorale. En effet, l'apport de nutriments, de l'oxygène ainsi que l'élimination des déchets sont essentiels pour le développement des tumeurs. De plus, la vascularisation des tumeurs permet le passage dans la circulation sanguine ou lymphatique et le transport passif des cellules tumorales. L'angiogenèse est donc un élément essentiel pour la formation de métastases (Zetter 1998).

Au regard des nombreuses étapes de ce processus, la formation de métastase répond à la loi du tout ou rien. En effet, la cellule unique, se détachant de la tumeur primaire, doit survivre à toutes les étapes du processus et seul un nombre très faible de cellules est capable de le faire. Cependant, la répétition permanente de ce processus provoque à long terme la formation de métastase.

Il est également important de noter que les phénomènes de dégradation des protéines de la matrice extracellulaire sont impliqués non seulement dans toutes les étapes de la progression tumorale mais aussi dans celles de l'angiogenèse, hormis lors du transport passif dans la circulation sanguine.



Adapté d'après Barnes PJ, 1986

Figure 17: Innervation cholinergique du poumon

L'appareil respiratoire est richement innervé par les nerfs sympathiques et parasympathiques qui contrôlent le fonctionnement de l'épithélium respiratoire de surface, des glandes sous-muqueuses, des muscles lisses et des vaisseaux sanguins.

C- Le système cholinergique de l'appareil respiratoire

I- Le système cholinergique neuronal

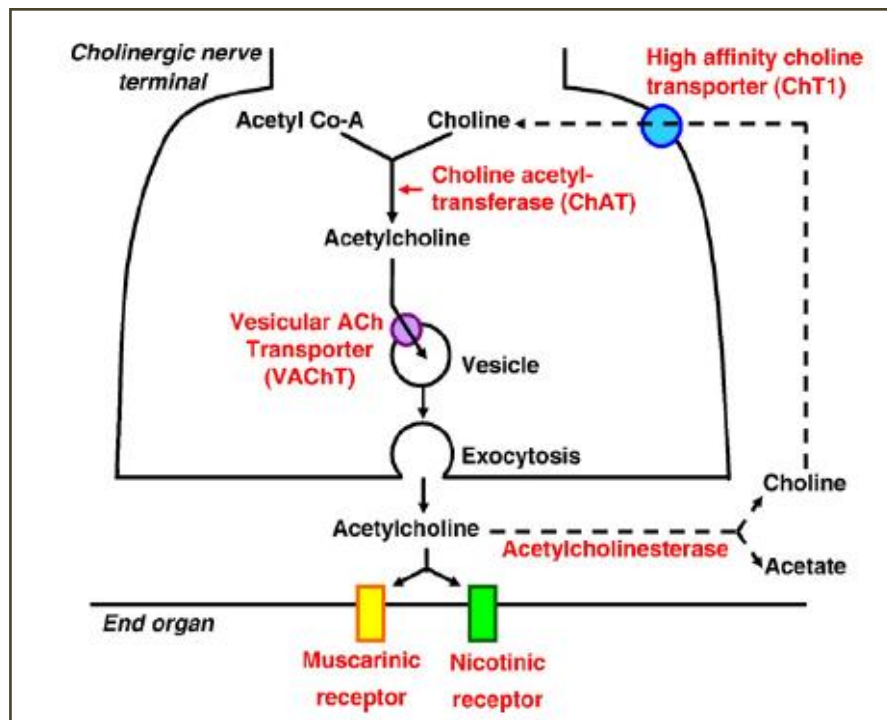
I-1 Généralités

L'arbre trachéo-bronchique est richement innervé par les nerfs sympathiques et parasympathiques efférents du système nerveux autonome (Richardson *et al.* 1982; Barnes 1986 a, 1986 b; Gwilt *et al.* 2007). L'épithélium respiratoire de surface, les glandes sous-muqueuses, les muscles lisses, les vaisseaux sanguins et les cellules inflammatoires sont tous sous contrôle nerveux (**Figure 17**). Les neurotransmetteurs (acétylcholine, adrénaline, neuropeptides etc.) peuvent ainsi moduler le calibre des voies respiratoires (constriction et dilatation des bronches), le flux sanguin au niveau microvasculaire, induire la toux, la production de mucus et augmenter l'inflammation notamment dans les broncho-pneumopathies (Joos *et al.* 2001).

Les système nerveux sympathique et parasympathique sont constitués de trois différents types de fibres nerveuses : les fibres excitatrices cholinergiques, les fibres inhibitrices adrénérgiques (adrénaline) ainsi que les fibres non-cholinergiques non-adrénérgique (NANC), qui peut être soit excitatrices (e-NANC, neurokinine A), soit inhibitrices (i-NANC, neuropeptides) (Barnes 1986 a, 1986 b). Les fibres de type cholinergiques constituent l'innervation excitatrice prédominante dans les voies respiratoires (Racké et Matthiesen 2004).

I-2 L'acétylcholine neuronale

L'acétylcholine (ACh) est le principal neurotransmetteur du système cholinergique neuronal, elle est synthétisée, stockée et sécrétée à partir des synapses cholinergiques (Prado *et al.* 2002). L'acétylcholine est l'ester acétique de la choline et est synthétisée à partir de la choline et l'acétyl-CoA, par la choline acétyltransférase (ChAT) et moins fréquemment par la carnitine acétyltransférase (CarAT) (White et Wu 1973; Tucek *et al.* 1982; Ayala 1995). Afin de limiter l'activation des cellules effectrices, après la libération, l'acétylcholine est dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE) en choline et acétate. La butyrylcholinestérase est aussi capable de dégrader l'acétylcholine (Gwilt *et al.* 2007), bien que le rôle précis de cette enzyme ne soit pas encore clairement élucidé.



Gwilt CR *et al.*, 2007

Figure 18: Schéma des différents composants du système cholinergique neuronal.

Introduction

Une fois synthétisée, l'ACh est transférée dans des petites vésicules synaptiques par le transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VAChT), et agit comme un échangeur H^+ /ACh (Parsons 2000). Après exocytose dans le milieu extracellulaire, l'acétylcholine est soit liée aux récepteurs cholinergiques (muscariniques et/ou nicotiniques) (Lukas *et al.* 1999; Wess *et al.* 2007) ou dégradée en choline et acétate. La choline est ensuite capturée via un transporteur de choline à haute affinité (ChT1) et est recyclée à l'intérieur de la cellule pour être réutilisée (**Figure 18**). L'acétylcholine neuronale est un important régulateur de la fonction des voies aériennes. En effet, l'activation des récepteurs cholinergiques (muscariniques et/ou nicotiniques) au niveau du muscle lisse bronchique et des glandes sous-muqueuses induit respectivement une bronchoconstriction (Elwood *et al.* 1993) et la stimulation de la sécrétion de mucus (Rogers 2001). L'ACh est donc impliquée dans la régulation des mécanismes de remodelage et de l'immunomodulation des voies aériennes (Gosens *et al.* 2004; Galvis *et al.* 2006).

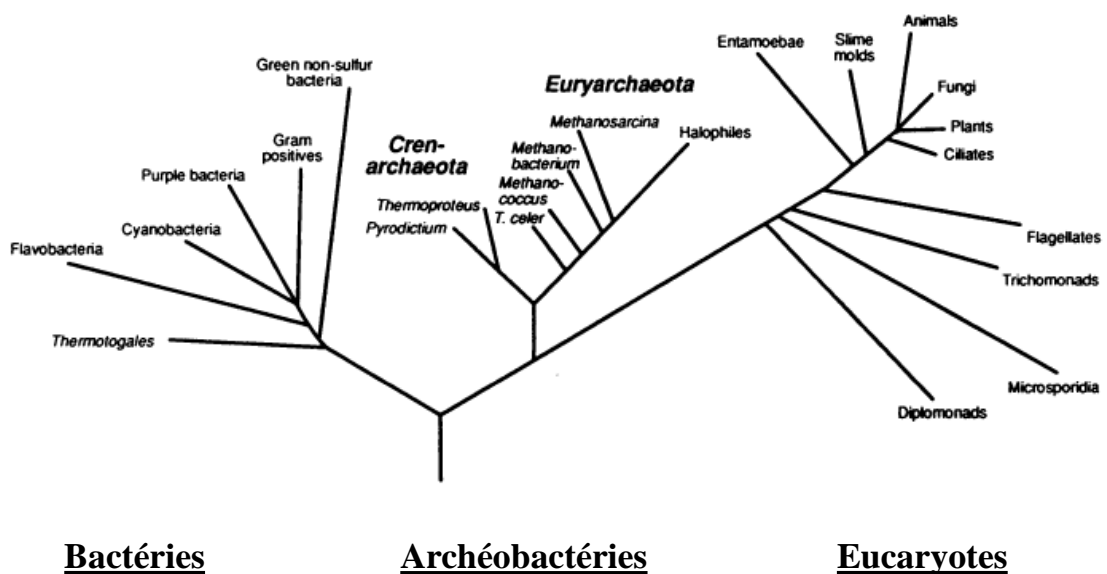
II- Le système cholinergique non-neuronal dans les cellules épithéliales respiratoires

II-1 Généralités

Le système cholinergique non-neuronal est phylogénétiquement un système plus ancien que le système neuronal, puisque l'ACh est exprimée et synthétisée de façon ubiquitaire par les cellules procaryotes et eucaryotes. L'ACh est retrouvée dans les bactéries, les champignons et les plantes (Wessler *et al.* 1999; Kawashima *et al.* 2007) (**Figure 19**). Chez l'homme, de nombreuses cellules non-neuronales sont capables de synthétiser et de sécréter l'acétylcholine dite "non-neuronale" (Wessler *et al.* 1998), elle est notamment détectée au niveau : 1) des cellules épithéliales (tractus pulmonaire, tractus alimentaire, tractus urogénital et épiderme) (Grando 1997; Wessler *et al.* 1999; Wessler et Kirkpatrick 2001), 2) des cellules mésothéliales (de la plèvre et du péricarde), 3) des cellules endothéliales (Kirkpatrick *et al.* 2001) et musculaires, ainsi que dans 4) le système immunitaire notamment dans les leucocytes (granulocytes, lymphocytes et macrophages) (Kawashima et Fujii 2000, 2003 a, 2003 b).

Bactéries (Gram-positive) <i>Bacillus subtilis</i> Contenue en Ach: 55,7 pmol/10 ¹⁰ CFU Synthèse de l'Ach: 1,16 nmol/g/min Activité ChAT-like: aucune	Archéobactéries (Thermococcales) <i>T.Kodakaensis KOD1</i> Contenue en Ach: 1,2 pmol/g Synthèse de l'Ach: 87 nmol/g/min Activité ChAT-like : 15%
---	---

Eucaryotes Animaux: Insectes Contenue en Ach: 6,67 nmol/g Synthèse de l'Ach: 1,54 nmol/g/min Activité ChAT-like : 91% Champignons: Levure Contenue en Ach: 2,83 nmol/g Synthèse de l'Ach: 5,93 pmol/g/min Activité ChAT-like : aucune Plantes: Pousses de bambou Contenue en Ach: 2,94 µmol/g Synthèse de l'Ach: 1,16 nmol/g/min Activité ChAT-like : 91%



Adapté d'après Wheelis ML *et al.*, 1992 et Kawashima K *et al.*, 2007

Figure 19: Expression et synthèse de l'acétylcholine (ACh) dans les différentes formes de vies.

ACh : acétylcholine, CFU : unité formant des colonies, ChAT : choline acétyltransférase.

Introduction

Au niveau l'épithélium respiratoire, l'ACh est spécifiquement retrouvée dans les cellules ciliées, sécrétoires et basales (Klapproth *et al.* 1997; Wessler *et al.* 1998; Proskocil *et al.* 2004) ainsi que dans les glandes sous-muqueuses. L'ACh est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques (prolifération, différenciation etc.) (Wessler *et al.* 1998; Grando *et al.* 2003; Metzen *et al.* 2003) et cela dès le début de la vie (Horiuchi *et al.* 2003). L'ACh contribue également au développement des broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO) en inhibant la dilatation du muscle lisse des bronches (Barnes 2004).

II-2 L'acétylcholine non-neuronale : synthèse et sécrétion

Les principaux composants du système cholinergique neuronal, à savoir : la choline-acétyltransférase (ChAT) (Oda *et al.* 1992; Klapproth *et al.* 1997; Reinheimer *et al.* 1998; Proskocil *et al.* 2004), l'acétylcholinestérase (AChE) (Wang *et al.* 2001), le transporteur de la choline (CHT1) (Pfeil *et al.* 2003 a, 2003 b; Proskocil *et al.* 2004) et l'acétylcholine (Reinheimer *et al.* 1996, 1998; Klapproth *et al.* 1997; Proskocil *et al.* 2004; Kummer *et al.* 2006, 2008) sont tous retrouvés dans l'épithélium trachéo-bronchique humain à l'exception du transporteur de l'acétylcholine vésiculaire (VACHT). Contrairement aux cellules neuronales, où l'acétylcholine est stockée dans des vésicules, dans les cellules non-neuronales ce mécanisme de stockage est complètement absent, et l'acétylcholine est directement sécrétée après sa synthèse (Racké et Matthiesen 2004; Racké *et al.* 2006). Toutefois, le VACHT a été détecté par immunomarquage dans l'épithélium bronchique du singe (Proskocil *et al.* 2004), dans les cellules caliciformes de la trachée de rat (Lips *et al.* 2005, 2007) et dans les lignées cellulaires humaines de carcinome pulmonaire à petites cellules (Song *et al.* 2003).

Nos connaissances sur le système cholinergique non-neuronale sont encore très fragmentaires mais certains mécanismes essentiels au contrôle de la synthèse et de la libération de l'acétylcholine non-neuronale ont été identifiés. L'ACh est sécrétée par les cellules non-neuronales via un transport actif médié par les membres de la famille des transporteurs de cations organiques (OCT) (Wessler *et al.* 2001).

Introduction

Les cellules épithéliales respiratoires humaines et murines expriment 3 isoformes de transporteurs cationiques (organic cation transporter, OCT) (Lips *et al.* 2005). OCT1 et OCT2 sont retrouvés au niveau apical des cellules ciliées, permettant de sécréter l'ACh dans cette région. Tandis que l'OCT3 est uniquement observé dans les cellules basales, dont le rôle n'est toujours pas clairement déterminé (Lips *et al.* 2005; Kummer *et al.* 2006). Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'une forte immunoréactivité de la ChAT a également été détectée dans la région apicale des cellules ciliées de l'épithélium (Wessler *et al.* 1998).

Une fois sécrétée, l'ACh est soit liée aux récepteurs cholinergiques (nicotiniques et/ou muscariniques) ou dégradée par l'acétylcholinestérase (AChE) (Wang *et al.* 2001). La dégradation de l'ACh est très faible dans les cellules trachéales porcines (Chen *et al.* 2005) et de cochon d'inde (Small *et al.* 1990). Ceci suggère qu'il y a peu ou pas de dégradation de l'ACh non-neuronale sécrétée par les cellules épithéliales respiratoires et cela permet donc à l'ACh de fonctionner de façon autocrine et paracrine.

Au niveau de l'épithélium respiratoire, l'ACh non neuronale, en se liant aux récepteurs nicotiniques et muscariniques, agit comme un régulateur autocrine ou paracrine de la prolifération (Klapproth *et al.* 1997; Carlisle *et al.* 2004; Racké *et al.* 2006), de la différenciation, de l'intégrité de l'épithélium respiratoire (Wessler *et al.* 1998; Wessler et Kirkpatrick 2001) et d'autres fonctions qui seront détaillées par la suite.

III- Les récepteurs à l'acétylcholine

L'acétylcholine interagit avec 2 classes de récepteurs cholinergiques qui se distinguent par les molécules naturelles qui les activent, à savoir la muscarine pour les récepteurs muscariniques et la nicotine pour les récepteurs nicotiniques.

III-1 Les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques (mAChRs) sont des récepteurs métabotropiques appartenant à la super famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ils sont constitués d'une extrémité extracellulaire qui fixe le ligand, de 7 domaines transmembranaires et d'une extrémité intracellulaire couplée aux protéines G ($G\alpha_s$, $G\alpha_{i/0}$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12}$).

Introduction

5 types de mAChRs ont été identifiés : M1, M2, M3, M4 et M5 (Alexander *et al.*, 2007). Au niveau des voies respiratoires humaines, seuls 3 types ont été détectés (M1, M2 et M3) (Mak et Barnes 1990; Gwilt *et al.* 2007) ; le récepteur M1 est particulièrement exprimé au niveau du poumon périphérique et des voies alvéolaires alors que les récepteurs M2 et M3 sont majoritairement exprimés au niveau des voies aériennes proximales.

Les récepteurs muscariniques sont exprimés dans presque chaque type cellulaire des voies respiratoires et du poumon, incluant le muscle lisse des voies respiratoires et vasculaires, les différentes cellules épithéliales de surface et des glandes sous-muqueuses, les cellules endothéliales ainsi que la majorité des cellules immunitaires (Racké *et al.* 2006).

L'activation des récepteurs muscariniques en synergie avec la stimulation du nerf vague provoque la sécrétion de mucus dans les voies aériennes et en particulier à partir des cellules caliciformes isolées (Racké et Matthiesen 2004). Le couplage des mAChRs à ses effecteurs cellulaires se fait par l'intermédiaire des protéines G. Leur activation par l'ACh, induit la contraction du muscle lisse bronchique (Racké *et al.* 2006; Zhang *et al.* 2010). Ils sont notamment utilisés comme cible thérapeutiques dans certaines maladies respiratoires comme l'asthme et la BPCO (Barnes 2004).

L'effet autocrine et paracrine de l'ACh sur les mAChRs induit la synthèse et la sécrétion de nombreux médiateurs inflammatoires, dont le leukotriène B4 (LTB4) qui régule l'accumulation des neutrophiles dans les voies respiratoires des patients atteint de BPCO (Profita *et al.* 2000, 2005, 2011; Jame *et al.* 2007).

III-2 Les récepteurs nicotiques

Les récepteurs nicotiques (nAChRs) sont des récepteurs ionotropes appartenant à la superfamille des récepteurs pentamériques à boucle cystéine. Ils sont composés de 5 sous-unités identiques ou hétérologues (α , β , γ , δ , ϵ) arrangées d'une manière à former un canal ionique (Changeux 2010). Il existe deux isotypes des récepteurs nicotiques, 1) les récepteurs de type musculaire que l'on retrouve au niveau des jonctions neuromusculaires des muscles somatiques, composés de 2 sous-unités α d'une sous-unité β , d'une sous-unité γ ou ϵ et d'une sous-unité δ et 2) les récepteurs de type neuronal qu'on retrouve au niveau du système nerveux central et périphérique et dans les cellules non-neuronales comme les cellules épithéliales respiratoires (bronchiques, alvéolaires, glandulaires etc..) (Racké et

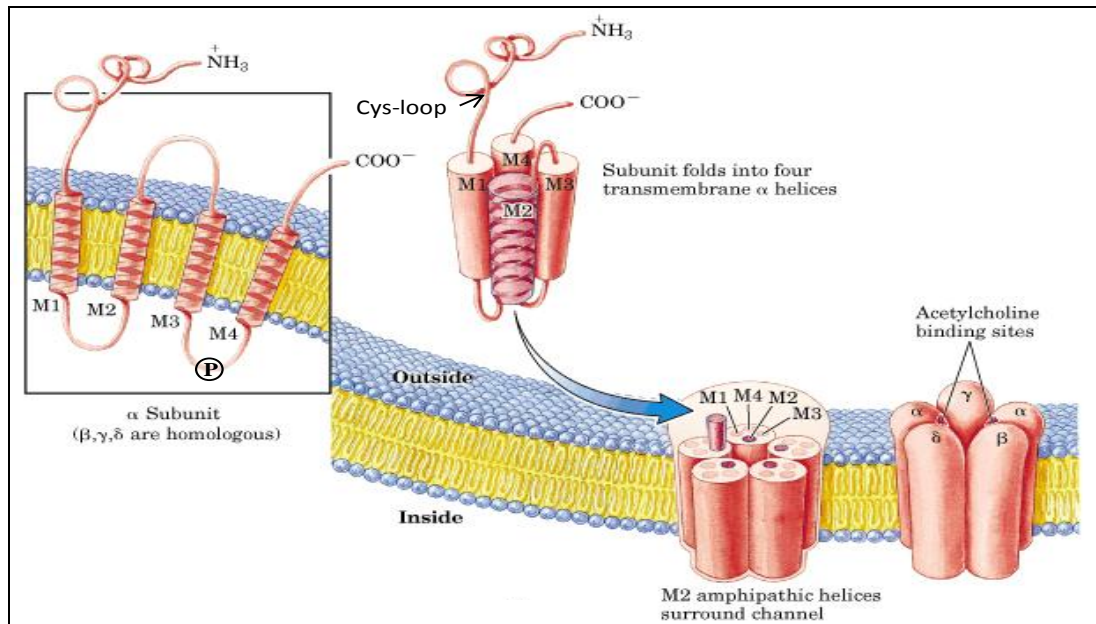
Introduction

Matthiesen, 2004). Les nAChRs sont organisés soit sous forme homo-pentamérique composés de cinq sous-unités identiques $\alpha 7$, $\alpha 8$ ou $\alpha 9$ ou sous forme hétéro-pentamérique formés d'une combinaison entre les sous-unités ($\alpha 2$ - $\alpha 6$) ou $\alpha 10$ et les sous-unités $\beta 2$ - $\beta 4$.

III-2.1 Structure générale des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine

Les récepteurs nicotiques (nAChRs) ont été les premiers récepteurs à être isolés et purifiés. Leur topologie a largement été déduite de leur homologue présent dans les tissus électriques de la torpille (un poisson appelé également *Torpedo*) (Unwin 1993). Le récepteur nicotinique est une glycoprotéine membranaire de masse molaire d'environ 290 kDa, dont 20 kDa proviennent des résidus d'oligosaccharides. Les nAChRs sont composés de cinq sous-unités protéiques transmembranaires situées à des points équidistants autour d'un axe central formant un pore d'un diamètre d'environ 65 Å (Devillers-Thiéry *et al.* 1993, 1993; Miyazawa *et al.* 1999). Lorsque ces récepteurs sont activés par l'acétylcholine, ou par la nicotine et ses nitrosamines dérivées [NNK=4-(méthylnitroamino)-1-(3-pyridyl)-1-butane et NNN=N'-nitrosonornicotine], ils se comportent comme des canaux ioniques laissant entrer différents cations tels le Na^+ , K^+ ou le Ca^{2+} etc., une perméabilité dépendante des sous-unités qui composent les nAChRs (Zia *et al.* 2000). La stimulation des nAChRs induit un influx calcique, soit directement via les nAChRs, soit à travers un changement de potentiel membranaire qui mène à l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants (Zia *et al.* 2000). Cette stimulation assure une transmission rapide du signal notamment au niveau des synapses et l'activation de nombreuses voies de signalisation (Schuller 2009; Improgo *et al.* 2011). Cependant, une exposition prolongée des nAChRs à l'agoniste peut conduire à l'inactivation du récepteur, dont le degré d'inactivation dépend encore une fois de la composition en sous-unités des nAChRs (Galzi et Changeux 1995).

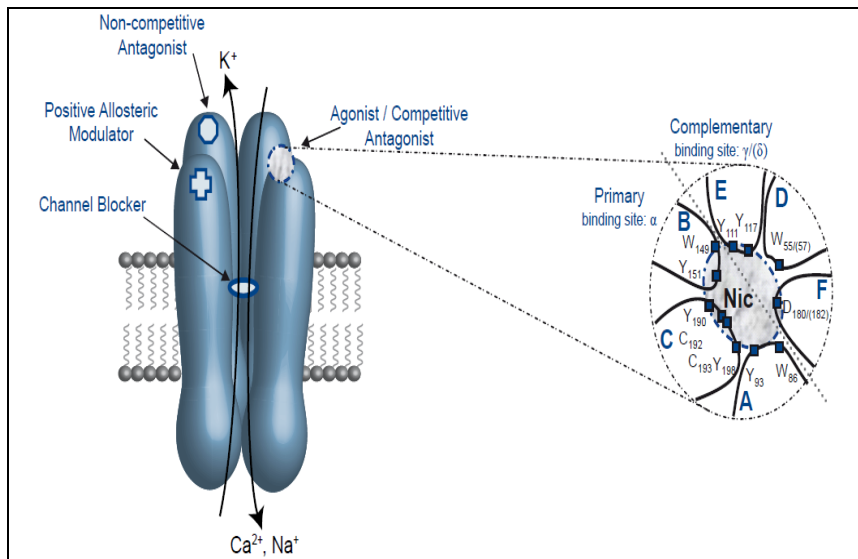
Il existe une grande variété de sous-unités des récepteurs nicotiques de type neuronal ; cette hétérogénéité est due à la diversité des gènes qui codent pour ces sous-unités (Wada *et al.* 1989; Zoli *et al.* 1995). Chez les vertébrés, 9 sous-unités α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) et 3 sous-unités β ($\beta 2$ - $\beta 4$) ont été identifiées (Deneris *et al.* 1991; Cooper *et al.* 1991; Elgoyhen *et al.* 1994; Arias 1997; Lustig *et al.* 2001). Généralement, les nAChRs hétéropentamériques sont composés de deux sous-unités différentes α et β avec une stoechiométrie de $(\alpha_x)_2(\beta_y)_3$.



www.edimark.fr/publications/articles/les-recepteurs-nicotiniques/5468

Figure 20: Schéma d'organisation d'une sous-unité nicotinique et de l'arrangement d'un récepteur nicotinique de l'acétylcholine.

Chaque sous-unité contient une extrémité extracellulaire dans laquelle on retrouve la boucle extrêmement conservée Cys-128/Cys-142, 4 domaines transmembranaires (M1-M4) et le domaine cytoplasmique qui porte plusieurs sites de phosphorylation. L'organisation des cinq sous-unités, par le domaine transmembranaire amphipathique M2, délimite au centre le canal ionique par où transitent les cations.



Susan Wonnacott et Jacques Barik, Tocris bioscience, 2007

Figure 21: Représentation schématique du site primaire et complémentaire de liaison des agonistes des nAChRs de type musculaire.

Le site primaire est composé de 3 boucles d'acides aminés, A (Y93, W86), B (W149, Y151) et C (Y190, C192, C193, Y198). Le site complémentaire est également composé de 3 boucles, D (W55 ou 57), E (Y111, Y117) et F (D180 ou 182).

Introduction

Chaque sous-unité nicotinique se compose d'un grand domaine extracellulaire (extrémité N-terminale), de 4 segments transmembranaires (M1-M4), de deux boucles intracellulaires et d'une courte séquence extracellulaire C-terminale (**Figure 20**) (Noda *et al.* 1983; McCrea *et al.* 1987; DiPaola *et al.* 1989; Tsetlin *et al.* 2011).

Le grand domaine extracellulaire hydrophile possède des sites capables de lier les agonistes, les antagonistes compétitifs et non compétitifs, des modulateurs allostériques positifs, et possède également un ou plusieurs site(s) de glycosylation (Luo *et al.* 2009; Tsetlin *et al.* 2011). Chaque sous-unité nicotinique contient une boucle cystéine, formée par deux résidus cystéines (Cys128, Cys142) séparés par 13 acides aminés. Cette boucle est considérée comme une signature d'appartenance à la famille des canaux ioniques ligand dépendants et elle est impliquée dans la transduction du signal d'ouverture du canal. Le principal site de liaison à l'agoniste se situe dans le domaine N-terminal des sous-unités de type α (musculaires ou neuronales), près de 2 cystéines adjacentes en position 190 et 193 (**Figure 21**). D'autres résidus sont également essentiels à la fixation de l'agoniste, les tyrosines (Y 93, Y 190, Y 198) et le tryptophane (W 149) (**Figure 21**). L'absence de la tyrosine (Y190) en amont des 2 résidus cystéines, rend la sous-unité $\alpha 5$ incapable de reconnaître un agoniste (Conroy *et al.* 1990; Wang *et al.* 1996 b; Corringer *et al.* 2000). Les sous-unités β sont dépourvues des deux 2 cystéines 190/193, par contre les sous-unités $\beta 2$ et $\beta 4$ contiennent un résidus tryptophane caractéristique de la boucle D (**Figure 21**), leur permettant d'agir comme les sous-unités de type musculaire γ et δ , en procurant un site complémentaire de liaison à l'agoniste pour les récepteurs hétéropentamériques $\alpha\beta$ (Deneris *et al.* 1991; Arias 1997; Corringer *et al.* 2000).

Les 4 domaines transmembranaires hydrophobes (M1-M4) sont connectés entre eux par des petites boucles hydrophiles. La boucle intracellulaire hydrophile entre les segments M3 et M4 en particulier, est très importante pour l'assemblage des nAChRs et la régulation de l'expression de certaines sous-unités telle $\alpha 7$. Des mutations au niveau de cette boucle induit une diminution voire une perte complète de l'expression du nAChR $\alpha 7$ fonctionnel (Tsetlin *et al.* 2011). Cette boucle hydrophile contient également plusieurs sites de phosphorylation important pour la régulation des fonctions des nAChRs (Devillers-Thiéry *et al.* 1993; Galzi et Changeux 1995).

Sous-type de nAChR	Sous-unités	Combinaisons	Références	
			Expression ¹	Natif ²
Musculaire	$\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta$ et ϵ	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	Mishina <i>et al.</i> , 1986	
		$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$	Mishina <i>et al.</i> , 1986	
Neuronal	$\alpha 2-\alpha 6$ et $\beta 2-\beta 4$	$\alpha 2\beta 2$	Papke <i>et al.</i> , 1989	
		$\alpha 2\beta 4$	Duvoisin <i>et al.</i> , 1989	
		$\alpha 3\beta 2$	Papke <i>et al.</i> , 1989	
		$\alpha 3\beta 4$	Duvoisin <i>et al.</i> , 1989	
		$\alpha 4\beta 2$	Papke <i>et al.</i> , 1989	Champitiaux <i>et al.</i> , 2003
		$\alpha 4\beta 4$	Duvoisin <i>et al.</i> , 1989	
		$\alpha 6\beta 2$	Fucile <i>et al.</i> , 1998	Champitiaux <i>et al.</i> , 2003
		$\alpha 6\beta 4$	Gerzanich <i>et al.</i> , 1997	Vailati <i>et al.</i> , 1999
		$\alpha 2\alpha 5\beta 2$		Balestra <i>et al.</i> , 2000
		$\alpha 3\alpha 5\beta 2$	Wang <i>et al.</i> , 1996	
		$\alpha 3\alpha 5\beta 4$	Wang <i>et al.</i> , 1996	Conroy et berg, 1995
		$\alpha 3\alpha 6\beta 2$	Kuryatov <i>et al.</i> , 2000	
		$\alpha 3\alpha 6\beta 4$	Fucile <i>et al.</i> , 1998	Vailati <i>et al.</i> , 1999
		$\alpha 3\beta 3\beta 4$	Groot-kormelink <i>et al.</i> , 1998	
		$\alpha 4\alpha 6\beta 2$	Ramirez-latorre <i>et al.</i> , 1996	
		$\alpha 4\alpha 6\beta 2$		Champitiaux <i>et al.</i> , 2003
		$\alpha 5\alpha 6\beta 2$	Kuryatov <i>et al.</i> , 2000	
		$\alpha 6\beta 3\beta 4$	Kuryatov <i>et al.</i> , 2000	Vailati <i>et al.</i> , 1999
		$\alpha 6\beta 2\beta 3$ ($\alpha 4$)		Lena <i>et al.</i> , 1999
		$\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$		Olale <i>et al.</i> , 1997
		$\alpha 3\alpha 5\beta 3\beta 4$		Conroy et berg, 1995
	$\alpha 3\alpha 6\beta 3\beta 4$		Vailati <i>et al.</i> , 1999	
	$\alpha 4\alpha 5\alpha 6\beta 2$		Klink <i>et al.</i> , 2001	
	$\alpha 2 \alpha 2\beta 2\beta 2$		Forsayeth et korbin, 1997	
	$\alpha 7$ et $\alpha 8$	$\alpha 7$	Couturier <i>et al.</i> , 1990	Chen et patrick, 1997 Drisdell et green, 2000
		$\alpha 8$	Gotti <i>et al.</i> , 1994	
		$\alpha 7\beta 2$	Khiroug <i>et al.</i> , 2002	
		$\alpha 7\beta 3$	Palma <i>et al.</i> , 1999	
		$\alpha 7\alpha 8$		Gotti <i>et al.</i> , 1994 Anand <i>et al.</i> , 1993 Keyser <i>et al.</i> , 1993
		$\alpha 5\alpha 7\beta 2$	Girod <i>et al.</i> , 1999	
	$\alpha 9$ et $\alpha 10$	$\alpha 9$	Elgoyhen <i>et al.</i> , 1994	
$\alpha 9\alpha 10$		Elgoyhen <i>et al.</i> , 2001		

Tableau 2 : Représentation non exhaustive, des différentes combinaisons observées *in vitro* ou *in vivo* chez les vertébrés.

Les références citées montrent l'évidence soit de la fonctionnalité des récepteurs par expression hétérologue 1, soit de leur existence dans des systèmes natifs 2. D'après Millar, 2003.

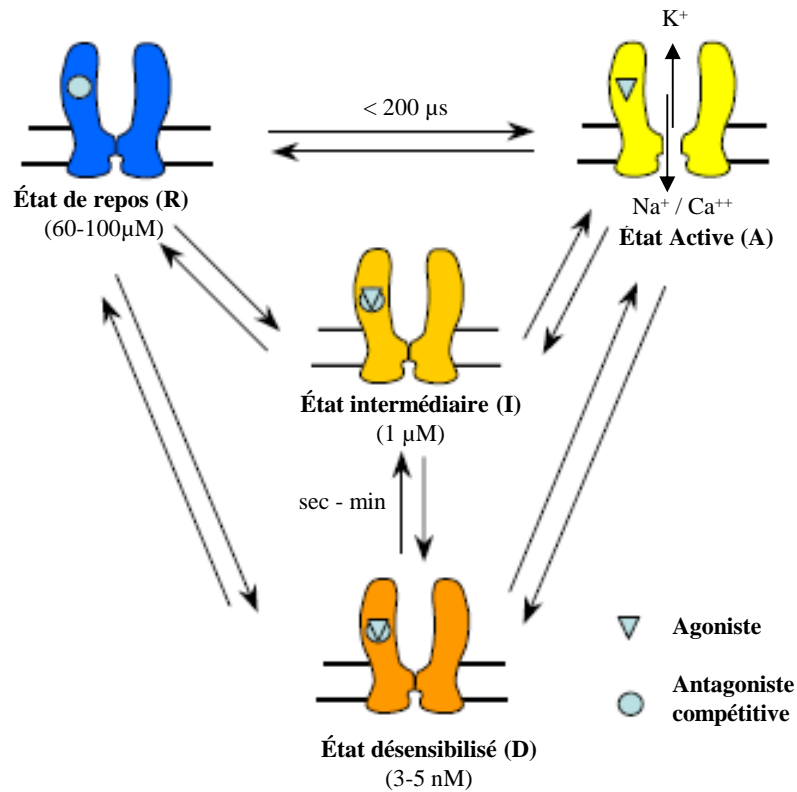
Introduction

Le canal ionique est formé par l'organisation de tous les domaines M2 des 5 sous-unités (**Figure 20**). Enfin, le quatrième segment transmembranaire hydrophobe (M4) oriente l'extrémité C-terminale dans le milieu extracellulaire.

III-2.2 Diversité des nAChRs

Les récepteurs nicotiques sont formés de deux sous-unités α et β homologues par leur structure, mais néanmoins divergentes par leurs séquences. L'assemblage des nAChRs est un processus strictement régulé et bien ordonné. Il nécessite une interaction appropriée entre les différentes sous-unités et probablement des protéines chaperonnes capables de faciliter l'assemblage. Le type cellulaire conditionne l'expression des sous-unités nicotiques et influence les affinités entre elles, ainsi que la production des protéines chaperonnes. Ceci confère une grande diversité de combinaisons et une spécificité pharmacologique (Gotti *et al.* 2009). Toutefois, les études d'expression hétérologue des sous-unités nicotiques dans des ovocytes de xénope et dans des cellules de mammifères montrent qu'un certain nombre de combinaisons d'assemblage ne pouvait avoir lieu, limitant ainsi la diversité des nAChRs pouvant exister (cf **Tableau 2**). Par exemple, les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 4$ peuvent former avec les sous-unités $\beta 2$ ou $\beta 4$ des nAChRs fonctionnels (Anand *et al.* 1991; Arias 1997) comme $\alpha 3\beta 2$ (Papke *et al.* 1989) ou $\alpha 3\beta 4$ (Duvoisin *et al.* 1989). D'autres combinaisons comme $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$... et des combinaisons plus complexes $\alpha 3\beta 4\alpha 5$, $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha$ etc. peuvent exister (Conroy et Berg 1995). En revanche, les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 3$ ne sont généralement pas en mesure de s'assembler selon la stoechiométrie $(\alpha 5)_2(\beta 3)_3$, cependant, $\alpha 5$ et $\beta 3$ ont été retrouvées co-assemblées dans des récepteurs avec au moins deux autres types de sous-unités (Ramirez-Latorre *et al.* 1996; Groot-Kormelink *et al.* 1998; Millar 2003).

La sous-unité $\alpha 6$ peut se combiner avec la sous-unité $\beta 4$ pour former des nAChRs fonctionnels (Gerzanich *et al.* 1997) et parfois dans des combinaisons complexes telles que les nAChRs fonctionnels $\alpha 6\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\alpha 4\beta 2$, ou $\alpha 6\beta 4\beta 3$ (Gerzanich *et al.* 1997; Fucile *et al.* 1998; Kuryatov *et al.* 2000; Champtiaux *et al.* 2002).



D'après Heidmann et Changeux, 1980 ; Galzi et Changeux, 1995

Figure 22: Transitions allostériques des nAChRs

Il existe au minimum 4 états de transition allostérique interconvertibles pour les récepteurs nicotiques : l'état de repos (R) ou activable; l'état actif (A) perméable aux ions; l'état intermédiaire (I) et l'état désensibilisé (D), ces 2 derniers étant imperméables aux ions. Les valeurs entre parenthèses représentent les affinités de l'ACh pour le site agoniste dans les différents états du récepteur.

Introduction

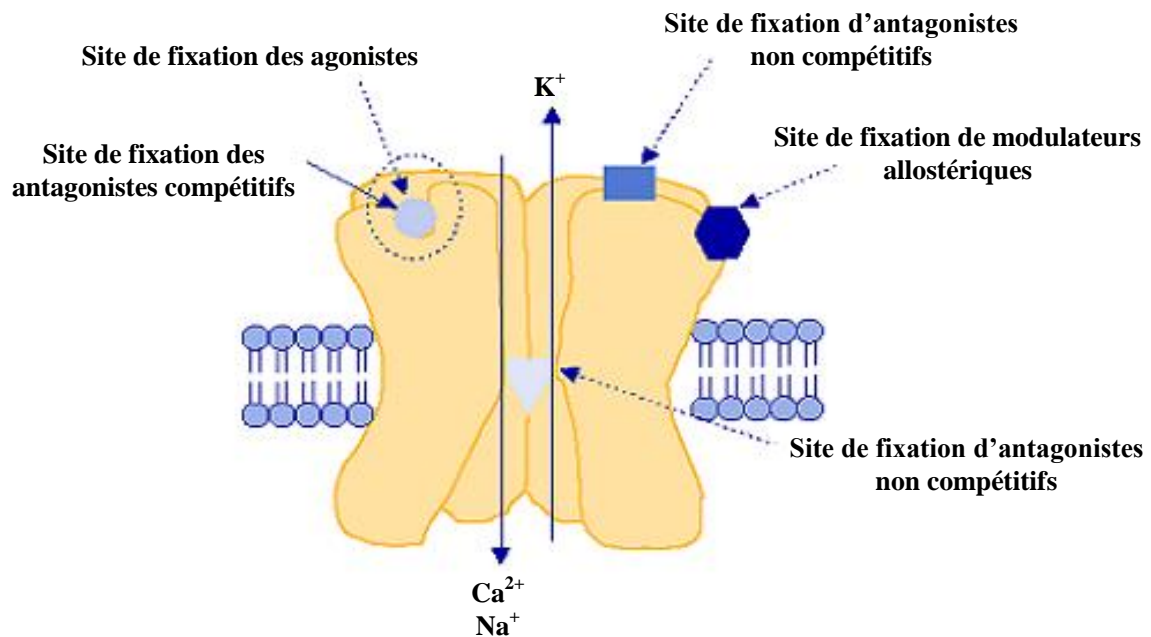
La sous-unité $\alpha 7$, largement exprimée dans le système nerveux central et périphérique, se distingue par sa capacité à former des homopentamères (Couturier *et al.* 1990; Chen et Patrick 1997; Drisdell et Green 2000). Dans la rétine de poulet, la sous-unité $\alpha 8$ (détectée uniquement chez le poulet) (Schoepfer *et al.* 1990) forme des hétéropentamères avec la sous-unité $\alpha 7$ (Gotti *et al.* 2009). La sous-unité $\alpha 9$ forme également des homopentamères (Elgoyhen *et al.* 1994) et la sous-unité $\alpha 10$ ne forme des récepteurs fonctionnels qu'en association avec la sous-unité $\alpha 9$ (Sgard *et al.* 2002). De plus, les deux sous-unités $\alpha 9$ et $\alpha 10$ sont principalement détectées dans les tissus épithéliaux et musculaires.

III-2.3 Les Transitions allostériques des récepteurs nicotiques

La fixation d'un agoniste spécifique, endogène comme l'acétylcholine ou exogène comme la nicotine, sur les nAChRs induit des transitions allostériques. Les nAChRs peuvent acquérir quatre conformations différentes interconvertibles suivant leur état (modèle tétraédrique de Monod J, Wyman J et Changeux JP, 1965) (**Figure 22**):

- Etat de repos (**R**) : lorsque le canal est fermé quand l'agoniste est absent
- Etat actif (**A**) : qui correspond à l'ouverture brève du canal (entre une microseconde et une milliseconde), état caractérisé par une faible affinité pour le ligand. Il permet la diffusion des cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} selon leur gradient électrochimique.
- Etat désensibilisé intermédiaire (**I**) : le canal est fermé et le nAChR est réfractaire à un nouveau stimulus mais présente une forte affinité pour l'ACh et la nicotine (Galzi et Changeux 1995; Edelstein et Changeux 1998)
- Etat désensibilisé final (**D**) : le canal est toujours fermé ; le nAChR doit subir un phénomène de récupération, permettant de retourner de l'état désensibilisé à l'état actif et présente une forte affinité pour les ligands.

L'équilibre entre les différentes conformations dépend de la concentration du ligand et du temps d'exposition. L'application de ligands nicotiques peut déplacer l'équilibre d'un état à l'autre (Léna et Changeux 1993; Galzi et Changeux 1995). Les agonistes stabilisent de manière transitoire l'état actif. A l'inverse, les antagonistes compétitifs, comme



D'après thèse Kamal MAOUCHE, 2008

Figure 23: Représentation schématique d'un récepteur nicotinique et des sites de liaison des agonistes, antagonistes et des modulateurs allostériques.

Tous les agonistes se lient aux nAChRs au niveau du site de fixation de l'acétylcholine, l'agoniste endogène des nAChRs. Les antagonistes inhibent les nAChRs en se fixant soit au niveau du site de liaison de l'acétylcholine, pour les antagonistes compétitifs comme l' α -bungarotoxine soit en dehors du site de liaison de l'agoniste, pour les antagonistes non compétitifs comme la Mécamylamine. La troisième catégorie de molécules capables de se fixer sur les nAChRs sont les modulateurs allostériques qui ont la capacité de moduler positivement l'effet de l'agoniste.

Introduction

l' α -bungarotoxine, ont la propriété de stabiliser préférentiellement les formes au repos (R) ou désensibilisées (D) (Bertrand *et al.* 1992; Galzi et Changeux 1995).

L'exposition prolongée à un agoniste, comme la nicotine, entraîne la fermeture du canal et la désensibilisation du nAChR dont la récupération est difficilement réversible. Les récepteurs sont alors dans un état désensibilisé profond. Ils restent à la surface cellulaire mais sont incapables d'engendrer une réponse électrophysiologique.

La cinétique de désensibilisation et de récupération est différente selon la composition du nAChR ; par exemple les nAChRs homopentamériques $\alpha 7$ et $\alpha 8$ sont très rapidement désensibilisés (Couturier *et al.* 1990; Revah *et al.* 1991; McGehee et Role 1995; Gerzanich *et al.* 1997; Gotti *et al.* 2009). En revanche, les nAChRs hétéropentamériques affichent une activation et une désensibilisation transitoire avec une cinétique qui varie selon la composition en sous-unité α et β (Gross *et al.* 1991; Cachelin et Jaggi 1991; Galzi et Changeux 1995) ; les nAChRs $\alpha 3\beta 4$, par exemple, atteignent un état désensibilisé plus lentement que les nAChRs $\alpha 3\beta 2$.

Dans le cas des récepteurs hétéromériques, il est proposé que les sous-unités α modulent l'affinité du nAChR vis-à-vis des agonistes tandis que les sous-unités β sont impliquées dans la modulation des cinétiques de désensibilisation (Fenster *et al.* 1997).

III-2.4 Les différents ligands des nAChRs

Les propriétés pharmacologiques et fonctionnelles des nAChRs sont dépendantes des sous-unités qui les composent et de l'espèce étudiée (Deneris *et al.* 1991; Role 1992; Corringier *et al.* 2000). Les nAChRs affichent des cinétiques de désensibilisation très différentes (très rapide pour les nAChRs $\alpha 7$ et quasi absente pour les nAChRs $\alpha 4\beta 2$), ils peuvent notamment être inhibés par la nicotine (nAChR $\alpha 9$), avoir une grande perméabilité pour le calcium (nAChR $\alpha 7$) (McGehee et Role 1995; Lindstrom *et al.* 1996; Hogg *et al.* 2003), être activés par la choline (nAChR $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 9$) (Pereira *et al.* 2002) ou encore être insensibles à l' α -bungarotoxine (Sharples *et al.* 2000). Ces différentes propriétés ont permis d'identifier des ligands sélectifs qui sont des outils très importants pour l'identification et la caractérisation des nAChRs sur tissus. Les nAChRs présentent plusieurs sites de liaison dont trois sites spécifiques des agonistes, des antagonistes et des modulateurs allostériques (**Figure 23**). Ces différents ligands sont caractérisés dans les tableaux suivants :

Introduction

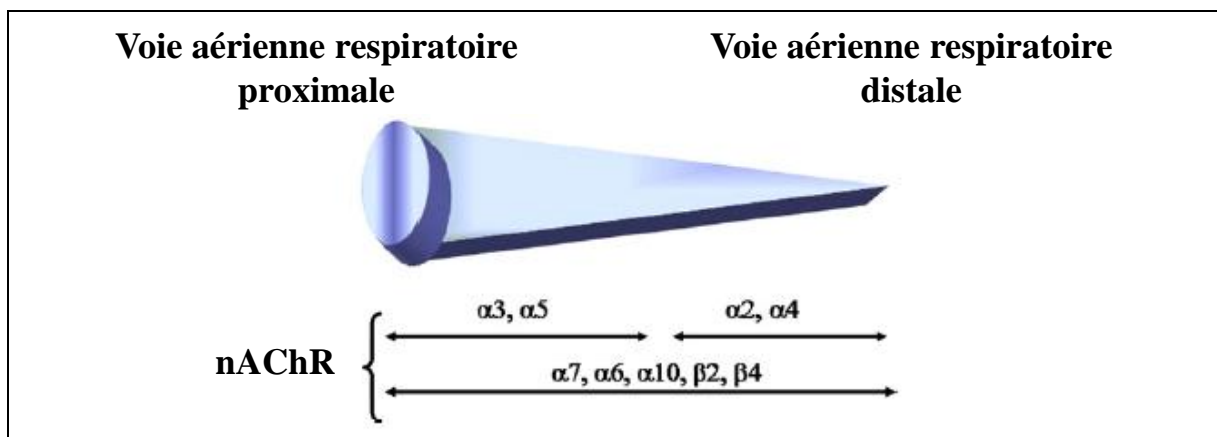
Drogues	Caractéristiques
Agonistes	
<i>Acétylcholine (ACh)</i>	C'est l'agoniste endogène des nAChRs et est produit par plusieurs types cellulaires et peut agir de façon autocrine ou paracrine (voir paragraphe II-2)
<i>Choline</i>	Agoniste sélectif des nAChRs $\alpha 7$ (Papke <i>et al.</i> 1996 ; Alkondon <i>et al.</i> , 1997). A des concentrations supérieures à 200 μ M elle le stimule sélectivement, en revanche, à des concentrations plus faibles elle le désensibilise (Alkondon <i>et al.</i> 1997).
<i>Nicotine</i>	Agoniste exogène, se lie avec une haute affinité aux nAChRs $\alpha 4\beta 2$, et avec une plus faible affinité aux nAChRs $\alpha 7$ (Gotti <i>et al.</i> 1997). Les nAChRs contenant la sous-unité $\beta 2$ sont plus rapidement désensibilisés par de faibles concentrations de nicotine par rapport à ceux contenant la sous-unité $\alpha 4$ (Deneris <i>et al.</i> 1991). Il est également un puissant agoniste des nAChRs $\alpha 3$ contenant la sous-unité $\alpha 5$ (Conti-Tronconi <i>et al.</i> 1994 ; Galzi et Changeux, 1995). En revanche, il agit partiellement en l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ (Wang <i>et al.</i> 1996 a). Ainsi, l'utilisation de la nicotine dans des études fonctionnelles permet de distinguer les nAChRs $\alpha 3$ contenant la sous-unité $\alpha 5$. Toutefois, la présence de la sous-unité $\alpha 5$ augmente la désensibilisation des nAChRs $\alpha 3\beta 2$ et $\alpha 2\beta 4$ (Wang <i>et al.</i> 1996 a).
<i>NNN</i>	N'-Nitrosornicotine , dérivé nitrosamine de la nicotine. Agoniste des récepteurs nicotiniques et muscariniques. Se lie aux nAChRs avec une plus grande affinité par rapport à la nicotine. Le NNN se lie préférentiellement à la sous-unité $\alpha 3$ (Grando 2008).
<i>NNK</i>	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone , un autre dérivé nitrosamine de la nicotine. Se lie aux nAChRs avec une plus grande affinité par rapport à la nicotine. Le NNK se lie préférentiellement à la sous-unité $\alpha 7$ (West <i>et al.</i> 2003).
<i>Autres</i>	En dehors de l'acétylcholine et la nicotine, il existe plusieurs agonistes naturels des nAChRs comme la cytosine, l'épibatidine, l'anabaséine ou des agonistes synthétiques tels que la diméthylphenylpiperazine (DMPP) et le GTS-21 [3-(2,4-dimethoxybenzylidene) anabaseine].

Tableau 3 : Les agonistes des nAChRs

Introduction

Drogues	Caractéristiques
Antagonistes	
<i>α</i> -bungarotoxine (<i>α</i> -BTX)	Antagoniste compétitif de 8kDa isolé du venin de serpent <i>Bungarus Multicinctus</i> . Se lie sélectivement, avec une haute affinité (1 nM) et d'une façon quasi irréversible aux nAChRs $\alpha 7$ (Couturier <i>et al.</i> 1990; Davis <i>et al.</i> 2009). Des concentrations d'environ 10 nM bloquent efficacement les réponses induites par la nicotine via les nAChRs $\alpha 7$. L' α -BTX a la propriété de ne pas interagir avec les nAChRs hétéropentamériques α/β même à des concentrations très élevées (μ mol), faisant de cette toxine un outil très précieux pour la caractérisation du nAChR $\alpha 7$.
<i>α</i> -conotoxine MII	Antagoniste compétitif et petite toxine de 14 à 17 acides aminés, qui a une haute sélectivité pour les nAChRs $\alpha 3\beta 2$ (Harvey <i>et al.</i> 1997; Corringer <i>et al.</i> 2000). Les nAChRs $\alpha 3\beta 2$ sont complètement bloqués avec 100 nM d' α -conotoxine MII (Cartier <i>et al.</i> 1996; Kaiser <i>et al.</i> 1998). Elle présente également une haute affinité pour les nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 6$ (McIntosh <i>et al.</i> 2004).
Mécamylamine	Composé synthétique et antagoniste non compétitif qui inhibe préférentiellement les récepteurs hétéropentamériques α/β par rapport aux homopentamères tel le nAChRs $\alpha 7$ (Chavez-Noriega <i>et al.</i> 1997). Elle bloque le canal ionique en se liant au site de fixation de l'antagoniste non compétitif à l'intérieur du canal et par conséquent inhibe les effets de la nicotine. Elle permet ainsi d'établir les mécanismes d'action médiés par les hétéropentamères (Ohtani <i>et al.</i> 2006).
κ -bungarotoxine (κ -BTX)	Antagoniste compétitif qui est un homodimère de 66 acides aminés, isolé du venin de serpent <i>Bungarus Multicinctus</i> . Elle a une haute sélectivité pour les nAChRs $\alpha 3\beta 2$ ($IC_{50}=1,16$ nM), avec un effet lentement réversible (Luetje <i>et al.</i> 1998). A forte concentration, 100nM, la κ -bungarotoxine est capable d'inhiber l'effet stimulateur de l'ACh sur les nAChRs $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ et $\alpha 3\beta 4$ (Grant <i>et al.</i> 1998).
Autres	La méthyllylaconitine (MLA), TMPH (2,2,6,6-Tetramethylpipridin-4-yl heptonoate), d-tubocurarine etc...
Modulateurs allostériques positifs	
Ce sont des composés qui ont la capacité de moduler positivement l'effet de l'agoniste en se fixant en dehors du site de liaison de l'agoniste . Plusieurs molécules ont été identifiées récemment telles : la galanthamine, la physostigmine, et l'ivermectine toutes modulant le nAChRs $\alpha 7$ et la β -estradiol ($\alpha 4\beta 2$) (Curtis <i>et al.</i> , 2002 ; Pereira <i>et al.</i> 2002).	

Tableau 4 : Les antagonistes et les modulateurs allostériques positifs des nAChRs



Catassi A *et al.*, 2008

Figure 24: Distribution des différentes sous-unités nicotiques dans les voies aériennes respiratoires

III-2.5 Distribution des récepteurs nicotiques dans l'épithélium respiratoire de surface

C'est en 1997 qu'il a été démontré pour la première fois que les cellules épithéliales bronchiques humaines et murines expriment *in vivo* et *in vitro* les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\alpha 7$ et qu'elles sont capables de former des récepteurs nicotiques fonctionnels (Zia *et al.* 1997). Par la suite, de nombreuses équipes montrent la présence des sous-unités $\beta 2$, $\beta 4$ et $\alpha 6$, en plus des sous-unités citées ci-dessus, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines ainsi que dans les fibroblastes pulmonaires (Maus *et al.* 1998; Sekhon *et al.* 1999; Wang *et al.* 2001; Carlisle *et al.* 2004; Proskocil *et al.* 2004). Ces études montrent également que la plupart de ses sous-unités forment des récepteurs nicotiques fonctionnels. Plus récemment, notre laboratoire a détecté, par des techniques d'immunohistochimie, la présence du complexe $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ au niveau des cellules basales de l'épithélium de surface humain (Tournier *et al.* 2006), et l'expression du récepteur nAChR $\alpha 7$ par les cellules ciliés et les cellules basales de l'épithélium respiratoire humain (Maouche *et al.* 2009).

En résumé, les nAChRs sont retrouvés dans l'ensemble des voies aériennes humaines (Wessler *et al.* 1998, 1999; Conti-Fine *et al.* 2000; Wessler et Kirkpatrick 2001; Gahring et Rogers 2005) avec cependant un répertoire d'expression des sous-unités nicotiques qui varie depuis les voies aériennes distales jusqu'aux voies proximales (Catassi *et al.* 2008). Les cellules épithéliales bronchiques expriment spécifiquement les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 5$ alors que les cellules épithéliales des voies aériennes distales expriment spécifiquement les sous-unités $\alpha 2$ et $\alpha 4$.

Concernant les sous-unités $\alpha 7$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ et $\beta 4$, elles sont toutes exprimées par la plupart des cellules épithéliales et sont retrouvées tout le long des voies aériennes (West *et al.* 2003) (**Figure 24**).

III-2.6 Rôles des nAChRs dans l'épithélium respiratoire normal

a) nAChRs et morphogénèse pulmonaire

Le développement pulmonaire nécessite un contrôle de l'expression et de la distribution des facteurs de transcription, des facteurs de croissance, des composants de la matrice extracellulaire et des récepteurs de surface, notamment des récepteurs nicotiques. La morphogénèse du poumon nécessite également le contrôle de différents processus tels, la prolifération, la migration et la différenciation.

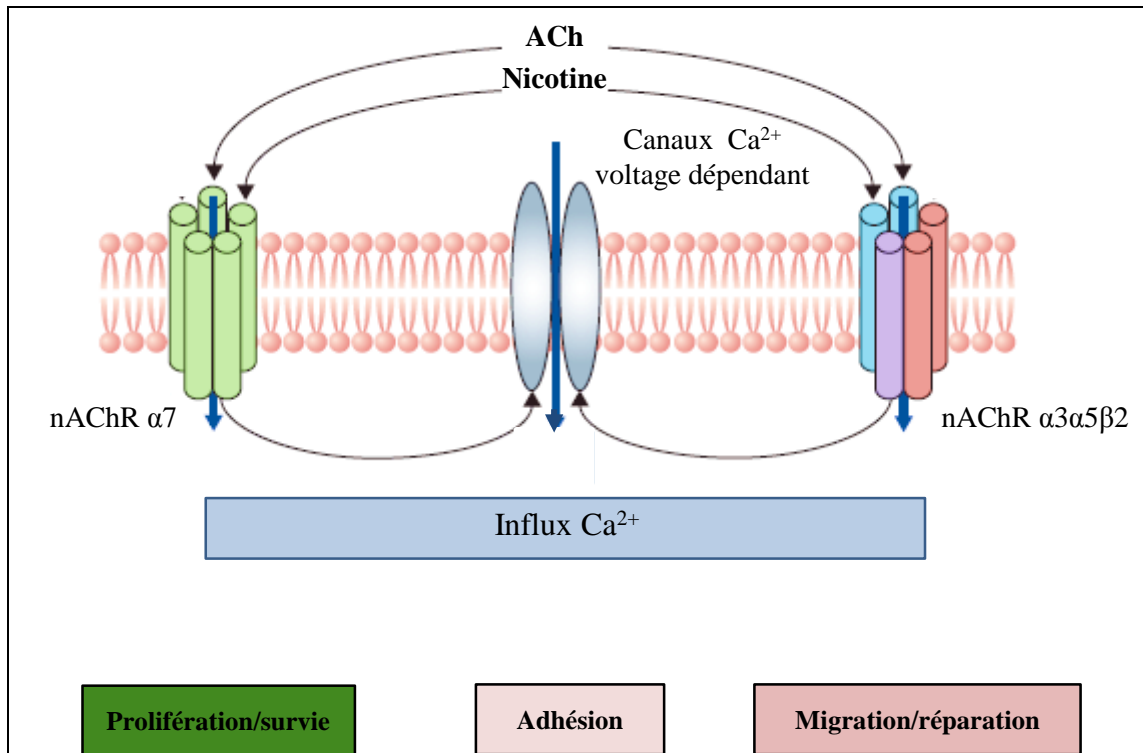
La nicotine est connue pour traverser librement le placenta et son interaction avec les nAChRs du poumon fœtal est l'un des mécanismes par lequel le tabagisme prénatale altère le développement pulmonaire (Lambers et Clark 1996; Gilliland *et al.* 2002; Fu *et al.* 2009). Cliniquement l'altération du développement pulmonaire se manifeste par la diminution des fonctions pulmonaires (insuffisance respiratoire), l'augmentation d'incidence de développement d'asthme et de mort infantile (Cutz *et al.* 1996; Fu *et al.* 2009). Chez le singe, l'exposition du fœtus à la nicotine tout le long de la période prénatale induit des altérations des fonctions pulmonaires similaires à celles observées chez les nouveau-nés (Sekhon HS et al, 2001). En plus de l'altération physiologique, une altération histologique des alvéoles a également été observée avec notamment moins de surface disponible pour les échanges gazeux suite à de plus grands espaces aériens. Une surproduction de collagène dans la sous-muqueuse a révélé une altération de la composition de la matrice extra-cellulaire. Toutes ces observations sont associées à une surexpression du nAChR $\alpha 7$ (Sekhon *et al.* 1999, 2002, 2004). D'ailleurs, les nAChRs $\alpha 7$ sont transcriptionnellement régulés par TTF-1 (thyroid transcription factor 1), un facteur essentiel à l'initiation de la morphogénèse pulmonaire (Reynolds et Hoidal 2005). Le nAChR $\alpha 7$ murin est exprimé au moment où la morphogénèse de la ramification pulmonaire se met en place (Wongtrakool *et al.* 2007). Ce processus est stimulé par la nicotine et le GTS-21 (agoniste spécifique du nAChR $\alpha 7$) et inhibé par l' α -bungarotoxine (antagoniste spécifique du nAChR $\alpha 7$), ce qui suggère que le nAChR $\alpha 7$ joue un rôle important dans le développement pulmonaire fœtal.

Introduction

Les nAChRs hétéropentamériques contenant la sous-unité $\alpha 5$ sont également impliqués dans la morphogénèse du poumon. Ils sont exprimés par de nombreuses populations cellulaires épithéliales (cellules ciliés, cellules de Clara et les cellules alvéolaires) durant le développement normal du poumon (Porter *et al.* 2011). Comme pour la sous-unité $\alpha 7$, l'expression de $\alpha 5$ est également régulée par le facteur de transcription TTF-1 (Reynolds *et al.* 2010), mais aussi par d'autres facteurs tels GATA-6 et Fox-A2 (Porter *et al.* 2011).

b) nAChRs et l'adhérence cellulaire

Le cytosquelette régule l'architecture cellulaire, l'organisation des complexes jonctionnels (jonctions serrés, desmosomes et jonction communicantes), la migration, la prolifération et l'apoptose (Wessler et Kirkpatrick 2001). L'acétylcholine affecte la fonction du cytosquelette. Lorsque des cultures de cellules épithéliales respiratoires humaines ou de rats sont exposées à la tubocurarine, à la mécamylamine ou à la κ -bungarotoxine (antagonistes des nAChRs hétéropentamériques), on constate une réduction de la taille cellulaire, un détachement cellulaire et le raccourcissement de leurs filaments intermédiaires (Klapproth *et al.* 1997; Maus *et al.* 1998). Une observation similaire a également été rapportée dans des cultures de cellules épithéliales bronchiques humaines (HBECs) dans lesquelles le blocage des nAChRs avec la mécamylamine a entraîné une altération du cytosquelette et le détachement cellulaire. Cette modification d'adhésion cellulaire est réversible par la nicotine (Zia *et al.* 1997). Toutefois, une exposition chronique à la nicotine induit un effet antagoniste sur l'adhérence et la motilité des cellules bronchiques humaines. Ces observations suggèrent que l'effet pathologique induit par la nicotine est dû à l'activation et à la désensibilisation des nAChRs hétéropentamériques, un mécanisme potentiellement impliqué dans la desquamation des cellules épithéliales respiratoires dans la bronchite chronique chez les fumeurs.



D'après Brennan P *et al.*, 2011

Figure 25: Représentation schématique des différentes fonctions des nAChR dans l'épithélium respiratoire humain

Introduction

c) nAChRs et prolifération cellulaire

Peu de données bibliographiques discutent le rôle physiologique des nAChRs dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires normales. Les nAChRs sont exprimés dès le début de la vie et sont essentiels, entre autres, à la régulation de la prolifération des cellules épithéliales au cours développement normal du poumon (Sekhon *et al.* 2004; Reynolds et Hoidal 2005; Fu *et al.* 2009; Porter *et al.* 2011). En 1997, Klapproth H et son équipe montrent que le traitement des cultures primaires de cellules épithéliales bronchiques par l'acétylcholine stimule leur prolifération (Klapproth *et al.* 1997). Les nAChRs sont également impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire. La stimulation de nAChR $\alpha 7$ par l'ACh en présence de SLURP-1 (secreted lymphocyte antigen-6/urokinase-type plasminogen activator receptor-related peptide-1), un modulateur allostérique positif du récepteur, contribue à la maintenance de l'homéostasie des cellules épithéliales bronchiques (Horiguchi *et al.* 2009).

Plus récemment, notre laboratoire a montré que le nAChR $\alpha 7$ est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules basales au cours de la réparation/régénération des lésions épithéliales *in vitro* et *in vivo* (Maouche *et al.* 2009) (**Figure 25**). Au cours de cette étude, nous avons également mis en évidence que l'inactivation du nAChR $\alpha 7$ par l' α -bungarotoxine induit la formation de métaplasie malpighienne.

En résumé, les nAChRs sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie de l'épithélium respiratoire. Cependant, dans des conditions non physiologiques, l'activation des nAChRs de façon chronique, comme chez les fumeurs, peut induire une dérégulation des processus de prolifération et d'apoptose cellulaire. Ces modifications peuvent favoriser le développement de certaines maladies pulmonaires comme la BPCO, la formation de lésions précancéreuses et le développement de cancers pulmonaires (voir **III-2.8 (a)**)

d) nAChRs et migration cellulaire

Les nAChRs sont impliqués dans la migration aléatoire ou directionnelle de nombreux types cellulaires. Il a notamment été montré que les nAChRs $\alpha 7$ et les nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 3$ régulent la migration des kératinocytes en inhibant la migration aléatoire et en stimulant la migration directionnelle (Grando *et al.* 2006). Les nAChRs sont également impliqués dans le chimiotactisme des spermatozoïdes et des leucocytes (Bray *et al.* 2005),

Introduction

(Blanchet *et al.* 2007; Gwilt *et al.* 2007). L'acétylcholine et la nicotine régulent l'adhérence et la motilité des kératinocytes de la peau (Trinkaus-Randall et Gipson 1984; Grando *et al.* 1995; Nguyen *et al.* 2004) ainsi que des cellules épithéliales bronchiques humaines (Zia *et al.* 1997; Maus *et al.* 1998). L'exposition des cultures primaires de cellules bronchiques humaines à la mécamylamine ou à la κ -bungarotoxine, des antagonistes sélectifs des nAChRs $\alpha 3/\beta 2$ (Papke *et al.* 1993), provoque le détachement cellulaire (Zia *et al.* 1997; Maus *et al.* 1998). Il s'avère donc que des concentrations élevées de nicotine provoquent une activation anormale et/ou une désensibilisation des nAChRs de l'épithélium respiratoire favorisant le détachement et la motilité cellulaire. Toutefois, peu d'études ont été réalisées concernant l'identification et la caractérisation des nAChRs impliqués dans la migration des cellules épithéliales respiratoires humaines. Notre laboratoire a mis en évidence, *in vitro* et *in vivo*, l'implication de l'hétéropentamère nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la migration des cellules basales au cours de la réparation des lésions épithéliales et il a également montré une augmentation de leur expression dans les cellules en migration (**Figure 25**). En revanche, aucun effet n'a été observé pour le nAChRs $\alpha 7$ dans la migration des cellules bronchiques humaines (Tournier JM *et al.* 2006). L'exposition à la nicotine des cultures primaires bronchiques humaines au cours de la réparation des lésions, induit une augmentation transitoire de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} dans les cellules en migration situées en bordure de la lésion.

III-2.7 Expression des nAChRs dans les cancers broncho-pulmonaires

En 1990, Maneckjee R et Minna JD ont décrit pour la première fois la présence de nAChR $\alpha 7$ dans des lignées cellulaires de cancers pulmonaires à petites et non à petites cellules (Maneckjee et Minna 1990). Ensuite, d'autres études ont suivi et montré l'expression d'autres sous-unités nicotiniques dans les lignées cellulaires tumorales (Plummer *et al.* 2005; Lam *et al.* 2007; Catassi *et al.* 2008).

La sous-unité $\alpha 7$ est exprimée d'une façon ubiquitaire non seulement dans des lignées cellulaires pulmonaires normales et tumorales mais également dans les tissus tumoraux (Plummer *et al.* 2005). Plus récemment, l'expression de plusieurs sous-unités α ($\alpha 3$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ et $\alpha 10$) et β ($\beta 2$ - $\beta 4$) a été détectée par RT-PCR et microarray dans des lignées cellulaires et dans des tissus de cancers bronchiques non à petites cellules provenant de patients fumeurs

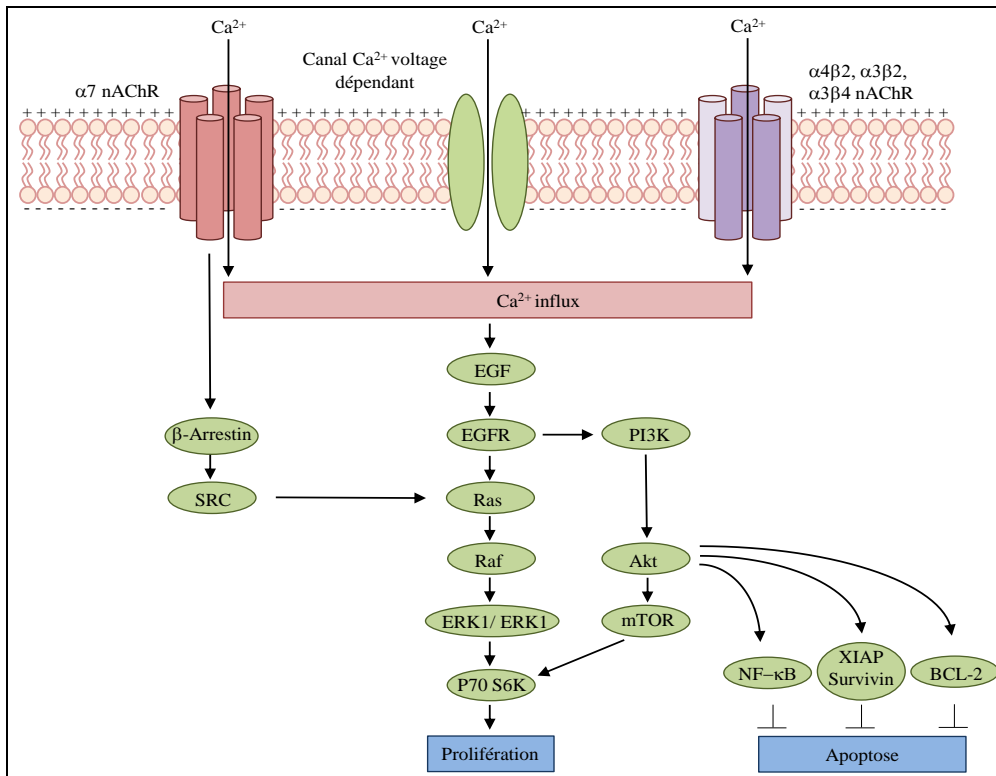
Introduction

et non-fumeurs (Lam *et al.* 2007). La comparaison de l'expression des sous-unités α ($\alpha 3$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$ et $\alpha 10$) et β ($\beta 2$ - $\beta 4$) entre le tissu tumoral et le tissu normal adjacent à la tumeur a révélé des variations d'expression entre le tissu tumoral et normal. Une diminution non significative des transcrits de la plupart de ces unités a été observée dans les tumeurs, à l'exception des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 4$ dont l'expression est soit significativement diminuée ($\alpha 4$) ou augmentée ($\beta 4$) dans les tumeurs par rapport aux tissus sains. Par contre, dans les lignées cellulaires tumorales (9 lignées NCI-H, CBNPC) en comparaison aux lignées épithéliales respiratoires (dérivant des cellules alvéolaires, neuroendocrines, et autres cellules bronchiques comme les Beas2B), une surexpression de toutes les sous-unités $\alpha 3$ - $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$ et $\beta 2$ - $\beta 4$ a été observée (Lam *et al.* 2007).

III-2.8 Rôle des nAChRs dans les cancers broncho-pulmonaires

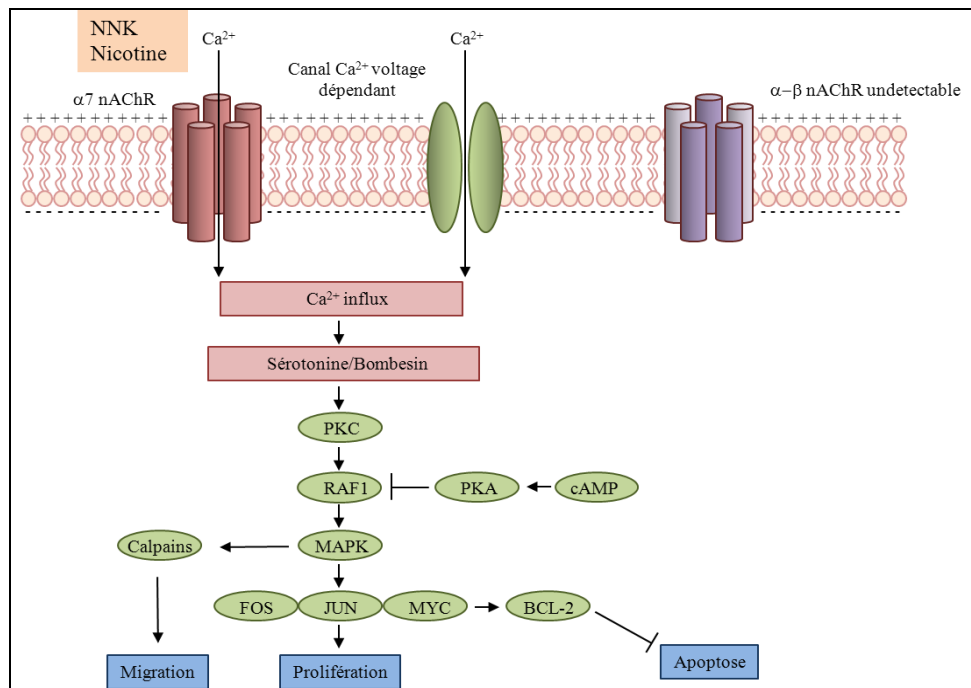
a) nAChRs et prolifération des cellules tumorales

L'exposition des lignées pulmonaires tumorales à la nicotine stimule la prolifération cellulaire (Schuller 2007, 2009). La stimulation chronique des nAChRs, associée à une oxygénation pulmonaire réduite, favorise le développement des tumeurs pulmonaires (Schuller *et al.* 1995). L'importance des nAChRs, et plus particulièrement le nAChR $\alpha 7$, dans la prolifération des lignées cellulaires tumorales est soutenue par la capacité des antagonistes des nAChRs $\alpha 7$ à inhiber la prolifération cellulaire induite par la nicotine. En effet, plusieurs études montrent que l' α -bungarotoxine et la méthyllycaconitine, antagonistes spécifiques du nAChR $\alpha 7$, inhibent l'effet stimulateur de la prolifération des lignées de carcinomes pulmonaires non et à petites cellules (Heeschen *et al.* 2002; Trombino *et al.* 2004; Dasgupta *et al.* 2006, 2009). De plus, la prolifération *in vivo* des cellules A549 (lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire) transplantées dans les souris nudes est inhibée par l' α -cobratoxine, un autre antagoniste spécifique du nAChR $\alpha 7$ (Grozio A *et al.* 2008). Par ailleurs, ces observations ont été confirmées par la transfection de siRNA spécifique de la sous-unité $\alpha 7$ dans les lignées pulmonaires tumorales (Dasgupta P *et al.* 2006). Le rôle du nAChR $\alpha 7$ dans la prolifération des cellules pulmonaires tumorales induite par la nicotine est renforcé par une surexpression du nAChR $\alpha 7$ dans les lignées pulmonaires tumorales (Plummer HK *et al.* 2005).



Adapté d'après Shuller HM, 2009

Figure 26: Le nAChR $\alpha 7$ et les hétéropentamères de type $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ régulent la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales pulmonaires non à petites cellules



Adapté d'après Shuller HM, 2009

Figure 27: Le nAChR $\alpha 7$ régule l'apoptose des cellules tumorales des cancers bronchiques à petites cellules

Introduction

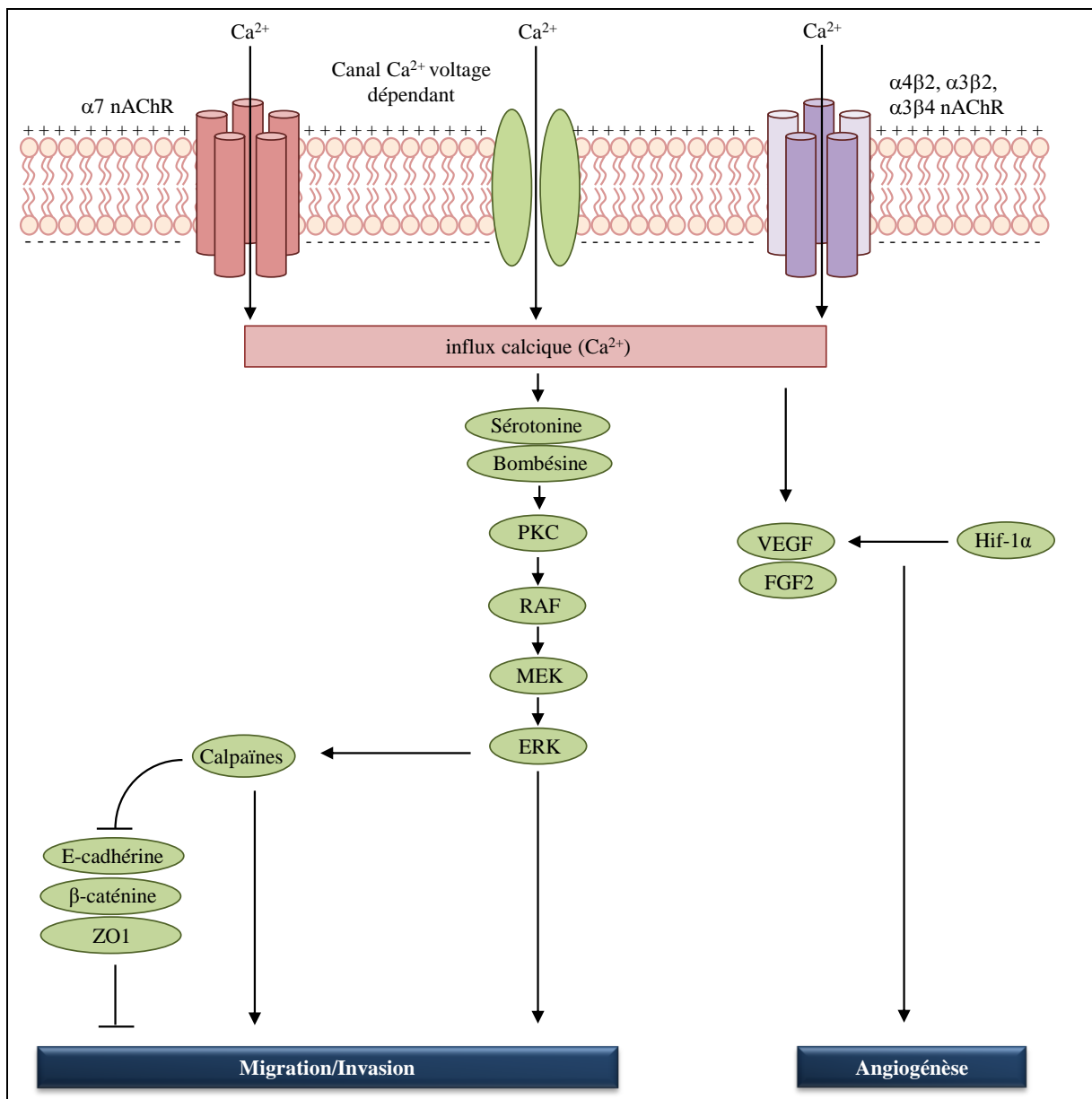
Les nAChRs contenant les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 4$ sont également impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales en réponse aux agonistes des nAChRs (Shuller HM, 2009).

Il semble donc que le nAChR $\alpha 7$ et les hétéropentamères contenant les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 4$ soient capables de promouvoir la prolifération des cellules pulmonaires tumorales et cela via des mécanismes impliquant la voie de signalisation EGF/EGFR qui régule les modules ERK1/2 et PI3K/Akt et la voie de signalisation β -arrestin/SRC (**Figure 26**).

b) nAChRs et apoptose cellulaire

En 1994, Maneckjee R et Minna JD montrent pour la première fois que de faibles concentrations en nicotine génèrent une résistance à l'apoptose induite (Maneckjee et Minna 1990). Depuis, il a été montré que la nicotine confère une résistance aux effets apoptotiques des drogues thérapeutiques, du stress oxydatif et des radiations UV (Wright *et al.* 1993; Mai *et al.* 2003; Zeidler *et al.* 2007; Egleton *et al.* 2008). Ceci suggère que les nAChRs sont impliqués dans la résistance à l'apoptose en réponse à la nicotine et ses nitrosamines dérivées (Zhang *et al.* 2009). L'effet anti-apoptotique de la nicotine dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) implique plusieurs voies de signalisation. L'un de ces mécanismes implique la voie PI3K/Akt, capable d'activer de nombreux facteurs anti-apoptotiques tels 1) NF κ B (facteur de transcription), 2) les molécules de la famille Bcl-2, (B cell lymphoma gene-2) via les nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 3$ et $\alpha 4$ (West *et al.* 2003) qui sont capables d'inhiber l'effet pro-apoptotique de Bad et Bax (Mai *et al.* 2003; Xin et Deng 2005) et 3) XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) ainsi que la survivine, des protéines de survie capables d'inhiber l'apoptose et qui sont principalement activées en réponse à la stimulation des nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 3$ (Dasgupta *et al.* 2006).

Dans les cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), la stimulation des nAChRs $\alpha 7$ par la nicotine ou le NNK (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) active la voie de signalisation PKC/ERK1-ERK2 induisant l'inhibition de l'apoptose via Bcl-2, un effet bloqué par les inhibiteurs de PKC et ERK1-ERK2 ou par des siRNA spécifiques du proto-oncogène Myc (**Figure 27**) (Jin *et al.* 2004; Schuller 2009)



Adapté d'après Improgo MR *et al.*, 2011

Figure 28: Représentation schématique des différentes voies de signalisation activées par les nAChRs

La stimulation des nAChRs $\alpha 7$ et des nAChRs contenant les sous-unités $\alpha 3$ et $\alpha 4$ induit l'activation des RCPG (sérotonine/bombésine) capables de réguler la migration/invasion des cellules tumorales via la voie ERK/Calpaïnes. La stimulation des nAChRs induit également l'expression du VEGF, un facteur essentiel au processus d'angiogénèse.

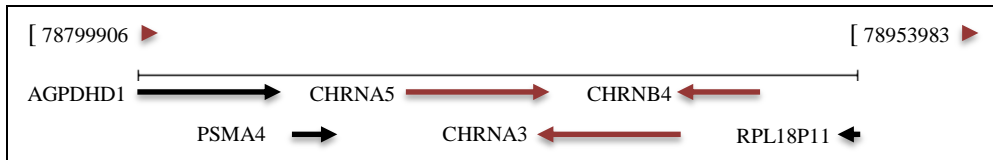
Hif-1: hypoxia inducible factors-1, facteur de transcription; FGF2: fibroblast growth factor 2

c) nAChRs et migration/invasion des cellules tumorales

L'exposition à la nicotine induit une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux tel l'E-cadhérine, la β -caténine et les molécules de jonctions serrées de type zonula occludens (ZO) avec une augmentation concomitante des protéines mésenchymateuses comme la fibronectine et la vimentine (Davis *et al.* 2009; Dasgupta *et al.* 2009). Cette transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un phénomène qui est connu pour être associé à la migration et à l'invasion cellulaire, deux processus qui sont essentiels à la formation de métastases par les cellules tumorales. Par ailleurs, il a été montré que le traitement des souris immunocompétentes avec la nicotine induit également le développement de tumeur et des métastases (Davis R *et al.* 2009). Le traitement avec la NNK (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone) favorise aussi l'augmentation de l'invasion et la migration des cellules cancéreuses pulmonaires via la voie de signalisation ERK/Calpaïnes (Xu et Deng 2004; Schuller 2009; Improgo *et al.* 2011) (**Figure 28**).

d) nAChRs et angiogénèse

La néo-angiogénèse est indispensable au développement tumoral (Arias HR *et al.* 2009). L'angiogénèse, nécessite 1) l'activation des cellules endothéliales par des stimuli angiogéniques tels que l'hypoxie et la sécrétion de cytokines, 2) la dégradation de la membrane basale par les métalloprotéinases et 3) la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Arias 1997; Coultas *et al.* 2005) (**Figure 28**). Les cellules endothéliales vasculaires expriment les nAChRs et les autres composants de la machinerie de la signalisation de l'ACh (Macklin *et al.* 1998; Wang *et al.* 2001). Dans ces cellules, l'ACh agit également de façon autocrine ou paracrine et module la vascularisation et le remodelage (Heeschen *et al.* 2002; Cooke et Ghebremariam 2008). La nicotine et son métabolite la cotinine peuvent induire la migration des cellules endothéliales en stimulant l'expression du VEGF (vascular endothelial growth factor) dans les cellules cancéreuses pulmonaires, un effet qui peut être réduit par l' α -bungarotoxine, la MLA et la mécamylamine, impliquant ainsi les nAChRs $\alpha 7$ et les hétéropentamères dans ce processus (Conklin *et al.* 2002; Heeschen *et al.* 2002; Li et Wang 2006; Ng *et al.* 2007).



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1138>

Figure 29: Représentation schématique du cluster 15q25-1 contenant les gènes CHRNA3, CHRNA5 et CHRNA4 codants respectivement pour les sous-unités α_3 , α_5 et β_4

L'inhibition des voies MAPK et PI3K empêche la néovascularisation induite par la nicotine (Heeschen C *et al.* 2002). Enfin, la nicotine, en combinaison avec l'estradiol, augmente le développement du cancer du poumon en favorisant la prolifération cellulaire, la sécrétion du VEGF et l'angiogenèse (Jarzynka *et al.* 2006).

D- Les cancers broncho-pulmonaires et le polymorphisme des nAChRs

I- Généralités

La variation naturelle de la séquence d'ADN est une propriété fondamentale, à la base de l'évolution des génomes. Les séquences génétiques sont identiques à 99,9% d'une personne à l'autre. Par contre, en moyenne, un nucléotide sur 1200 varie, soit moins de 0,1% du génome d'un individu. Les changements d'un seul nucléotide sont, de loin, le type de variation génétique le plus fréquent. Ces dernières sont connues sous le nom de polymorphismes nucléotidiques simples, ou SNPs (single nucleotide polymorphism). Environ 4% du code génétique assure la production de protéines (région codante). Or, en général les SNPs se retrouvent dans les régions non codantes du génome et ne produisent aucun changement sur la protéine. Dans le cas contraire, ces derniers peuvent affecter le fonctionnement biologique des protéines, et induire des prédispositions au développement de certaines maladies.

II- Le polymorphisme nucléotidique des nAChRs

Des études épidémiologiques et d'association pangénomiques (GWAS = genome-wide association studies) ont identifié une région 15q25 incluant un cluster de gènes codant pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ des nAChRs, pour lesquels un polymorphisme nucléotidique est fortement lié à la dépendance tabagique et à l'incidence des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et des cancers broncho-pulmonaires (Hung *et al.* 2008; Young *et al.* 2008; Brennan *et al.* 2011) (**Figure 29**).

L'association génétique entre les gènes et la dépendance à la nicotine a été rapportée pour la première fois dans une étude qui comparait les fumeurs dépendants à la nicotine par rapport à ceux qui ne présentaient pas les symptômes de la dépendance (Saccone *et al.* 2007). Plusieurs SNPs ont été associés à la dépendance tabagique, y compris le rs16969968, situé dans la région codante du gène CHRNA5, au niveau de l'exon 5 (Bierut *et al.* 2008).

(A)

Ins/del
CTAGAAACACATTGGAAGCTGCGCTC[A/G]ATTCTATTCGCTACATTACAAGACA

(B)

D398N

D: Acide aspartique (GAU ou GAC)

N: Asparagine (AAU ou AAC)

D398N



<i>EETESGSGPKSSRNTLEAAL</i> D <i>SIRYITRHIMKENDVREVVEDW</i>	Homme
<i>EETESGSGPKSSRNTLEAAL</i> D <i>SVRCITRHIMKENDVREVVEDW</i>	Chimpanzé
<i>EQTGSGGGPESSRNTMEAAL</i> D <i>SIRYITRHIVKENAVREVVEDW</i>	Bovidés
<i>EEARSSRGPRSSRNALEAAL</i> D <i>SVRYITRHVMKETDVREVVEDW</i>	Singe
<i>REEAESGAGPKSRNTLEAAL</i> D <i>CIRYITRHVVKENDVREVVEDW</i>	Rat
<i>REEAEKDGPKSRNTLEAAL</i> D <i>CIRYITRHVVKENDVREVVEDW</i>	Souris
<i>EKGNMSGSESSRNTLEAAL</i> D <i>SIRYITRHVMKENEVREVVEDW</i>	Poulet
<i>EETGKAKGPESQNTLEAAL</i> D <i>SIRYITRHVMKEHKVREVVEDW</i>	Xénope

Adapté d'après Bierut LJ et al, 2008

Figure 30: La Séquence nucléotidique et protéique contenant le site du polymorphisme rs16969968

Le polymorphisme rs16969968 correspond à une insertion de la base **A** remplaçant la délétion du nucléotide **G** (A). Ce polymorphisme induit une modification d'acide aminé, de l'acide aspartique en asparagine en position 398 (D398N) (B).

Introduction

Ce polymorphisme est une délétion d'une base purique **G** et une insertion d'une autre base purique **A** (**Figure 30 A**), un changement de base qui conduit au remplacement de l'acide aspartique (Aspartate, D) par l'asparagine (Asn, N) en position 398 (**D398N**) (**Figure 30 B**), située au niveau de la boucle cytoplasmique majeure de la sous-unité $\alpha 5$.

L'aspartate est un acide aminé hautement conservé dans la plupart des espèces telles, la grenouille, le poulet, les rongeurs, les bovins, et les primates; toutes possèdent l'acide aspartique à cet endroit (Bierut *et al.* 2008) (**Figure 30 B**). L'hétérozygotie pour l'allèle confère une augmentation de 1,3 au risque de développement d'une dépendance à la nicotine, tandis que les sujets homozygotes pour l'allèle polymorphique ont presque deux fois plus de risque (Saccone *et al.* 2009 a). Ces résultats ont été confirmés en utilisant différents groupes de populations et différentes approches expérimentales (Berrettini *et al.* 2008; Weiss *et al.* 2008; Bierut *et al.* 2008; Spitz *et al.* 2008; Caporaso *et al.* 2009). Ces auteurs montrent que les fréquences alléliques pour le polymorphisme de la région du chromosome 15q25 diffèrent entre les populations européennes et les populations d'origine asiatiques et africaines. Le SNP rs16969968, en particulier, est rare chez les populations asiatiques et africaines (Bierut 2009). Néanmoins, la région chromosomique 15q25 a été impliquée dans la dépendance à la nicotine et le cancer du poumon chez les Afro-américains, soutenant ainsi le rôle de ce locus dans la dépendance à la nicotine et le cancer du poumon (Saccone *et al.* 2009 b; Schwartz *et al.* 2009).

De plus, de nombreuses études génétiques récentes se rejoignent et confirment le lien entre les variants du chromosome 15q25 et le cancer pulmonaire ((Hung *et al.* 2008; Thorgeirsson *et al.* 2008; Amos *et al.* 2008). Ces variants ont été retrouvés dans 14 % des cas de cancers du poumon des populations européennes (Amos CI *et al.* 2008) et le rs16969968 a été détecté à nouveau parmi les SNPs avec la plus forte association à la pathologie (Hung *et al.* 2008). Par ailleurs, le SNP touchant la sous-unité $\alpha 5$ n'est pas le seul polymorphisme à être associé au cancer du poumon. Il existe deux autres SNPs fortement associés au développement des cancers pulmonaires, à savoir le rs1051730, trouvé dans la région codante du gène **CHRNA3**, et rs8034191, situé au niveau de **LOC123688** (gène codant **AGPHD1** aminoglycoside phosphotransférase domain containing 1) (Thorgeirsson *et al.* 2008; Amos *et al.* 2008).

III- Rôle du polymorphisme CHRNA3/A5/B4 dans les cancers broncho-pulmonaires

Les polymorphismes de la région du chromosome 15 (15q25) sont associés à la fois à la dépendance à la nicotine et au cancer du poumon. Cependant, on ne sait pas si le cancer du poumon est directement influencé par ce polymorphisme génétique ou s'il s'agit simplement d'une conséquence du tabagisme. Il existe des preuves génétiques pour les deux hypothèses. Le risque de développer un cancer du poumon est aussi augmenté chez les non-fumeurs, appuyant ainsi l'hypothèse que ces polymorphismes ont un effet direct dans la genèse des lésions cancéreuses (Amos CI *et al.* 2008). En outre, aucune association n'a été trouvée pour les autres cancers liés au tabagisme, comme les cancers des voies aérodigestives supérieures (cavité buccale, larynx, pharynx et œsophage) (Amos CI *et al.* 2008). Des études fonctionnelles, utilisant la lignée cellulaire HEK293T transfectée avec les ADNc des sous-unités $\alpha 3$, $\beta 4$ et la sous-unité $\alpha 5$ contenant le SNP rs16969968, ont montré qu'en présence d'agoniste des nAChRs (comme l'épipatidine) il y a une diminution de la concentration calcique intracellulaire, indiquant ainsi que la présence du SNP rs16969968 induit une perte de fonction du récepteur nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ (Bierut *et al.* 2008). La présence du polymorphisme rs16969968 (D398N) induit également l'augmentation des transcrits de la sous-unité $\alpha 5$ (Wang *et al.* 2009). Effectivement, il a été observé une surexpression des ARNm de la sous-unité $\alpha 5$ contenant le SNP, dans les adénocarcinomes par rapport au tissu sain (Falvella *et al.* 2009). Par contre aucune différence d'expression n'a été observée pour les autres gènes du locus 15q25-1.

Les variants des nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ sont donc associés à la dépendance tabagique et au développement du cancer du poumon via des mécanismes impliquant une expression génique aberrante et une altération de la fonction du récepteur. Ces données, confirmées par des résultats récents qui montrent que le cluster contenant le gène CHRNA3/A5/B4 est surexprimé dans les lignées cellulaires tumorales (CBNPC ou NSCLC) et dans les tissus tumoraux par rapport au tissu sain, supportent ainsi l'hypothèse que le polymorphisme de ces gènes joue un rôle direct dans le développement du cancer du poumon. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a montré clairement le rôle du SNP rs16969968 dans le développement du cancer du poumon.

Objectifs de l'étude

OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les nAChRs, activés par l'ACh endogène ou la nicotine et ses nitrosamines dérivées, NNN et NNK, exogènes modulent les concentrations calciques intracellulaires et sont donc susceptibles d'activer de nombreuses voies de signalisation, impliquées dans la libération de neurotransmetteurs et de facteurs mitogéniques ou angiogéniques, capables de réguler la prolifération, l'apoptose, la migration et la différenciation cellulaires (Shuller HM, 2009 ; Improgo MR et al, 2011). L'implication des nAChRs dans la progression tumorale a été principalement étudiée *in vitro* sur des cultures de lignées cellulaires, modèles peu représentatifs de l'hétérogénéité cellulaire des tumeurs broncho-pulmonaires.

Les modifications génétiques sont également connues pour être associées au développement d'un cancer. Dans ce cadre, des études épidémiologiques récentes ont identifié une région 15q25 incluant un cluster de gènes codant pour les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ des nAChRs pour lesquels un polymorphisme nucléotidique est fortement lié à la dépendance tabagique et à l'incidence des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et des cancers broncho-pulmonaire (Hung *et al.*, 2008). Le rôle spécifique de ces modifications génétiques sur la progression tumorale n'a pas été étudié à ce jour.

Le but de ce travail a donc été d'appréhender le rôle potentiel des nAChRs dans la progression tumorale, et pour cela nous avons eu 2 principaux objectifs qui sont :

A- Déterminer l'implication des nAChRs dans la progression des cancers broncho-pulmonaires en :

- 1- Identifiant les nAChRs exprimés dans les cancers broncho-pulmonaires, par analyse de deux types de tumeurs pulmonaires non à petite cellules: les adénocarcinomes et les carcinomes épidermoïdes.
- 2- Analysant la régulation de la prolifération et l'invasion cellulaire à partir de cultures primaires de cellules épithéliales isolées du tissu respiratoire normal et du tissu tumoral de différents grades.

Objectifs de l'étude

B- Déterminer le rôle du polymorphisme nucléotidique de la sous-unité $\alpha 5$ (rs16969968) dans le développement et la progression tumorale en :

- 1- Etudiant l'implication du SNP $\alpha 5$ (rs16969968) au cours de la régénération de l'épithélium trachéal murin.
- 2- Analysant le rôle du SNP $\alpha 5$ (rs16969968) dans la régulation de la prolifération et la migration des lignées cellulaires bronchiques et des cellules épithéliales isolées à partir du tissu respiratoire normal et murin.

MATERIELS ET METHODES

I- Tissus bronchiques humains normaux et tumoraux

Les échantillons sont obtenus à partir de patients consentants ayant subi des interventions chirurgicales pour un cancer pulmonaire non à petites cellules. Les tissus bronchiques humains normaux sont prélevés dans une zone morphologiquement normale à distance de la tumeur. Les tissus bronchiques normaux et tumoraux sont ensuite inclus dans un milieu cryoprotecteur O.C.T (Optimum Cutting Temperature) (Tissue-Tek, Zoeterwoude, Pays-Bas) et cryofixés dans l'azote liquide. Les blocs obtenus sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour une étude histologique et immunohistochimique.

Les tumeurs analysées dans cette étude sont caractérisées selon la classification de l'OMS en adénocarcinomes ou carcinomes épidermoïdes bien et peu différenciées.

II- Immunohistochimie

II-1 Réalisation des cryo-coupes

Les blocs congelés de tissus normaux et tumoraux sont coupés à l'aide d'un cryostat à -25°C (Leica CM3050 cryostat Microsystems, Nussloch, Allemagne) afin d'obtenir des coupes tissulaires de $5\ \mu\text{m}$ d'épaisseur pour les études histologiques et immunohistochimiques. Les coupes sont recueillies sur des lames de microscopie (Superfrost[®] Plus, Thermo scientific) et sont utilisées directement ou conservées à -20°C .

II-2 Anticorps utilisés

Les récepteurs nicotiques sont détectés par des anticorps reconnaissant les sous unités suivantes : anti- $\alpha 7$ polyclonal de lapin, H-302 ($2\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, CA) pour la localisation du récepteur nAChR $\alpha 7$, l'anti- $\beta 2$ polyclonal de chèvre, C-20 ($20\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Santa Cruz Biotech.) et l'anti- $\alpha 5$ polyclonal de lapin, ab41173 ($2\ \mu\text{g}/\text{mL}$, Abcam, Cambridge, UK) pour la localisation du récepteur nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$.

Matériel et méthodes

D'autres anticorps ont été utilisés afin de caractériser les cellules bronchiques et tumorales : l'anti-CK13 monoclonal de souris (IgG1, clone KS-1A3, 1/1000) pour la détection des cellules basales humaines, l'anti-Ki67 monoclonal de souris (IgG1 κ ; clone Ki67; 5 μ g/mL; DakoCytomation, Trappes, France) pour l'analyse de la prolifération cellulaire. Les témoins négatifs correspondants à chaque marquage ont été réalisés en utilisant des IgG non immunes de souris ou de lapin à la place des anticorps primaires (la dilution utilisée a été ajustée à la concentration de l'anticorps primaire). D'autres contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'anticorps primaire remplacé par du PBS/BSA 1%. La révélation a été faite par les anticorps secondaires anti-souris ou anti-lapin (IgG H+L, 10 μ g/mL) conjugués à l'Alexa Fluor 488 (fluorescence verte) ou 594 (fluorescence rouge) (Molecular Probes, Eugene,OR).

II-3 Mode opératoire

Les coupes tissulaires sur lames ont été décongelées et séchées à température ambiante durant 5 min et les marquages sont réalisés selon les étapes suivantes :

- Rinçage au PBS : 3 fois 5 min
- Blocage des sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps avec du PBS-BSA 3% : incubation pendant 60 min
- Incubation avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 1% : la nuit à 4°C
- Rinçage au PBS-BSA 1% : 1 fois 5 min
- Rinçage au PBS : 2 fois 5 min
- Incubation avec l'anticorps secondaire/Alexa 488 ou 594 dilué dans du PBS : 60 min
- Rinçage au PBS : 3 fois 5 min
- Contre-coloration des noyaux à l'hématoxyline de Harris : quelques secondes
- Rinçage à l'eau du robinet : 2 fois quelques secondes
- Rinçage au PBS : 1 fois quelques secondes

Les doubles marquages α 7/ β 2, α 5/ β 2 et α 7/Ki67 ont été réalisés selon les mêmes étapes décrites ci-dessus, les deux anticorps primaires ont été utilisés simultanément avec les dilutions adéquates. Les contrôles négatifs ont été réalisés en omettant l'un des deux anticorps primaire du marquage, remplacé par du PBS/BSA 1% ou en utilisant des IgG non-immunes de l'espèce correspondant à l'anticorps primaire.

Matériel et méthodes

Un autre contrôle a également été réalisé en remplaçant l'un des deux anticorps secondaires couplée à l'Alexa par du PBS.

Les coupes sont ensuite montées sous lamelle avec un milieu de montage hydratant et conservateur de fluorescence (Aqua Poly/Mount, Polysciences, Warrington, PA), et conservées à +4°C à l'abri de la lumière. L'acquisition des images a été réalisée avec un microscope AxioImager (Zeiss, Oberkochen, Germany) équipé d'une caméra Coolsnap FX (Roper Scientific, Duluth, GA). Les images acquises ont été traitées avec les logiciels AxioVision (Zeiss) et Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA).

III- Analyse transcriptionnelle par RT-PCR

III-1 Extraction de l'ARN à partir des tissus normaux et tumoraux

20 mg de tissu (bronche normale ou tumeur) ont été broyés avec l'ULTRA-TURRAX T25 (JANKE & KUNKEL, IKA-Labortechnik) en présence de 800µl de tampon de lyse fourni dans le kit « High Pure RNA Tissu Kit » (Roche, Diagnostics GmbH, Mannheim Germany). Les étapes d'extraction des ARNs totaux sont ensuite réalisées selon les instructions du fabricant. La concentration des ARNs extraits et la vérification de leur pureté ont été réalisées par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France).

III-2 La RT-PCR

Les ARNs totaux sont dilués dans de l'eau pour réaliser des solutions de 4ng/µl. Des aliquots de 10 ng sont ensuite préparés et utilisés pour la réaction de RT-PCR.

La RT-PCR a été réalisée en utilisant le kit « GeneAmp ThermoStable RNA PCR kit » (Applied Biosystems, Foster City, CA), dans lequel l'enzyme thermostable joue le rôle de transcriptase inverse et de Taq polymérase. L'ARN de la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase) a été utilisé pour la normalisation. Les amorces utilisées pour la détection des ARN messagers humains spécifiques des sous unités nicotiniques proviennent de chez Eurogentec (Seraing, Belgique). La séquence des amorces est résumée dans le tableau suivant :

Matériel et méthodes

Gene		Séquence des amorces	Amplicons (pb)
CHRNA3	S	AGC ACC GAG GGC AAC GCT CAG AA	195
	AS	CAG AAC TAG AGC TTC TCG TGA GGT	
CHRNA5	S	GTG GTA GTG GAC CAA AAT CT TCTA	191
	AS	GGC CAA GAG ATC CAA CAA TTG AAA	
CHRNA7	S	CAG TCT TAC TCT CTC TTC CCG TCT	217
	AS	GCA CCA GTT CAG AAG GAT GAC TC	
CHRNA2	S	CAG CTC ATC AGT GTG CA	347
	AS	GTG CGG TCG TAG GTC CA	
CHRNA4	S	TCG ATG TGC CTC TCA TCG GCA A	239
	AS	GCT TGG TCA CGC ATG ACT TGC T	
GAPDH	S	CCA GGG CTG CTT TTA ACT CTG GTA	202
	AS	GAG GGA TCT CGCTCC TGG AAG AT	

Tableau 5 : Séquence des amorces et taille des amplicons des gènes cibles

La transcription reverse (RT) est réalisée à 70°C pendant 15 minutes. Après dénaturation des hétéroduplexes ARN-ADN pendant deux minutes à 95°C, les séquences d'ADNc sont amplifiées selon les conditions décrites dans le schéma suivant :

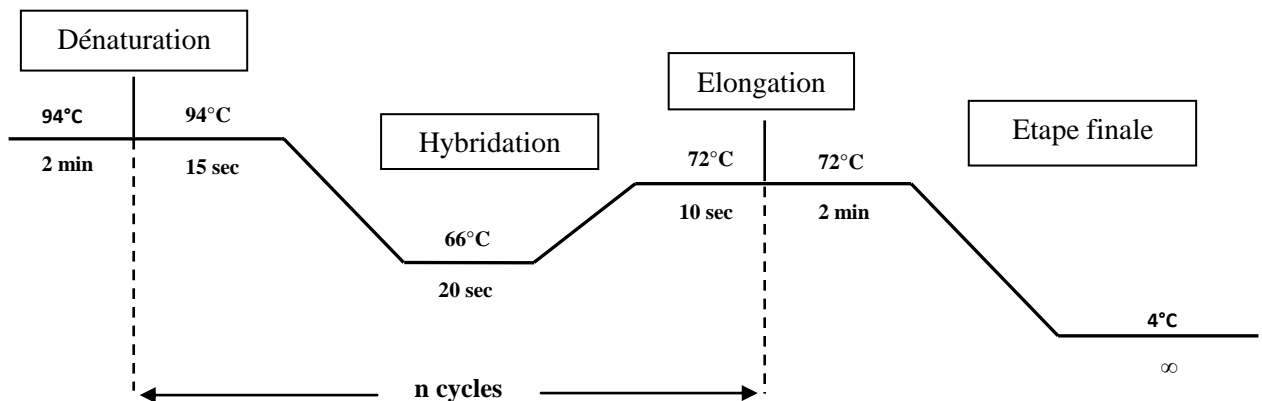


Figure 31: Schémas des étapes de RT-PCR

Matériel et méthodes

Gène	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Nombre de cycles
CHRNA3	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	40
CHRNA5	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	34
CHRNA7	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	33
CHRNA4	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	40
CHRNA2	40 sec à 94°C	40 sec à 60°C	40 sec à 72°C	40
GAPDH	15 sec à 94°C	20 sec à 66°C	10 sec à 72°C	19

Tableau 6 : Températures d'hybridation, durée et nombre de cycles des différentes amorces utilisées.

III-3 Migration et révélation des produits de RT-PCR

Les produits de RT-PCR obtenus sont mélangés avec un tampon de charge (eau, 10% de Ficoll [m/v] et 0,125% de xylène cyanol [m/v]; Sigma-Aldrich, Saint louis, USA) et sont séparés en gel d'acrylamide 10% (Euromedex, Souffelweyersheim, France) pendant 45 min à 250V. Les gels sont ensuite incubés 5 min avec du SyberGold (Invitrogen, Carlsbad, USA), un agent intercalant des acides nucléiques qui marque l'ADN. L'image des gels est obtenue à l'aide d'une caméra CCD refroidie à -25°C (LAS-1000, Fuji, Stamford, CT).

L'analyse des bandes est réalisée à l'aide du logiciel Aïda (Raytest, Courbevoie, France). Les valeurs (unité arbitraire de densité de pixel) pour les produits de PCR sont normalisées à l'aide des valeurs obtenues pour le gène de ménage (GAPDH).

IV- Analyse de la régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire par les nAChRs

IV-1 Culture cellulaire

IV-1.1 Dissociation des cellules épithéliales bronchiques normales

Des morceaux de bronches de 1 cm² sont rincés 2 à 3 fois dans le milieu RPMI 1640/HEPES 25mM (GIBCO). Les cellules sont ensuite dissociées dans le même milieu en présence de la protéase de *Streptomyces griseus* "Pronase E" (1mg/ml) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France) (incubation une nuit à 4°C). Le lendemain les cellules sont récupérées par centrifugation (200 x g, 5 min) après agitation.

IV-1.2 Dissociation des cellules tumorales

Le tissu tumoral est coupé en petits morceaux (de 1 à 2 mm) à l'aide d'un scalpel. Ces morceaux sont ensuite remis en suspension dans du milieu RPMI 1640/HEPES 25mM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis) supplémenté de la protéase de *Streptomyces griseus* "Pronase E" (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France), à raison de 1 mg/ml. La digestion est effectuée toute la nuit à 4°C sans agitation.

Le lendemain les cellules sont dissociées après une agitation rapide de 20 min à 40 rpm suivit d'une filtration avec un filtre avec des pores de 100 µm de diamètre. Les cellules sont récupérées après une centrifugation de 5 min à 200 x g.

IV-1.3 Conditions de culture

Les cellules dissociées (cellules bronchiques et cellules tumorales) sont remises en suspension dans du milieu de prolifération adapté de Lechner (Lechner J and Moira A. LaVeck, 1985), constitué d'un mélange DMEM / HAM-F12 (3/1, v/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis) additionné d'insuline sérique bovine (0,87 µM), de transferrine humaine (65 nM), d'EGF humain recombinant (1,6 nM), d'hydrocortisone (1,38 µM), d'acétate de rétinyl (30 nM), de 3,3',5-triiodo-L-thyronine (9,7 nM), d'épinéphrine (-) (2,7 µM), d'extrait de glande pituitaire bovine (35 µg/mL), de l'éthanolamine (5 µM), d' O-phosphorylethanolamine (5 µM), de sélénite de sodium (30 nM), de chlorure de manganèse (1nM), de métasilicate de sodium déshydraté (0,5 µM), de molybdate d'ammonium tétrahydraté (1 nM), du vanadate d'ammonium (5 nM), de sulfate de nickel hexahydraté (1nM), de chlorure d'étain dihydraté (0,5 nM), de pénicilline (100 U/mL) et de streptomycine (100 µg/mL) (Sigma Aldrich). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

IV-2 Test de prolifération MTT

Les cellules épithéliales bronchiques humaines et les cellules tumorales fraîchement dissociées sont ensemencées dans des microplaques de 96 puits (Corning, Schiphol-Rijk, Netherlands), préalablement recouverts de collagène I et IV, dans du milieu de prolifération à raison de 2×10^4 cellules/cm² en présence d'Ultrosor G (CIPHERGEN, Cergy-Saint-Christophe, France). Le jour suivant, les cellules sont rincées avec du milieu DMEM/Ham-F12 et cultivées en présence de concentrations croissantes (de 0 à 10⁻⁴ M) en α-bungarotoxine, α-connotoxine MII, mécamylamine et en nicotine dans du milieu de prolifération. Après 4 à 6

Inhibiteurs	N° Cat Tocris	Cibles	Concentrations utilisées
Genistein	1110	Récepteurs à tyrosine kinases (RTK)	20 μ M
Iressa / Gefintinib	3000	EGFR (tyrosine kinase)	2 μ M
Wortmannin	1232	PI 3-kinase	1 μ M
LY 294002	1130	PI 3-kinase α , β , δ , γ	10 μ M
PP 1	1397	Tyrosines kinases de la famille Src: p56 ^{lck} , p59 ^{fyn} ^T	10 μ M
SQ 22536	1435	Adenylyl cyclases	50 μ M
KT 5720	1288	Protéine kinase A	1 μ M
GF 109203X	741	Protéine kinase C formes α , β 1, δ , ϵ , ξ	2 μ M
PD 98059	1213	MEK (MAPKK)	50 μ M
U0126	1144	MEK-1 et MEK-2	10 μ M

Tableau 7 : Inhibiteurs des voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération

jours (pour les cellules épithéliales bronchiques) ou 7 à 14 jours (pour les cellules tumorales), les cellules sont incubées pendant 1 heure avec 1 mg/mL de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (ou MTT). Le MTT est un sel de tetrazolium soluble de couleur jaune qui peut être converti en un précipité pourpre de formazan insoluble (Marks DC et al, 1992). Cette conversion est effectuée par la déshydrogénase mitochondriale. Le précipité intra-cellulaire du MTT hydrolysé est extrait avec du propanol-2 et la lecture de la Densité Optique (DO) à 560 nm est réalisée sur un spectrophotomètre Xénus (Safas, Monaco).

La prolifération des cellules respiratoires (polypes nasaux) a également été analysée en présence de plusieurs inhibiteurs de voies de signalisation (tableau 7).

IV-3 Test d'invasion en chambre de Boyden

Les capacités invasives des cellules tumorales sont étudiées en chambre de Boyden modifiées (BD BioCoat™ Matrigel™ BD Biosciences). Les chambres se composent de membranes avec des pores de diamètre 8 µm. Les membranes sont recouvertes de matrigel, extrait de tumeurs EHS (Engelbrecht-Holm-Swarm), qui mime la composition des membranes basales (Kleinman et coll., 1986). Les membranes sont dans un premier temps réhydratées avec le milieu de prolifération sans SVF durant 2h à 37°C. Après dissociation des cellules tumorales comme précédemment décrit, les cellules sontensemencées de 1 à 5x10⁵ cellules/membrane (en fonction de la taille de la tumeur) dans le compartiment supérieur en présence de 250 µL de milieu de prolifération sans SVF. Afin d'analyser l'implication des récepteurs nicotiques dans l'invasion des cellules tumorales, ces dernières sont incubées en présence des antagonistes : α -bungarotoxine (10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M), α -conotoxine MIII (10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M), mécamylamine (10⁻⁷M, 10⁻⁶M, 10⁻⁵M) et de l'agoniste des nAChRs, la nicotine (10⁻⁸M, 10⁻⁷M, 10⁻⁶M). Afin de favoriser l'invasion cellulaire, un gradient de densité en SVF est créé en remplissant le compartiment inférieur avec 750 µl de milieu prolifération contenant 10% de SVF. Les membranes sont incubées à 37°C pendant un temps variable selon les tumeurs (2 à 3 jours) (**Figure 32**). Les membranes sont alors rincées avec du PBS et fixées 10 minutes dans du méthanol à -20°C. Les noyaux cellulaires sont ensuite colorés avec du DAPI (1/1000^{ième}) pendant 10 min à l'obscurité, puis les membranes sont montées entre lame et lamelle à l'aide du milieu de montage Aqua Poly/Mount (Polysciences, Warrington, PA, USA).

Matériel et méthodes

La quantification du test d'invasion est réalisée en comptant le nombre de cellules sur la face inférieure de la membrane de la chambre d'invasion. Pour ce faire, des images contiguës des noyaux fluorescents (Dapi) sont enregistrées (caméra Coolsnap FX (Roper Scientific, Duluth, GA) à partir d'un microscope à fluorescence (AxioImager, Zeiss) avec un objectif x5 afin de couvrir l'ensemble de la membrane. Le nombre de cellules sur la membrane est déterminé à l'aide du logiciel ImageJ (développé au National Institute of Health, Etats Unis) grâce à un module de comptage des noyaux développé au sein du laboratoire par le Dr Jérôme Cutrona.

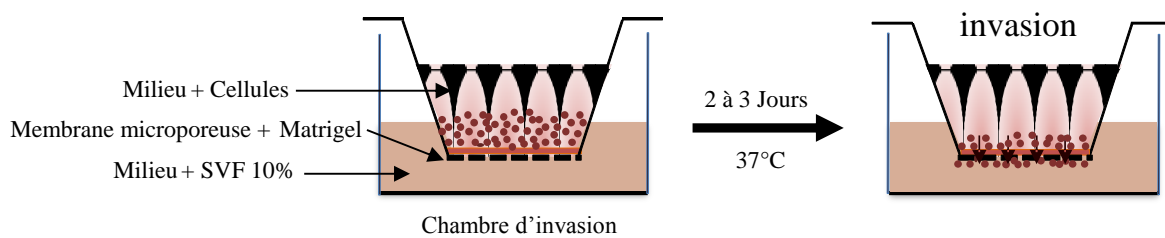


Figure 32: Schéma du système d'invasion en chambre de Boyden

IV-4 Caractérisation des cellules tumorales

Une tumeur est composée de différents types cellulaires : cellules épithéliales normales, cellules tumorales, cellules mésenchymateuses... Afin de s'assurer du type cellulaire utilisé dans l'étude d'invasion cellulaire en chambre de Boyden, Les cellules fraîchement isolées ainsi que les cellules présentes sur les faces supérieure et inférieure des membranes de la chambre de Boyden sont caractérisées par immunocytochimie ou par des techniques cytochimiques (coloration de Papanicolaou et coloration de Feulgen).

Les cellules fraîchement isolées sont cytocentrifugées à la densité de 2×10^4 cellules/lame (600 rpm, 10 min) sur des lames de microscopie SuperFrost à l'aide d'une centrifugeuse Cytospin 2 (Thermo-Shandon). Les lames sont soit conservées à -20°C (immunohistochimie), soit fixées avec le formol à 10% (30 min à température ambiante, coloration de Papanicolaou) ou soit avec un spray fixateur (coloration de Feulgen) (Merckofix, Merck KGaA, Germany).

Matériel et méthodes

Pour chaque expérience d'invasion en chambre de Boyden, une plaque de 12 puits est systématiquement réservée pour caractériser les cellules ayant adhéré sur les membranes (face supérieure) et celles qui sont passées à travers les membranes (face inférieure).

IV-4.1 Immunocytochimie

Afin de déterminer le type cellulaire utilisé en chambre de Boyden, différents anticorps ont été utilisés : l'anti-cytokératine humaine (Pan-cytokératine), un anticorps monoclonal de souris (clones AE1/AE3, 1/100^{ème}, DAKO) qui reconnaît plusieurs types de cytokératines : le clone AE1 reconnaît les cytokératines de type I « 10, 13, 14, 15, 16 et 19 » et le clone AE3 reconnaît les cytokératines de type II « 1 à 8 » et qui sont utilisés pour détecter les cellules d'origine épithéliales; l'anti-vimentine, un anticorps polyclonal de souris (IgG1 κ ; clone V9, 1/100^{ème}, DAKO), est utilisé pour identifier les cellules mésenchymateuses ou en transition épithélio-mésenchymateuse et l'anti-Ki67, un anticorps monoclonal de souris (IgG1 κ ; clone Mib-1; 5 μ g/mL; DakoCytomation, Trappes, France) pour mettre en évidence les cellules en cycle (en prolifération).

a) Mode opératoire

Les lames avec les cellules cytocentrifugées (cytospins) sont décongelées à température ambiante et sont ensuite fixées dans le méthanol à -20°C durant 10 min et rincées 2 fois avec le PBS. Les membranes des des chambres de Boyden sont décongelées à température ambiante, découpées avec un scalpel et réhydratées dans 60 μ l de PBS durant 5 min. Les étapes de l'immunocytochimie sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Etapes	Réactifs/solutions	Durée
Blocage des sites non spécifiques de reconnaissance des anticorps	PBS-BSA 3%	60 min
Anticorps primaire	PBS-BSA 1%	Toute la nuit à 4°C
Rinçages	PBS-BSA 1% PBS	5 min 2 fois 5 min
Anticorps secondaire/Alexa 488 ou 594	PBS	60 min
Rinçages	PBS	2 fois 5 min
Contre-coloration des noyaux	DAPI	10 min
Rinçage	PBS	2 fois 5 min

Matériel et méthode

IV-4.2 La coloration Papanicolaou

Cette technique de coloration permet de différencier les cellules cancéreuses des cellules normales ou fibroblastiques. La coloration Papanicolaou est effectuée sur les cellules qui ont adhéré sur les membranes des chambres de Boyden et sur celles qui sont passées à travers les pores de membranes, toutes fixées avec le spray fixateur. Le mode opératoire de la coloration est décrit dans le tableau ci-dessous :

Étapes	Durée
Ethanol à 95%	10 passages (de quelques sec)
Ethanol à 80%	10 passages (de quelques sec)
Eau distillée	10 passages (de quelques sec)
Hématoxyline (colore le noyau en bleu-violet)	30 sec
Eau courante	10 passages (de quelques sec)
HCl à 0.25%	1 passage (1 sec)
Ethanol à 95%	20 passages (de quelques sec)
Solution OG6 (colore le cytoplasme des cellules kératinisées en orangé brillant)	2 min
Ethanol à 95%	Plusieurs passages
Solution AE50 (colore le cytoplasme des éosinophiles en rose, parfois rose-rouge ou orangé et le cytoplasme des cyanophiles en bleu parfois verdâtre)	3 min
Ethanol à 95%	Plusieurs passages
Ethanol à 100%	Plusieurs passages
Xylène	2 passages (de quelques sec)

Tableau 8 : Mode opératoire de la coloration Papanicolaou (PPN)

A la fin de la coloration, les membranes des chambres de Boyden sont montées entre lame et lamelle en présence du milieu de montage Eukitt (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA.).

Les lames de cytopspin sont colorées à l'aide d'un appareil automatisé selon le procédé décrit ci-dessus (coloration effectuée au laboratoire Pol Bouin).

Matériel et méthode

IV-4.3 Coloration de Feulgen

Cette méthode de coloration permet de doser l'ADN et de déterminer la ploïdie des cellules tumorales. En présence d'HCl, l'ADN des cellules est hydrolysé et les bases puriques sont détruites, ceci rend accessible les désoxyriboses et permet à la fuschine de colorer les fonctions aldéhydes ainsi découvertes.

La coloration des lames de cytopins et des membranes de transwell fixées au formol 10% est effectuée selon les instructions du kit "ADN-kit de coloration selon Feulgen".

Étapes	Durée
HCl (5M)	50 min
Eau distillée	2 fois 2 min
Réactif de schiff	60 min
Solution de lavage disulfite de sodium	2 fois 3 min
Eau distillée	2 fois 2 min
Ethanol à 50%	1 min
Ethanol à 70%	1 min
Ethanol à 80%	1 min
Ethanol à 100%	1 min
Xylène	1 min

Tableau 9 : Mode opératoire de la coloration Feulgen

Comme pour la coloration Papanicolaou, les membranes sont montées entre lame et lamelle en présence du milieu de montage Eukitt (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA. USA).

La coloration nous permet de voir les noyaux des cellules en rouge violet avec un cytoplasme incolore. La ploïdie des cellules est déterminée en mesurant la densité optique émise des noyaux colorés. Cette densité optique correspond à la quantité d'ADN contenu dans les noyaux cellulaires et à l'aide d'un logiciel de quantification, des histogrammes représentant la ploïdie des cellules analysées sont générés. Pour chaque histogramme un index d'ADN (ID), qui correspond au rapport entre la quantité d'ADN (en G0/G1) des cellules de l'échantillon étudié et la quantité d'ADN (en G0/G1) des cellules références, est déterminé.

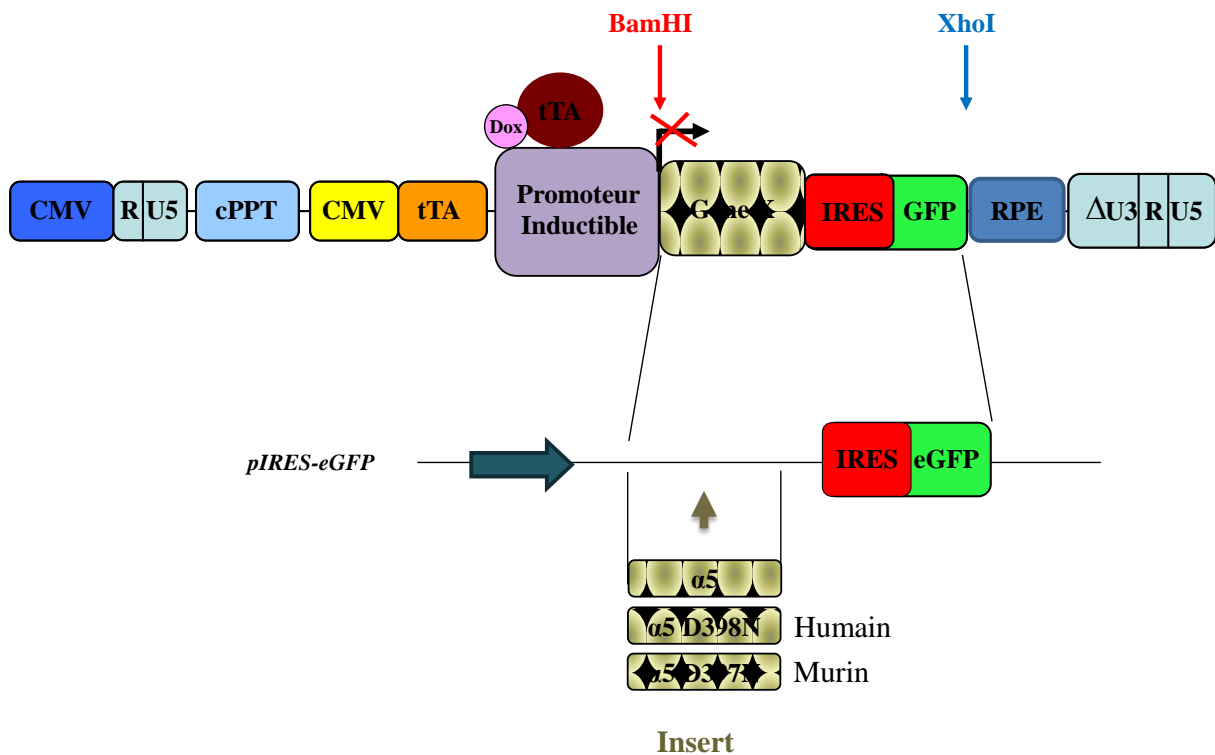


Figure 33: Description du lentivirus pTK431

Le lentivirus pTK431 contient un système tet-off inductible et d'autres régions nécessaires à son intégration dans le génome hôte. **R U5**= promoteur de 5' LTR, **CMV**= Cytomégalovirus promotor, **cPPT**= central polypurine tract, **tTA**= tetracycline-regulated transactivator, **IRES**= Internal ribosome entry site, **WPRE** ou **PRE**= Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, **ΔU3**= délétion de la région U3 du 3' LTR.

Les différents inserts contenant la sous-unité $\alpha 5$ mutée (D398N humain ou D397N murin) ou sauvage sont couplés à la GFP et insérés dans le lentivirus à l'aide des enzymes de restriction BamHI et XhoI en aval d'un promoteur inductible. **Dox**= doxycycline.

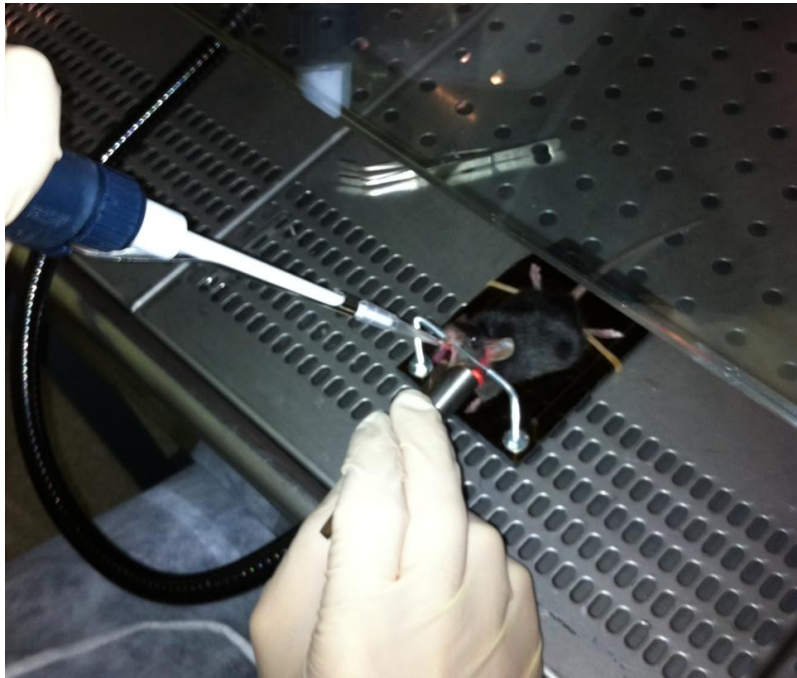
V- Analyse du rôle du polymorphisme des nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ dans la progression tumorale

V-1 La construction des lentivirus

Afin d'étudier l'implication du polymorphisme de la sous-unité $\alpha 5$ (D398N) dans le développement des cancers broncho-pulmonaires, des lentivirus ont été développés dans le groupe d'Uwe Maskos, au sein de l'institut Pasteur (Paris, France). Des constructions contenant la sous-unité $\alpha 5$ sauvage ou mutée (D398N), clonées en amont d'une séquence IRES et du gène codant pour la GFP ont été générées. Ensuite, l'ensemble a été cloné dans le lentivirus pTK431 contenant la machinerie nécessaire à son intégration dans le génome murin et à sa rétrotranscription (**Figure 33**). Le lentivirus pTK431 est un vecteur HIV-1 (Human immunodeficiency virus inactivé qui contient un système tet-off inductible et d'autres régions nécessaires à son intégration dans le génome hôte. Le lentivirus pTK431 est constitué 1) d'une séquence **R U5** (région 5' du promoteur LTR 5'), nécessaire à l'intégration du virus au génome hôte et permet d'initier la rétrotranscription, 2) d'un puissant promoteur, **CMV** (Cytomégalo virus promotor) remplaçant le promoteur de LTR 5', 3) d'une séquence **cPPT** (central polypurine tract) riche en A/G, nécessaire à la synthèse du brin positif de l'ADN durant la rétrotranscription et qui facilite aussi l'import nucléaire du matériel génétique du lentivirus, 4) d'une séquence **tTA** (tetracycline-regulated transactivator) qui permet de réguler de façon inductible l'expression du gène, 5) d'une séquence **IRES** (Internal ribosome entry site) permettant le démarrage de la traduction de l'ARNm, 6) d'une séquence **WPRE** ou **PRE** (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element) qui favorise la stabilité des ARNm et l'expression du gène d'intérêt, 7) d'une région U3 du LTR 3' déléetée, **Δ U3** contenant le promoteur viral, nécessaire pour augmenter la biosécurité. Les vecteurs possédant cette délétion sont appelés vecteurs SIN pour self-inactivating.

Différents inserts contenant la sous-unité $\alpha 5$ muté (D398N humain ou D397N murin) ou sauvage (D398) sont couplés à la GFP et insérés dans le lentivirus à l'aide des enzymes de restriction BamHI et XhoI en aval d'un promoteur inductible, qui est activé par la tTA seule et est inhibé lorsque cette dernière est couplée à la doxycycline. Le lentivirus pTK433 contenant la GFP seule a été utilisé comme contrôle (**Figure 33**)

Infection intratrachéale avec des lentivirus



Instillation intranasale au polidocanol



Figure 34: Infection intratrachéal des souris KO $\alpha 5$ avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 (WT) et $\alpha 5$ -D398N et lésion de l'épithélium trachéal par instillation intranasale au polidocanol.

La régénération de l'épithélium trachéal a été analysée sur des souris sauvages et des souris KO $\alpha 5$ transduites ou non avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 (WT) et $\alpha 5$ -D398N par instillation intratrachéale de 10 μ l de lentivirus. Ces souris sont anesthésiées avec un mélange de kétamine et de xylazine et ensuite 20 μ l de polidocanol à 2% dans du PBS ont été directement instillés dans les narines des souris. Pour analyser la morphologie de l'épithélium trachéal, les souris ont été euthanasiées avant l'instillation mais également de J2 à J11 après l'instillation de polidocanol

Matériel et méthode

V-2 Infection des souris avec les lentivirus

Toutes les expériences et les procédures ont été effectuées en conformité avec la réglementation concernant l'expérimentation animale du Ministère Français de l'Agriculture. Les souris (C57BL/6J) invalidées (Knock-Out, KO) pour la sous-unité $\alpha 5$ et sauvage (Wild-type, WT) ont été fournies par l'Institut Pasteur (Paris, France). Les souris, utilisées dans cette étude étaient âgées de 20 semaines à 30 semaines. Les souris sont dans un premier temps anesthésiées avec un mélange kétamine (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)/xylazine (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), ensuite elles sont placées sur un support permettant d'incliner légèrement leur tête et de mettre en évidence la trachée qui est éclairé à l'aide d'une lumière froide (**Figure 34**). Afin de faciliter l'infection avec les lentivirus, le lysophosphatidyl choline (LPC), produit permettant de fragiliser les membranes en les rendant plus perméables aux lentivirus est ajouté préalablement par voie trachéal (1mg/ml, 20 μl /souris, Sigma). Après 30 min, 10 μl d'une solution de 10^7 lentivirus/ml contenant le gène $\alpha 5$ muté (D397N), ou non muté (WT, D397) ou uniquement la GFP seule (pTK 433) est instillée dans la trachée (**Figure 34**).

V-3 Modèle de régénération in vivo de l'épithélium trachéal de souris

Une desquamation des cellules épithéliales a été induite dans les trachées de souris après une instillation intranasale au polidocanol, un détergent cliniquement utilisé comme un agent sclérosant et pour faciliter le transfert de gènes aux voies aériennes (Parsons DW. And al, 1998 ; Borthwick DW. And al, 2001). Des souris sauvages et des souris KO $\alpha 5$ infectées ou non avec des lentivirus ont été anesthésiées avec un mélange kétamine (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$)/xylazine (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Puis, 20 μL d'une solution à 2% de polidocanol dans du PBS ont été lentement instillés dans les narines de l'animal (**Figure 34**). Les souris ont été ensuite euthanasiées (dose létale de pentobarbital) à J0 (avant le traitement polidocanol) et de J2 à J11 (après lésion). Les trachées ont été ensuite prélevées puis immergées dans de l'OCT, cryofixées dans l'azote liquide et stockées à -80°C pour des analyses histologiques et immunohistochimiques. La morphologie de l'épithélium trachéal a été étudiée sur des coupes tissulaires colorées à l'hématoxyline de Harris. Les coupes ont été réalisées sur l'ensemble de la région proximale de la trachée (soit 1 à 3 mm sous le larynx). Cette expérience a été répétée 3 fois pour chaque type d'analyse.

Matériel et méthode

V-4 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires, d'origine bronchique, utilisées au cours de cette étude proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). La lignée NCI-H1299 provient d'un site métastatique d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (carcinome). Les lignées BEAS-2B et HBE4-E6/E7 sont issues d'un épithélium bronchique sain. La lignée cellulaire BEAS-2B est issue de clones infectés avec l'adénovirus hybride 12-SV40. La lignée cellulaire HBE4-E6/E7 est issue de cellules transformées avec le plasmide codant pour les gènes E6/E7 du papillomavirus humain 16 (HPV-16).

V-5 Conditions de culture

La lignée cellulaire BEAS-2B est cultivée dans du milieu de culture DMEM (Dubelcco's modified Eagle medium, GIBCO-BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) et la lignée NCI-H1299 est cultivée dans du milieu de culture RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO). Les milieux contiennent du GLUTAMAX™ et sont supplémentés avec 10% du sérum de veau fœtal (SVF, GIBCO) décomplémenté, et avec de la pénicilline (100U/mL) (GIBCO) et de la streptomycine (100µg/mL) (GIBCO). Les cellules HBE4-E6/E7 sont cultivées dans du milieu de culture KSFM (Kératinocyte Serum Free Medium, GIBCO) supplémenté avec de l'extrait pituitaire bovin (BPE, 30µg/mL), du facteur de croissance épidermique (EGF) recombinant (0,2ng/mL), de la pénicilline (100U/mL) et de la streptomycine (100µg/mL). Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C. Pour le génotypage des lignées, 2x10⁶ cellules/ml sont centrifugées et conservées à -20°C.

V-6 Culture primaire des cellules respiratoires

Les cellules épithéliales respiratoires de polypes nasaux sont dissociées après une incubation, pendant une nuit à 4°C, dans du milieu RPMI 1640/HEPES 25mM (GIBCO) en présence de la protéase de *Streptomyces griseus* "Pronase E" (1mg/ml) (Sigma Aldrich, Saint Quentin Falavier, France). Les cellules épithéliales sont récupérées après agitation des morceaux de tissus dans du milieu RPMI 1640/HEPES 25mM, et centrifugation à 200g pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans le milieu de prolifération et sont ensemencées dans des plaques de 6 puits (préalablement recouvertes avec du collagène I et IV) à raison de 5x10⁴ cellules/cm² (test de migration) et dans des plaques de 96 puits

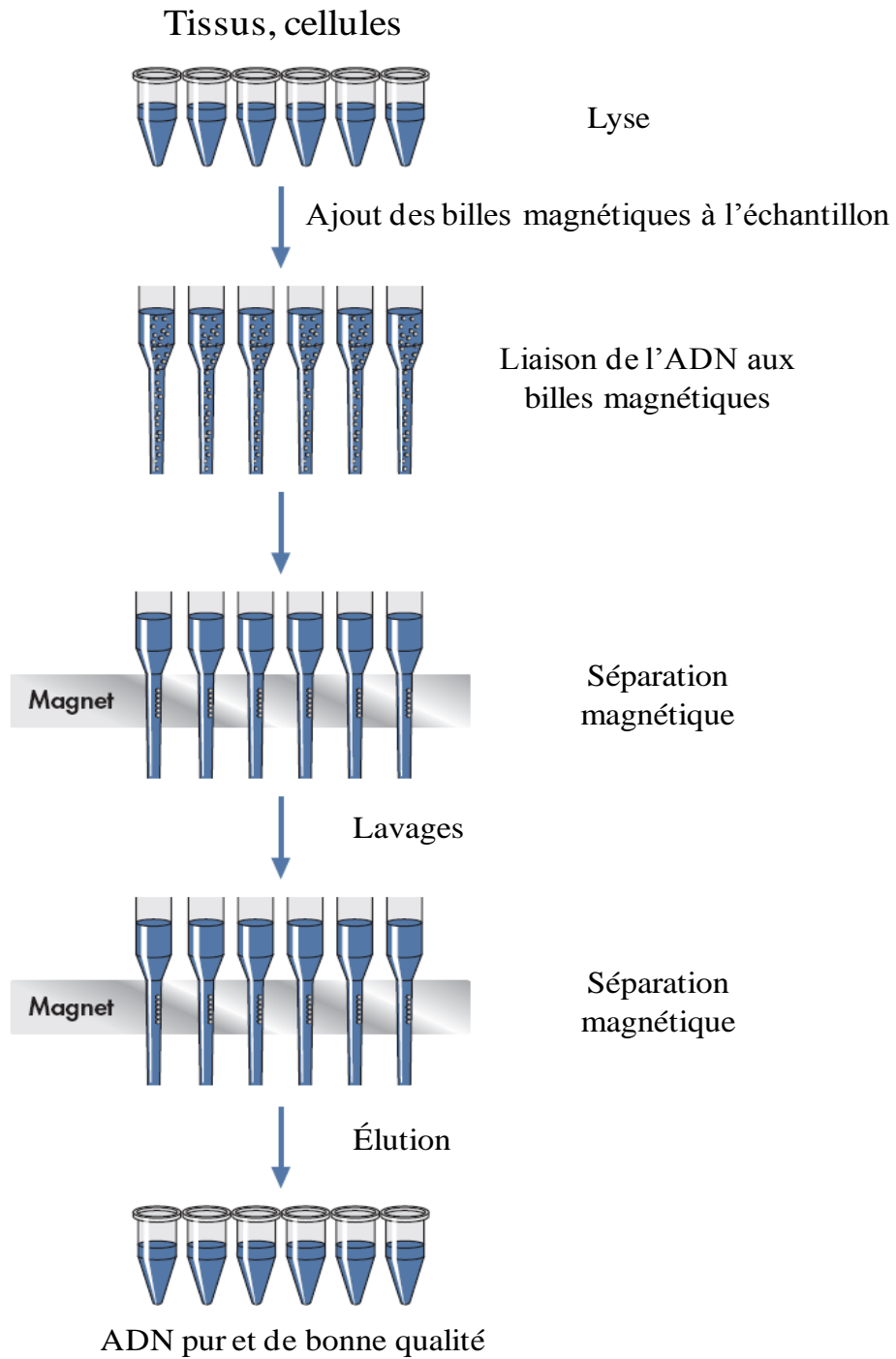


Figure 35: Procédé automatisé d'extraction de l'ADN.

Matériel et méthode

(préalablement recouvertes de collagène I et IV) à raison de 2×10^4 cellules/cm² (test de prolifération). Les mêmes étapes ont été réalisées pour la dissociation des cellules trachéales de souris en utilisant 0,5mg/ml de Pronase E.

V-7 Génotypage du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$

- Extraction de l'ADN à partir des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires (2×10^6) conservées à -20°C sont rapidement décongelées à température ambiante et lysées avec 200µl du tampon G2 fourni dans le kit d'extraction d'ADN « EZ1 DNA Tissue Kit » (QIACard, BioRobot, QIAGEN, GmbH). L'extraction de l'ADN est réalisée de façon automatisée avec l'appareil EZ1 (BioRobot, QIAGEN, S.A) selon les instructions du kit (**Figure 35**).

- Extraction de l'ADN à partir de polypes nasaux et de tissus tumoraux

Le tissu (20 mg) est broyé en présence de 400µl de tampon de lyse G2 fourni dans le kit d'extraction d'ADN « EZ1 DNA Tissue Kit » (QIACard, BioRobot, QIAGEN, GmbH), à l'aide du dissociateur gentleMACS™ (Miltenyi Biotec, MACS, GmbH) pendant 45 sec. Les débris cellulaires non broyés sont centrifugés (1400g, 1 min) puis 190 µl de surnagent (broyat cellulaire) sont incubés toute la nuit à 56°C avec la protéinase k (10µl). L'extraction de l'ADN est réalisée avec le kit « EZ1 DNA Tissue Kit » (QIACard, BioRobot, QIAGEN, GmbH), le procédé d'extraction est automatisé et est effectué avec l'appareil EZ1 (BioRobot, QIAGEN, S.A) selon les instructions du fournisseur (**Figure 35**).

Le dosage de l'ADN est réalisé par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific). L'ADN est dilué dans de l'eau pour réaliser des solutions de 50 ng/µl. Des aliquots de 250 ng sont ensuite préparés et utilisés pour la réaction de PCR.

La PCR a été réalisée en utilisant le kit TaKaRa (R001A) (TAKARA Bio inc, Japon), le gène codant pour la sous-unité nicotinique $\alpha 5$ est amplifié à l'aide de l'ADN polymérase TaKaRa LA Taq™ en présence d'amorces spécifiques (tableau ci-dessous). La réaction de polymérisation en chaîne est effectuée selon le programme suivant : 3 min à 95°C ; (45 sec à 94°C, 45 sec à 62°C, 45 sec à 72°C) x 35 ; 5 min à 72°C.

Matériel et méthode

Gène		Séquence des amorces	Amplicon (pb)
CHRNA5	S	CGC CTT TGG TCC GCA AGA TA	435
	AS	TGC TGA TGG GGG AAG TGG AG	

Tableau 10 : Séquences des amorces et taille de l’amplicon du gène CHRNA5

Afin de déterminer le génotype du gène CHRNA5, 10µl de produit d’amplification sont digérés avec l’enzyme Taq1 (10U, 1µl) (*Thermus aquaticus* YT-1), reconnaissant la séquence suivante : 5'...T↓C G A...3', 3'...A G C↑T...5') en présence du tampon de digestion de l’enzyme (10X buffer Taq1, 3µl) (Fermentas LIFE SCIENCES, Thermo Fisher Scientific inc.). La réaction de digestion est effectuée dans un volume final (H₂O) de 30µl, à 65°C durant 2h.

Pour la révélation des produits de digestion enzymatique, un volume arbitraire de 15µl du mélange réactionnel est mélangé avec du tampon de charge (eau, 25g de Ficoll400, 0,25g de bleu de bromophénol, NaOH ; Sigma) concentré 5X et l’ensemble est séparé en gel d’agarose 2% (Promega, USA) en présence de bromure d’éthidium (Invitrogen) durant 20 min à 100V. L’image des gels est obtenue à l’aide d’une caméra CCD refroidie à -25°C (LAS-1000, Fuji, Stamford, CT) et analysée à l’aide du logiciel Aïda (Raytest, Courbevoie, France).

V-8 Analyse de la migration cellulaire

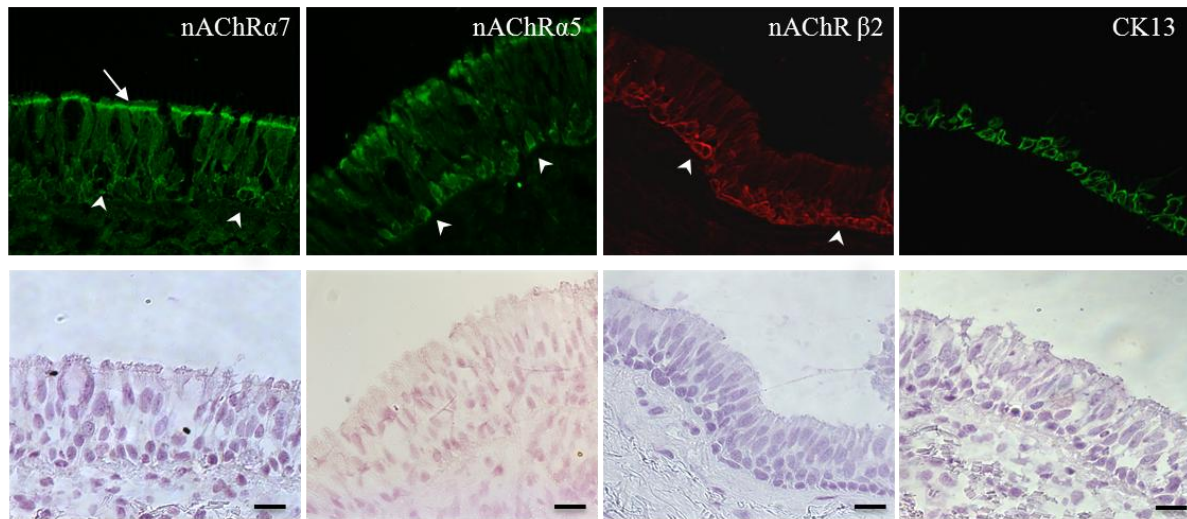
Les lignées cellulaires (8×10^4 cellules/cm²), les cellules de polypes nasaux et les cellules trachéales de souris (5×10^4 cellules/cm²) sontensemencés dans des plaques de 6 puits et à confluence, une lésion est effectuée à l’aide d’un cône de pipette de 200 µl. Des images en contraste de phase du front de migration sont enregistrées par l’intermédiaire d’un dispositif de microscopie inversée (Axiovert 200, Zeiss, Oberkochen, Germany) équipée d’une caméra CCD (Coolsnap, Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ) et d’une chambre de conditionnement (Incubator XL-3, Pecon, Erbach, Germany) (5% de CO₂, 37°C) avec un objectif x5, toutes les 10 minutes pendant 24h (lignées cellulaires et polypes) ou 48h (cellules trachéales de souris). Les images sont analysées à l’aide du logiciel ImageJ ; la surface de la lésion est mesurée à T_{0h} et à T_{fermeture}, ensuite la vitesse de migration est calculée selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Surface à T}_{0\text{h}} \text{ (mm}^2\text{)} - \text{Surface à T}_{\text{fermeture}} \text{ (mm}^2\text{)}}{\text{Temps de fermeture (h)}} \text{ mm}^2/\text{h}$$

VI- Analyses statistiques

Les paramètres mesurés selon les différentes techniques et selon les différentes conditions expérimentales ont été analysés à l'aide de tests paramétriques de Student (test T apparié et non apparié) ou non paramétriques (test de Wilcoxon, de Friedman et de Mann et Whitney) en fonction du nombre d'échantillons analysés et des variables comparées. Une probabilité d'erreur inférieure à 5 % ($p < 0,05$) a été considérée comme révélatrice d'une différence significative. Les niveaux de probabilité sont schématisés de la manière suivante : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$.

(A)



(B)

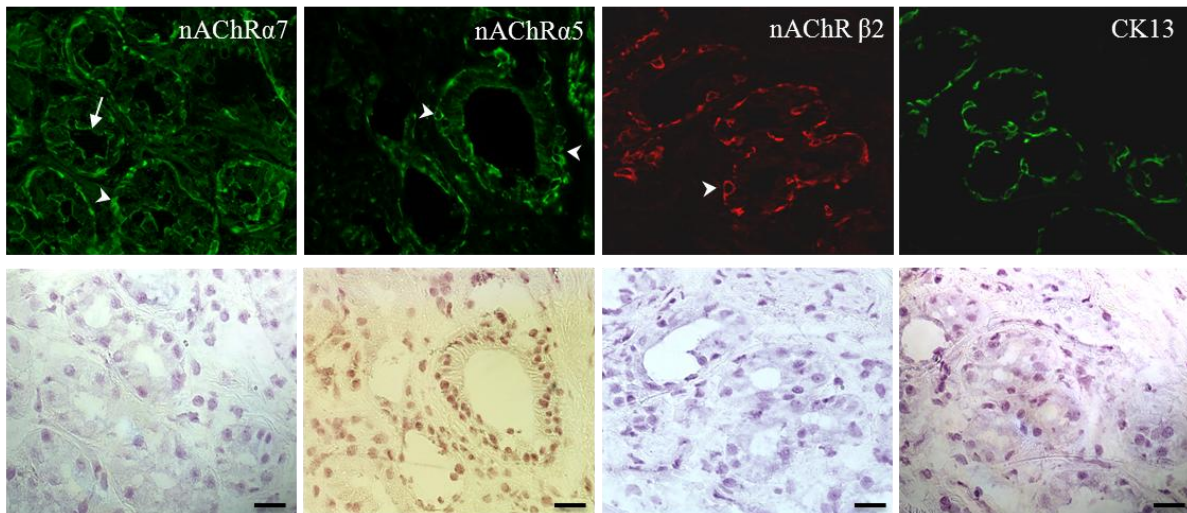


Figure 36: Expression des sous-unités nicotiques α 7, α 5 et β 2 dans l'épithélium bronchique de surface et dans les glandes de la sous-muqueuse bronchique.

La sous-unité α 7 (anticorps H-302), la sous-unité α 5 (anticorps ab41173) et la sous-unité β 2 (anticorps C-20) ont été détectées par immunohistochimie dans des tissus bronchiques humains de structure normale (pseudostratifiée). (A) Au niveau de l'épithélium de surface, le *nAChRs* α 7 est exprimé au pôle apical (flèche) et dans les cellules basales (têtes de flèches) de l'épithélium de surface et le *nAChR* α 3 α 5 β 2 (représenté par les sous-unités α 5 et β 2) est principalement exprimé par les cellules basales de l'épithélium de surface (têtes de flèches), caractérisées par la présence de la cytokératine 13 (CK13). (B) Au niveau des glandes sous-muqueuses, le *nAChRs* α 7 est exprimé au pôle apical (flèche) et dans les cellules basales (tête de flèche) des glandes sous-muqueuses. Le *nAChR* α 3 α 5 β 2 est principalement exprimé par les cellules basales des glandes sous-muqueuses (têtes de flèches); caractérisées par la présence de la cytokératine 13 (CK13). La sous-unité α 5 est également retrouvée dans les régions apicales des deux types d'épithélium (de surface et glandulaire). Pour chaque immunofluorescence, une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée. La barre d'échelle est de 11 μ m.

RESULTATS

A- Implication des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la progression des cancers pulmonaires non à petites cellules

I- Expression des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans les tissus bronchiques humain sains et tumoraux

I-1 Expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les tissus bronchiques humains normaux

Les récepteurs nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ ont été localisés *in vivo* par des techniques d'immunohistochimie sur des coupes à froid de tissus bronchiques humains prélevés à distance des tumeurs (14 patients). Le récepteur nAChRs $\alpha 7$ est détecté par la sous-unité $\alpha 7$ et le nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ par les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$. Les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ ont été décrites précédemment par notre laboratoire comme formant un complexe ($\alpha 3\alpha 5\beta 2$) (par des études d'immunoprécipitation) dans l'épithélium respiratoire (Tournier *et al.* 2006). Lors de cette étude, le laboratoire avait à sa disposition trois anticorps reconnaissant spécifiquement les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 2$. Cependant, pour notre étude, l'anticorps spécifique de la sous-unité $\alpha 3$ n'étant plus commercialisé, nous n'avons pu utiliser que les anticorps spécifiques des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ pour la localisation du nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$.

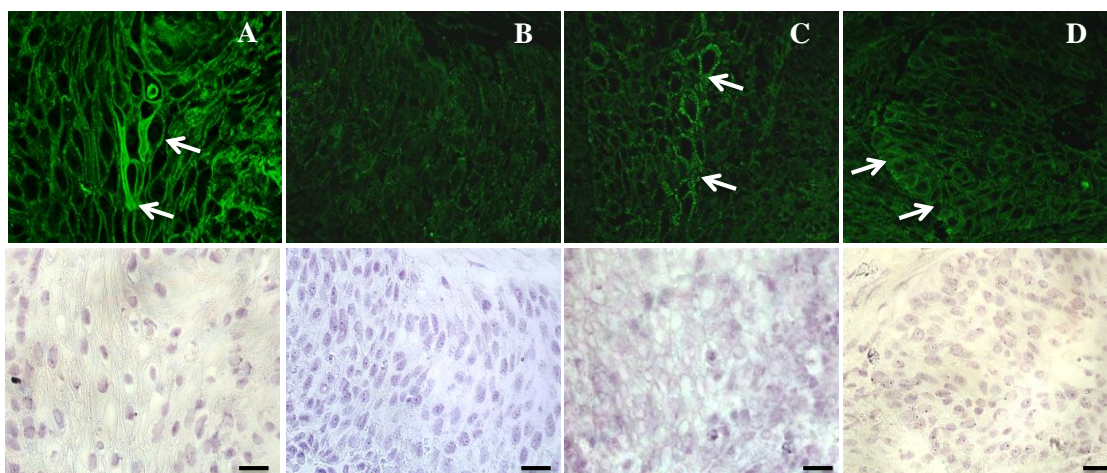
Nous montrons qu'au niveau de l'épithélium de surface, la sous-unité $\alpha 7$ est exprimée par les cellules basales et les cellules ciliées (région apicale) et que la sous-unité $\beta 2$ est exprimée uniquement par les cellules basales. La sous-unité $\alpha 5$ est également exprimée par les cellules basales mais elle est aussi retrouvée au niveau des régions apicales des cellules ciliées (**Figure 36 A**).

Au niveau des glandes sous-muqueuses nous montrons que les nAChRs $\alpha 7$ sont localisés au pôle apical et au niveau des cellules basales des glandes sous-muqueuses, alors que les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ sont majoritairement exprimées par les cellules basales des glandes (**Figure 36 B**). La sous-unité $\alpha 5$ est également retrouvée au niveau du pôle apical des glandes sous-muqueuses.

Carcinomes épidermoïdes

Bien différenciés

Peu différenciés



Adénocarcinomes

Bien différenciés

Peu différenciés

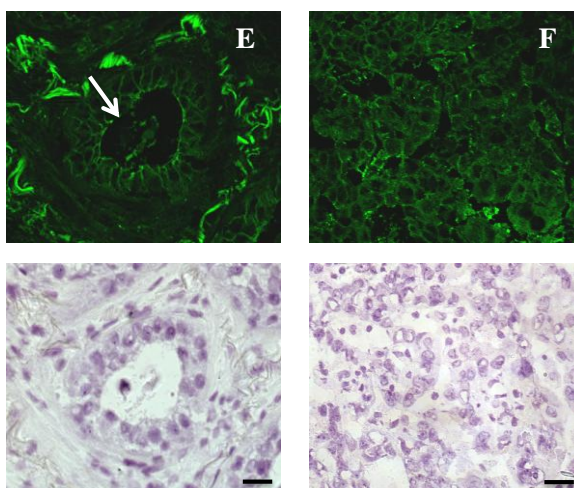


Figure 37: Expression de la sous-unité $\alpha 7$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.

La sous-unité $\alpha 7$ (anticorps H-302) a été détectée par immunohistochimie dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes bien ou peu différenciés. Le *nAChR $\alpha 7$* est exprimé par les cellules différenciés situées au centre des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes bien différenciés et au pôle apical des structures glandulaires des adénocarcinomes bien différenciés (A et E, flèches). Dans les carcinomes épidermoïdes et les adénocarcinomes peu différenciés (B et F) l'expression de *nAChR $\alpha 7$* est diminuée. Cependant, on le retrouve exprimé d'une façon sporadique par les cellules tumorales situées au centre (C) ou au niveau des fronts d'invasion (D) des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes peu différenciés. Pour chaque immunofluorescence, une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée. La barre d'échelle est de 11 μm .

I-2 Expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules

Les récepteurs nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ ont été localisés *in vivo* par des techniques d'immunohistochimie sur des coupes à froid de tissus tumoraux issus de patients atteints de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes. 28 carcinomes épidermoïdes (10 bien différenciés et 18 peu différenciés) et 29 adénocarcinomes (16 bien différenciés et 13 peu différenciés) ont été analysés et nous montrons que l'expression des sous-unités $\alpha 7$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ varie selon le type et le stade de différenciation des tumeurs.

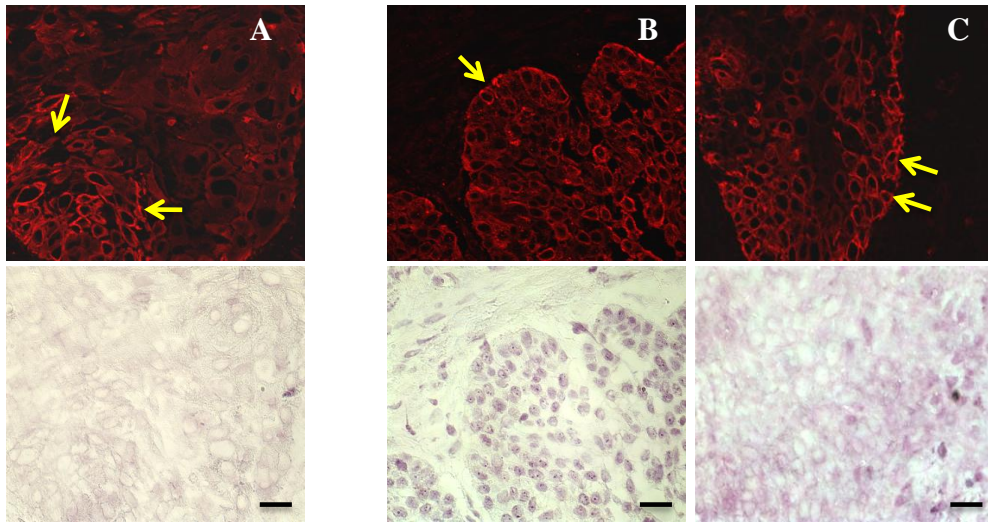
La sous-unité $\alpha 7$ (nAChR $\alpha 7$), est majoritairement exprimée par les cellules tumorales différenciées situées, d'une part, au centre des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes bien différenciés (**Figure 37 A**) et d'autre part, au sein des adénocarcinomes bien différenciés (**Figure 37 E**). Dans les tumeurs peu différenciées (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes) nous observons une forte diminution de l'expression du nAChR $\alpha 7$ (**Figure 37 B et F**). Cependant, dans les carcinomes peu différenciés, l'expression du nAChRs $\alpha 7$ peut être observée, dans 66% des cas, dans les cellules différenciées situées au centre des massifs tumoraux (**Figure 37 C**), et dans 34% des cas, en périphérie aux fronts d'invasion des massifs tumoraux (**Figure 37 D**).

Pour la localisation des nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, nous avons dans un premier temps effectué un criblage de l'expression des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ sur 4 carcinomes épidermoïdes (2 bien et 2 peu différenciée) et 4 adénocarcinomes (2 bien et 2 peu différenciée). Nous montrons que, lorsqu'on effectue un double marquage des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$, on observe une colocalisation des deux sous-unités aux fronts d'invasion des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes (bien et peu différenciés) et des adénocarcinomes bien différenciés (**Figure 39**). Ce résultat suggère que les sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ peuvent former un complexe dans les cancers broncho-pulmonaires. Cependant, ces résultats n'ont pas été confirmés par des techniques d'immunoprécipitation comme cela avait été fait dans le tissu bronchique normal (Tournier *et al.* 2006).

Carcinomes épidermoïdes

Bien différenciés

Peu différenciés



Adénocarcinomes

Bien différenciés

Peu différenciés

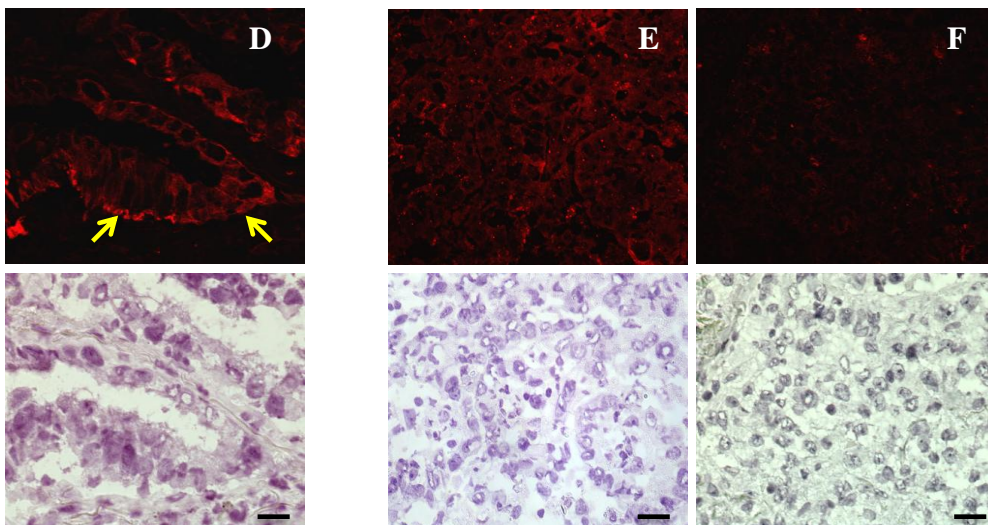
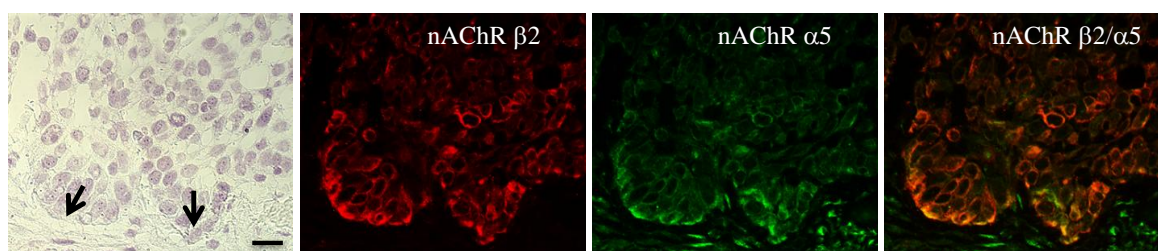


Figure 38: Expression de la sous-unité $\beta 2$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.

La sous-unité $\beta 2$ (anticorps C-20) a été détectée par immunohistochimie dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de carcinomes épidermoïdes (bien ou peu différenciés) et d'adénocarcinomes (bien ou peu différenciés). Le *nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$* est exprimé par les cellules tumorales situées aux fronts d'invasion des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes et des adénocarcinomes bien différenciés (A et D) ou dans les carcinomes épidermoïdes peu différenciés (B et C). Dans les adénocarcinomes peu différenciés, le *nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$* est faiblement exprimé (E) ou absent (F). Pour chaque immunofluorescence, une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée. La barre d'échelle est de 11 μm .

Carcinomes épidermoïdes peu différenciés



Adénocarcinomes bien différenciés

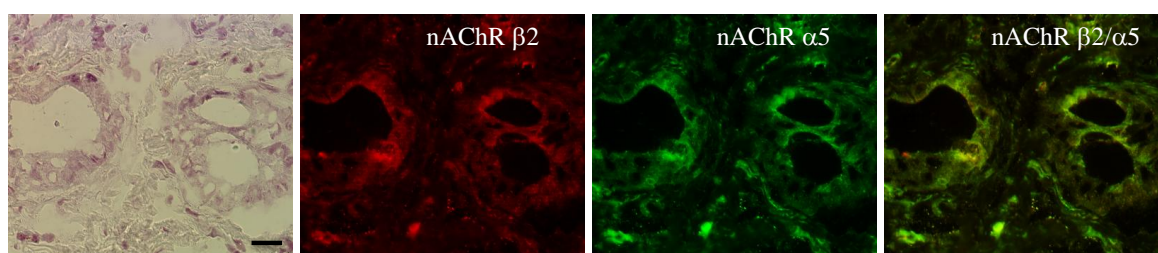


Figure 39: Localisation des sous-unités $\alpha 5$ et $\beta 2$ dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

La sous-unité $\alpha 5$ (anticorps ab41173) et la sous-unité $\beta 2$ (anticorps C-20) ont été détectées par immunohistochimie dans des tissus tumoraux issus de patients atteints de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes. Le double marquage $\alpha 5/\beta 2$ montre une colocalisation de ses deux sous-unités au front d'invasion des carcinomes épidermoïdes peu différenciés et des adénocarcinomes bien différenciés. Pour chaque immunofluorescence, une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée. La barre d'échelle est de 11 μm .

Afin d'analyser l'expression des nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ sur un nombre plus important d'échantillons, nous avons choisi d'utiliser uniquement la sous-unité $\beta 2$ pour représenter la localisation du récepteur. Nous montrons que le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ est majoritairement exprimé au niveau des fronts d'invasion des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes (bien et peu différenciés (**Figure 38 A, B et C**)) et des adénocarcinomes bien différenciés (**Figure 38 A**), cependant nous avons observé une forte diminution, voire une absence totale de l'expression de nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans les adénocarcinomes peu différenciés (**Figure 38 E et F**).

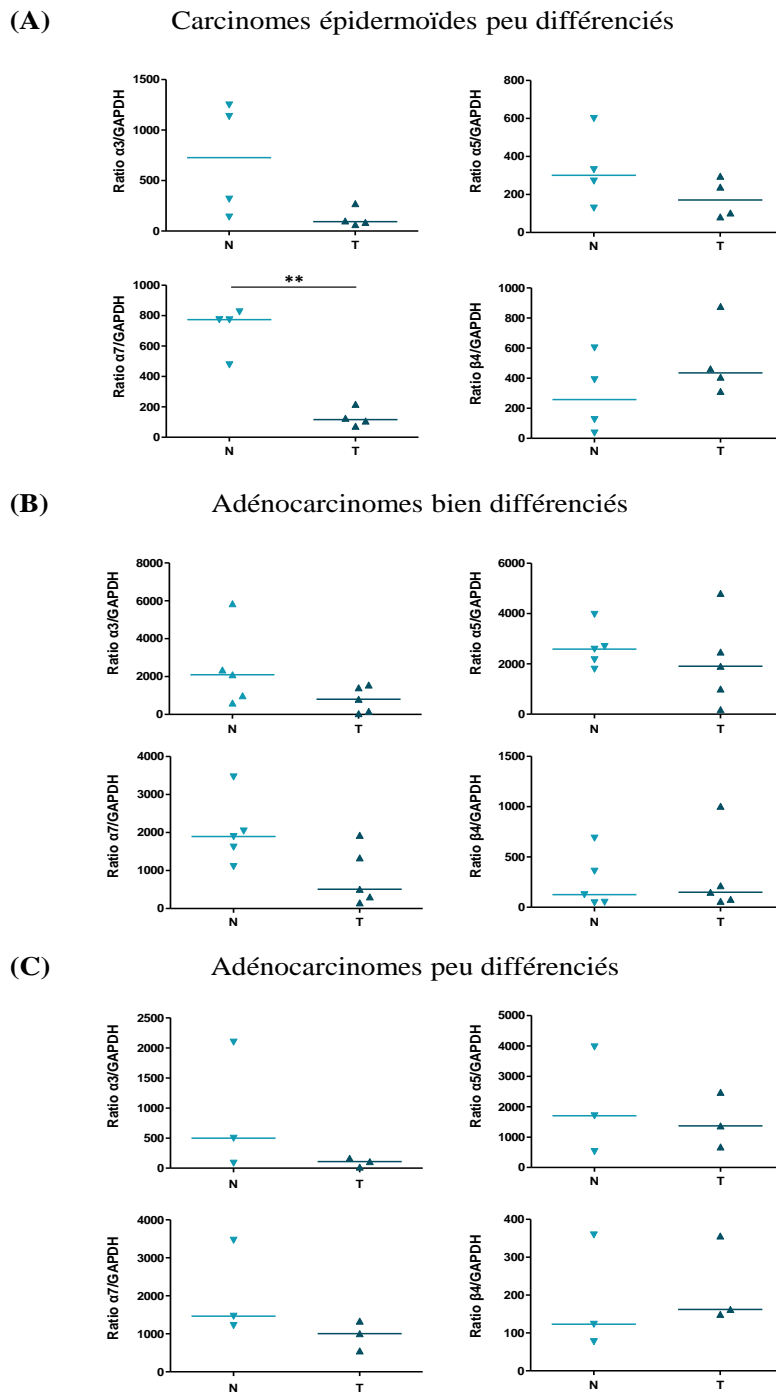


Figure 40: Étude de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules

L'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ a été analysée par RT-PCR dans tissu tumoral (T) et comparée au tissu normal (N) issu du même patient. Aucune différence significative de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, et $\beta 4$ n'a été observée entre le tissu sain et tumoral (carcinomes épidermoïdes peu différenciés (A) et adénocarcinomes bien (B) et peu différenciés (C)), à l'exception de la sous-unité $\alpha 7$ dont l'expression diminue significativement dans les carcinomes épidermoïdes (A). Les résultats sont présentés sous forme de ratio (densité de pixel sous-unité/densité de pixel GAPDH). **: $p < 0,01$, test de Wilcoxon.

Résultats

L'ensemble de ces résultats suggère donc que l'expression des nAChRs $\alpha 7$ dans les cancers pulmonaires non à petites cellules dépend de l'état de différenciation des cellules tumorales et que l'expression de nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ est en relation avec les propriétés invasives des cellules tumorales. La présence de nAChR $\alpha 7$ dans certains cas aux fronts d'invasion suggère un lien éventuel de ce récepteur avec l'invasion cellulaire.

I-3 Analyse par RT-PCR de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ et $\beta 4$ dans les tissus bronchiques normaux et tumoraux

Sur les tissus utilisés pour l'étude de la localisation *in vivo* des nAChRs, une extraction d'ARN total a été effectuée et une RT-PCR a été réalisée afin d'analyser la variation de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ et $\beta 4$ entre le tissu normal et le tissu tumoral et également en fonction du stade de différenciation des tumeurs. L'absence de tissu normal correspondant à certaines tumeurs analysées en immunohistochimie, n'a pas permis de comparer l'expression des sous-unités nicotiques dans certaines tumeurs par rapport au tissu sain. Ceci a réduit le nombre d'échantillons analysés à 8 carcinomes épidermoïdes (4 bien et 4 peu différenciés) et 14 adénocarcinomes (9 bien et 5 peu différenciés)

Lorsque l'on compare les tissus bronchiques sains aux tissus tumoraux des carcinomes épidermoïdes peu différenciés (**Figure 40 A**) et adénocarcinomes bien ou peu différenciés (**Figure 40 B et C**), nous n'observons aucune différence significative dans l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\beta 4$ entre le tissu sain et le tissu tumoral. La sous-unité $\alpha 7$ est la seule sous-unité dont l'expression est diminuée de façon significative dans les carcinomes épidermoïdes peu différenciés par rapport au tissu sain (**Figure 40 A**).

Au cours de cette étude, nous n'avons pas pu amplifier systématiquement la sous-unité $\beta 2$, ainsi, nous avons choisi de ne pas l'inclure dans les résultats présentés dans cette partie.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ en fonction du stade de différenciation des tumeurs. Nous montrons que quel que soit le type de tumeurs (carcinomes épidermoïdes ou adénocarcinomes), il n'y a pas de différence significative dans l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ entre les cancers bien différenciés et les cancers peu différenciés (**Figure 41**).

Carcinomes épidermoïdes

Adénocarcinomes

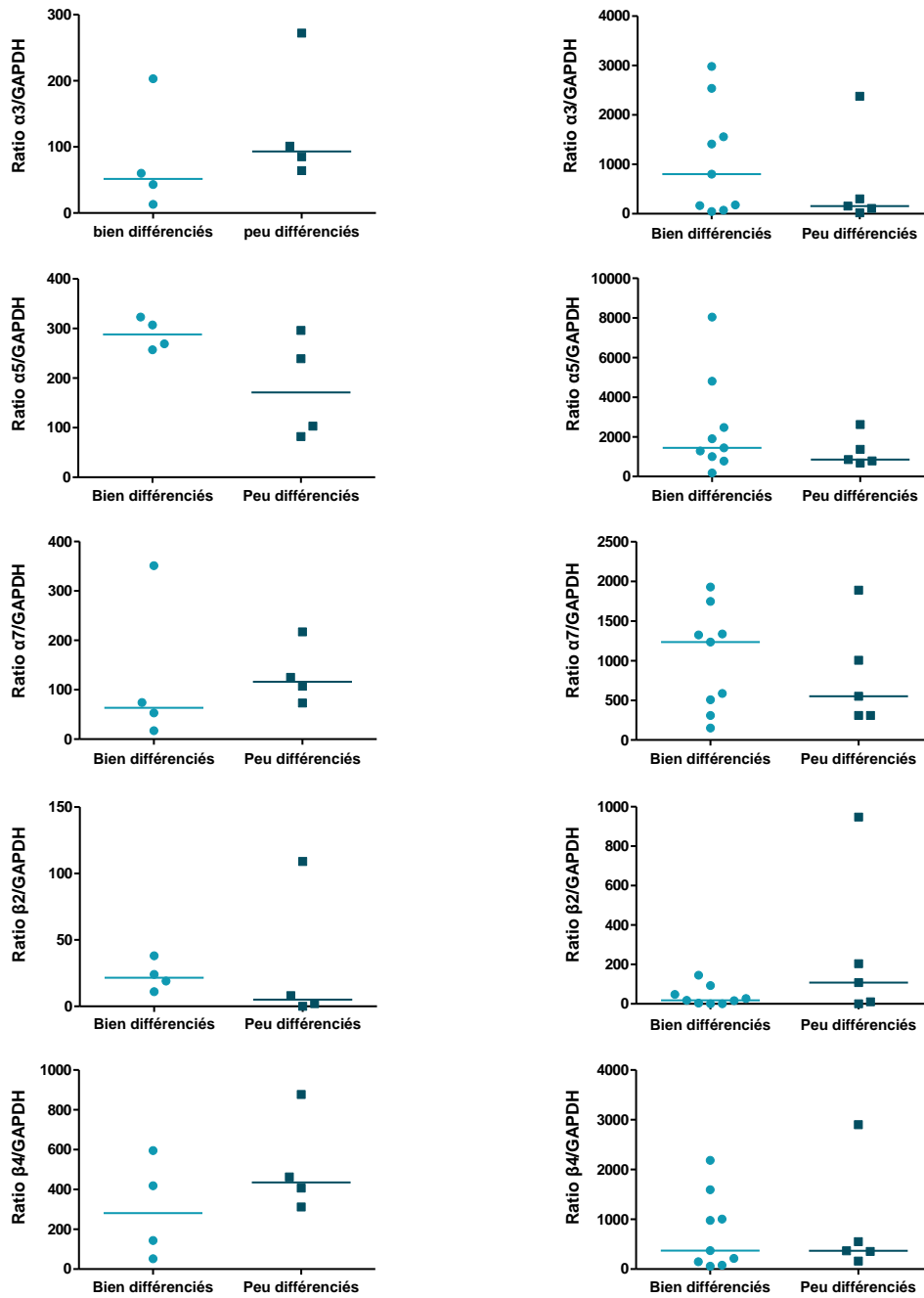


Figure 41: Étude de l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ en fonction du stade de différenciation des tumeurs.

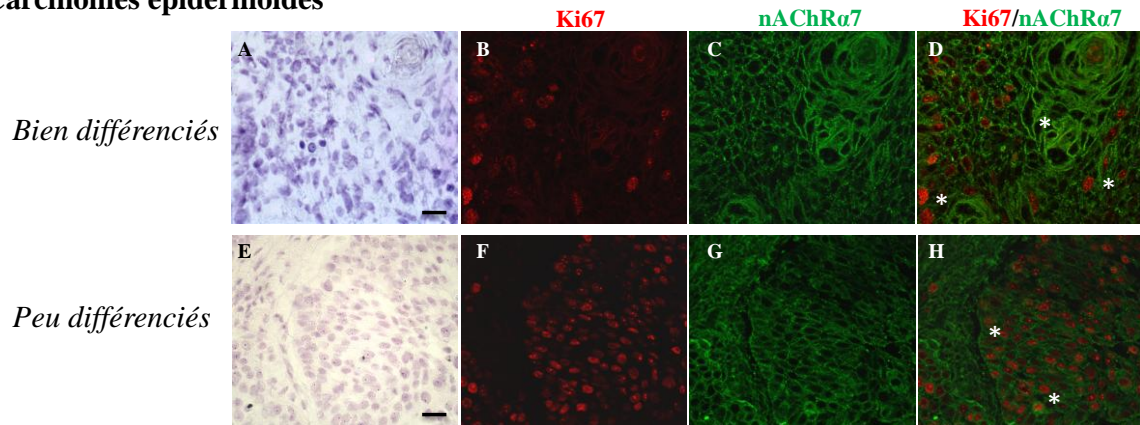
L'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ a été analysée par RT-PCR et comparée en fonction du stade de différenciation des tumeurs. Aucune différence significative d'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ n'a été observée entre les tumeurs bien différenciés et peu différenciés. Test de Mann Whitney

Résultats

En résumé, les études de RT-PCR montrent qu'il n'y a pas de différences significatives dans l'expression des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ entre les tissus sains et les tissus tumoraux, à l'exception de la sous-unité $\alpha 7$ dont les transcrits sont diminués dans les carcinomes épidermoïdes peu différenciés. Ces études montrent également qu'il n'y a pas de différence significative dans la régulation transcriptionnelle des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 4$ entre les tumeurs bien et peu différenciées et cela dans les deux types de cancers broncho-pulmonaires (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes).

En conclusion, les études de RT-PCR ne permettant pas de tirer de conclusion concernant la différence du taux des transcrits des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ et $\beta 4$ entre le tissu normal et tumoral mais aussi entre les tumeurs bien et peu différenciées. L'étude *in vivo* de la localisation par immunohistochimie des protéines codant pour les sous-unités $\alpha 5$, $\alpha 7$ et $\beta 2$ est la seule qui nous permet de montrer des différences de localisation des récepteurs nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, localisations qui diffèrent en fonction du stade de différenciation des tumeurs, nous suggérant que ces nAChRs jouent un rôle dans la progression tumorale.

Carcinomes épidermoïdes



Adénocarcinomes

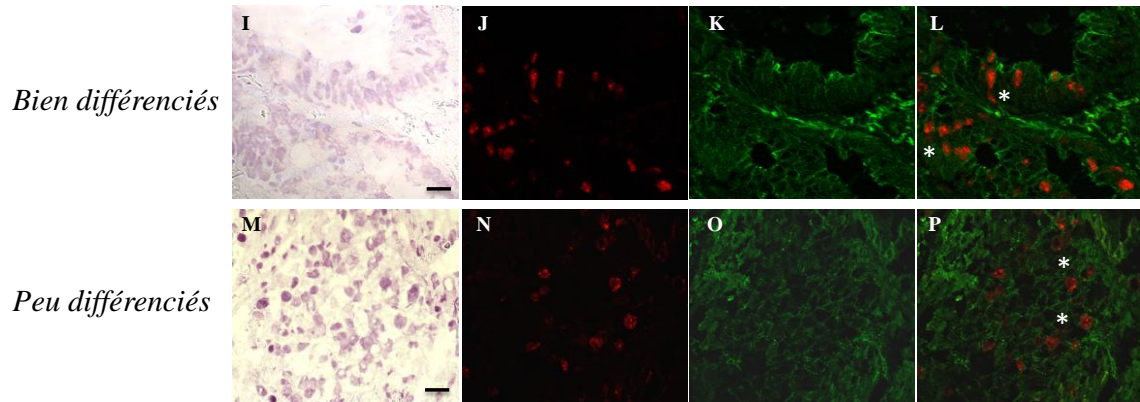


Figure 42: Localisation par double marquage du nAChR α 7 et du Ki67 dans les cancers bronchiques non à petites cellules.

Le Ki67 (anticorps MIB-1) (**B, F, J et N**) et la sous-unité α 7 (anticorps H-302) (**C, G, K et O**) ont été détectés par immunohistochimie dans des tissus tumoraux de carcinomes épidermoïdes (bien et peu différenciés) et d'adénocarcinomes (bien et peu différenciés). La majorité des cellules tumorales des cancers bien différenciés exprimant **fortement** nAChR α 7 ont un **faible** pouvoir prolifératif (expression de Ki67 faible) (**D et L**). Inversement, les cellules tumorales exprimant **faiblement** le nAChR α 7 ont un **fort** pouvoir prolifératif (expression de Ki67 élevée) (**D, H, L et P**, étoiles). Pour chaque immunofluorescence, une contre-coloration à l'hématoxyline de Harris a été réalisée (**A, E, I et M**). La barre d'échelle est de 11 μ m

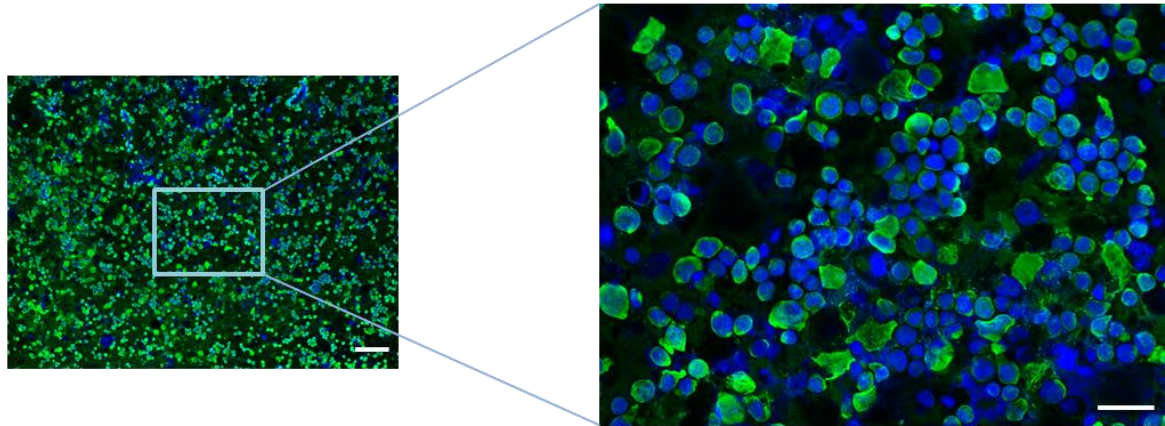
Résultats

Plusieurs données bibliographiques rapportent l'implication du récepteur nAChR $\alpha 7$ dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales, c'est pourquoi nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude par immunohistochimie de la relation entre l'expression de nAChR $\alpha 7$ et l'expression du Ki67, marqueur de prolifération cellulaire. Cette étude révèle que la majorité des cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes bien différenciés exprimant fortement le nAChR $\alpha 7$ montrent une faible prolifération (**Figure 42 D et L**). Dans la majorité des tumeurs analysées les cellules tumorales exprimant faiblement le récepteur nAChR $\alpha 7$ montrent un index de prolifération élevé (**Figure 42 D, H, L et P**).

En résumé, cette étude montre que la localisation du nAChR $\alpha 7$ (au centre ou en périphérie des massifs tumoraux) est inversement associée au pouvoir prolifératif des cellules tumorales.

L'ensemble des études d'immunohistochimie effectuées *in vivo* montrent des localisations différentielles des récepteurs nAChR $\alpha 7$ et nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ en fonction du stade de différenciation des tumeurs. Ces études montrent également que les cellules tumorales exprimant fortement le nAChR $\alpha 7$ ont un faible pouvoir prolifératif et inversement, suggérant ainsi un lien entre le pouvoir prolifératif des cellules tumorales et l'expression du nAChR $\alpha 7$. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère l'existence de fonctions différentes des récepteurs nAChR $\alpha 7$ et nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ au cours de la progression tumorale. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'étudier l'implication *in vitro* des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire.

(A) DAPI/ Cytokératines



(B) DAPI/ Vimentine

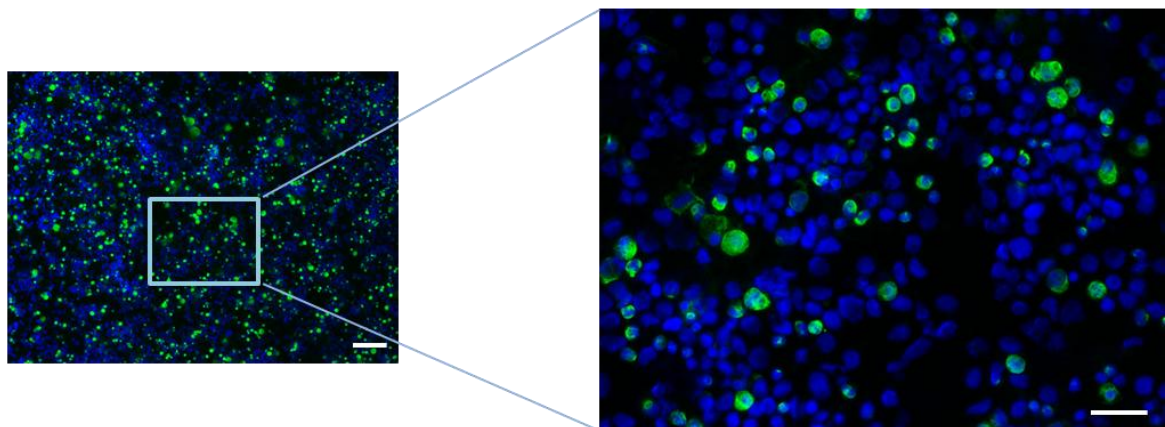


Figure 43: Exemple d'analyse par immunocytochimie de l'expression des cytokératines et de la vimentine des cellules cyto centrifugées (cytopins).

Les cellules tumorales fraîchement isolées ont été caractérisées en analysant l'expression des cytokératines (anticorps Pan-cytokératine) (A) et de la vimentine (B) par immunocytochimie. Les protéines sont révélées avec le fluorochrome Alexa 488 (fluorescence en vert) et les noyaux sont détectés avec du DAPI (bleu). Dans l'exemple montré, 85% des cellules fraîchement isolées sont des cellules épithéliales qui expriment peu de vimentine (environ 5%). La barre d'échelle est de 45 μm à gauche et de 38 μm à droite.

II- Régulation de la prolifération et de l'invasion cellulaire par les nAChR $\alpha 7$ et nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$

L'implication des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la régulation de la prolifération et l'invasion cellulaire a été analysée *in vitro* en utilisant des cultures primaires de cellules isolées, pour chaque patient, à partir du tissu bronchique normal et de la tumeur. Cette approche expérimentale permet de se rapprocher le plus possible des conditions *in vivo* en tenant compte de l'hétérogénéité tumorale, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation de lignées cellulaires dans les travaux décrits dans la littérature.

Pour cette étude, différentes drogues ont été utilisées : la nicotine comme agoniste des nAChRs et différents antagonistes nicotiques comme l' α -bungarotoxine, inhibiteur spécifique des nAChRs $\alpha 7$, l' α -conotoxine MII, inhibiteur spécifique des nAChRs $\alpha 5\beta 2$ et la mécamylamine, inhibiteur spécifique des hétéropentamères de type $\alpha_x\beta_y$.

II-1 Caractérisation des cellules tumorales isolées

Une tumeur est composée de différentes populations cellulaires (cellules tumorales, cellules normales, cellules mésenchymateuses, cellules endothéliales, cellules inflammatoires etc.). Afin de vérifier la nature des cellules isolées et utilisées pour nos études *in vitro*, nous avons effectué plusieurs analyses immunocytochimiques et cytochimiques sur les cellules fraîchement isolées et cytocentrifugées (cytospins).

a) L'immunocytochimie

Nous avons choisi d'utiliser les cytokératines, constituants des filaments intermédiaires, comme marqueurs de cellules épithéliales et la vimentine, comme marqueur de cellules mésenchymateuses et/ou de transition épithélio-mésenchymateuse. Le marquage avec l'anti-Pan-cytokératine (reconnaissant plusieurs types de cytokératines, voir matériel et méthodes) montre que 50% à 85% (en fonction des prélèvements) des cellules fraîchement dissociées sont des cellules épithéliales (exemple **Figure 43**). Lorsqu'on analyse l'expression de la vimentine, on observe que 5% à 25% (variation en fonction des tumeurs) des cellules fraîchement isolées expriment cette protéine (exemple **Figure 43**).

Résultats

b) Colorations de Papanicolaou et de Feulgen

En parallèle à nos études d'immunocytochimie, nous avons caractérisé les cellules tumorales fraîchement dissociées par des techniques cytochimiques qui permettent aux histopathologistes de distinguer les cellules anormales (tumorales) des cellules normales.

La coloration Papanicolaou a montré que les cytospins de cellules fraîchement dissociées sont composés de 70% à 90% de cellules tumorales. 5 principaux critères sont retenus pour identifier les cellules tumorales : 1) l'existence de populations cellulaires de tailles variables (l'anisocytose), 2) la présence éventuelle de cellules volumineuses, 3) le rapport nucléo-cytoplasmique élevé, 4) l'existence de noyaux de tailles inégales (anisocaryose) et 5) l'existence de noyaux hyperchromatiques avec présence de nombreux nucléoles.

Cette coloration nous a confirmé que la majorité des cellules isolées sont des cellules tumorales (**Figure 44**), le reste étant composé majoritairement de cellules inflammatoires.

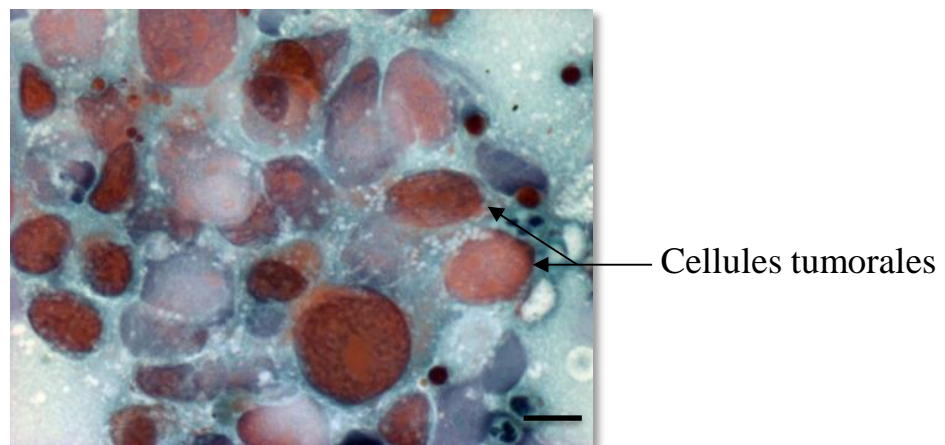
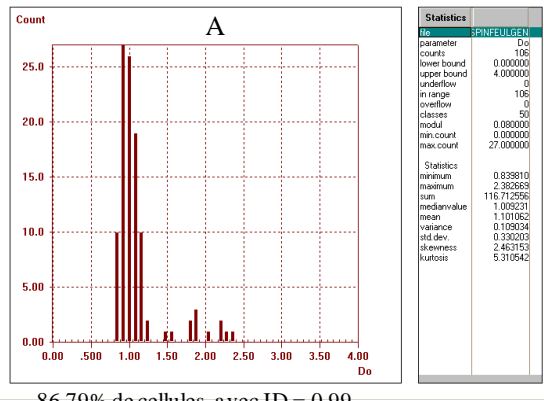
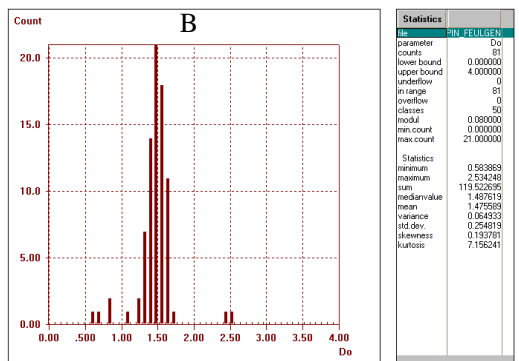


Figure 44: Coloration de Papanicolaou

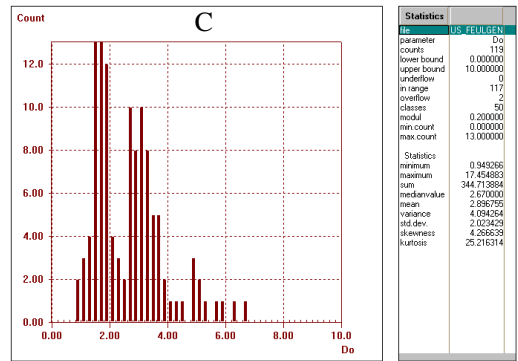
Exemple de coloration Papanicolaou sur des cytospins. Les cellules tumorales (flèches) en orangé ont un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et certaines sont volumineuses. La barre d'échelle est de 10 μm .



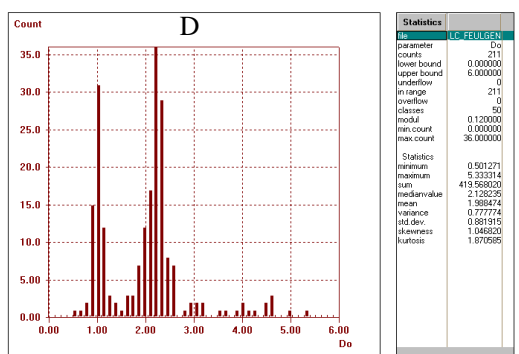
86,79% de cellules avec ID = 0,99



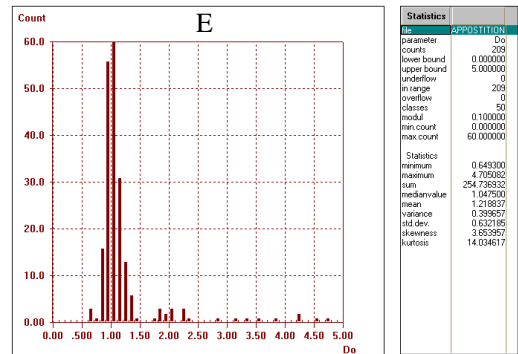
91,36% de cellules avec ID = 1,49
2,47% de cellules avec ID = 2,47



42,02% de cellules avec ID = 1,74
42,86% de cellules avec ID = 3,19
10,92% de cellules avec ID = 6,89



29,38% de cellules avec ID = 0,99
56,40% de cellules avec ID = 2,13
11,85% de cellules avec ID = 3,14



79,90% de cellules avec ID = 1,01
15,79% de cellules avec ID = 1,58
03,35% de cellules avec ID = 3,60

Figure 45: Analyse de la ploïdie des cellules tumorales isolées

Exemples d'histogrammes représentant les différentes ploïdies retrouvées lors de l'analyse des colorations de Feulgen des cytopins. L'abscisse des histogrammes représente la densité optique (DO) des noyaux correspondant à la quantité d'ADN analysée (en pg) et en ordonnée le nombre de noyaux comptés. Les histogrammes sont découpés en plusieurs populations cellulaires, chacune est caractérisée par un index d'ADN (ID) qui correspond au rapport entre la quantité d'ADN (en G0/G1) des cellules de l'échantillon étudié et la quantité d'ADN (en G0/G1) des cellules références. (A) ID proche de 1 (diploïdie), (B) ID compris entre 1 et 1,90 ou supérieur 2 (aneuploïdie), (C) au moins 2 contingents aneuploïdes (multiploïdie), (D) polyploïdie (cellules diploïdes + tétraploïdes + multiples de 2n) et (E) diploïdie avec des contingents de cellules hyperploïdes.

Résultats

La coloration de Feulgen est une autre technique qui permet de caractériser les cellules tumorales en déterminant la ploïdie des cellules. La coloration de Feulgen nous a permis de confirmer les résultats obtenus avec la coloration de Papanicolaou, à savoir une ploïdie anormale des cellules isolées, variant de 70% à 90% (**Figure 46**). Parmi les ploïdies observées, on peut noter: des aneuploïdies, des tétraploïdies, des polyploïdies, des multiploïdies et des diploïdies avec des cellules hyperploïdes (**Figure 45**). Ces résultats confirment que les cellules utilisées in vitro dans les études de prolifération et d'invasion cellulaires sont majoritairement des cellules tumorales.

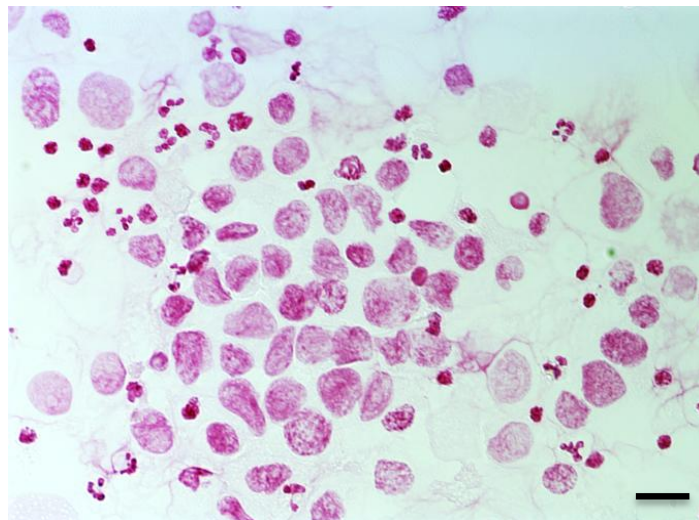
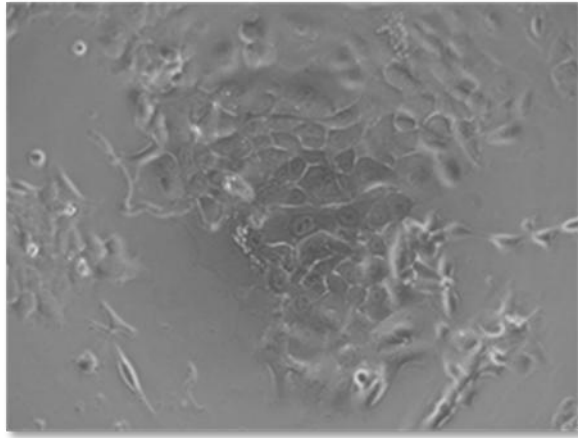


Figure 46: Coloration de Feulgen

Exemple de coloration de Feulgen sur des cytopins. La plupart des noyaux des cellules tumorales colorées en rose/violet sont volumineux. Barre d'échelle 17 μm .

(A) Tissus bronchiques normaux et tumeurs bien différenciées



(B) Tumeurs peu différenciées

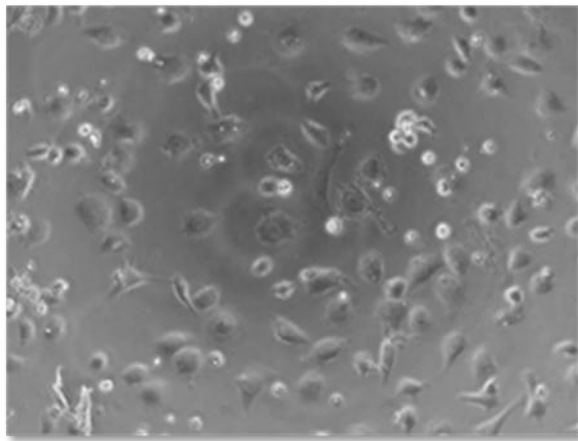


Figure 47: Morphologie des cellules bronchiques normales et des cellules tumorales

Les cellules bronchiques normales ainsi que la plupart des cellules isolées des tumeurs bien différenciées mises en cultures sur des microplaques ont tendance à s'agréger (A) alors que les cellules isolées des tumeurs peu différenciées sont très souvent isolées (B).

Résultats

II-2 Etude *in vitro* de la régulation de la prolifération des cellules bronchiques normales et tumorales par les nAChRs

Les cellules fraîchement dissociées, cellules bronchiques normales et tumorales, ont été cultivées sur microplaques et la prolifération cellulaire a été étudiée en présence de concentrations croissantes de nicotine (10^{-8} à 10^{-4} M), d' α -bungarotoxine (10^{-7} à 10^{-5} M), d' α -conotoxine MII (10^{-8} à 10^{-5} M) et de mécamylamine (10^{-6} à 10^{-4} M).

Alors qu'il nous a toujours été possible d'obtenir des cultures primaires à partir des tissus bronchiques normaux (30/30), nous n'avons pu obtenir des cultures primaires de cellules tumorales que dans 71% des tissus prélevés (27/38 tumeurs). Il semblerait qu'il soit plus difficile de maintenir en culture des cellules tumorales dérivées des tumeurs peu différenciées. En effet, le nombre d'échecs de cultures primaires est de 2/10 pour les adénocarcinomes bien différenciés, 4/10 pour les adénocarcinomes peu différenciés, 1/7 pour les carcinomes épidermoïdes bien différenciés et 4/11 pour les carcinomes épidermoïdes peu différenciés. Pour les 27 tumeurs pour lesquelles nous avons pu obtenir des cellules en cultures primaires, la cohésion des cellules en culture était en étroite relation avec le degré de différenciation globale des tissus tumoraux *in vivo* : les cellules isolées des tumeurs histologiquement bien différenciées étaient assez cohésives alors que les cellules isolées des tumeurs peu différenciées étaient très souvent isolées en culture (**Figure 47**).

Concernant la prolifération des cellules dérivées du tissu bronchique normal (n=30), nous avons observé les résultats suivants :

- 1) la nicotine à de faibles concentrations n'induit un effet significatif qu'à 10^{-6} M (diminution de 7% de la prolifération). A de fortes concentrations, l'effet de la nicotine s'inverse et augmente significativement la prolifération cellulaire (de +12% à 10^{-5} M à +34% à 10^{-4} M),
- 2) le traitement avec l' α -conotoxine MII et la mécamylamine à faibles concentrations a peu d'effet sur la prolifération cellulaire, alors qu'à de fortes concentrations on observe une diminution significative de la prolifération cellulaire, de 13% avec 10^{-5} M d' α -conotoxine MII et de 6% à 19% avec la mécamylamine (10^{-5} M à 10^{-4} M),
- 3) l' α -bungarotoxine, contrairement aux autres drogues est la seule qui stimule très fortement la prolifération cellulaire avec un effet maximum à 10^{-5} M (plus de 111% d'augmentation).

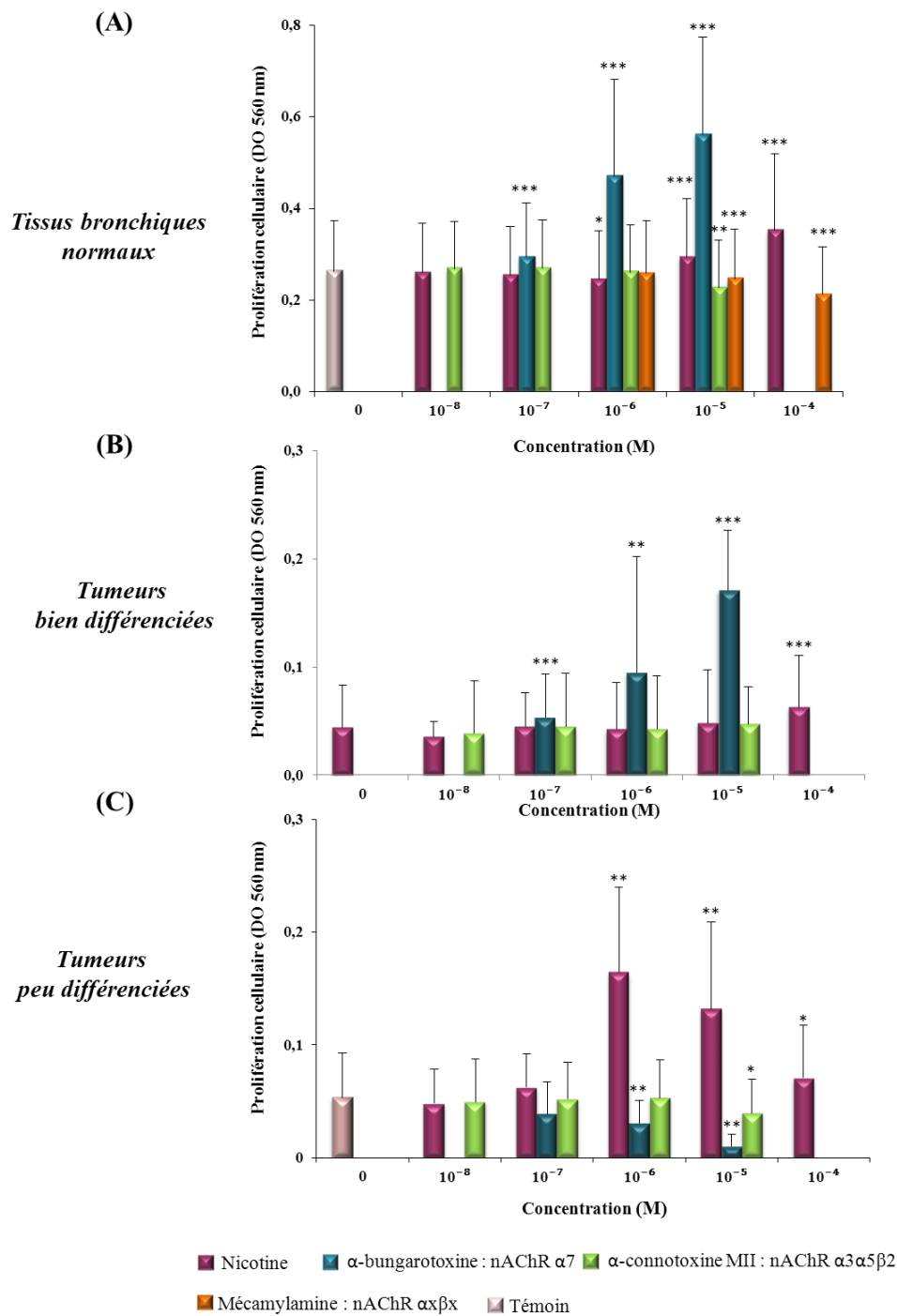


Figure 48: Étude *in vitro* de la régulation de la prolifération des cellules bronchiques normales et tumorales par les nAChRs

La prolifération des cellules bronchiques normales (n=30, test t apparié) (A), des cellules tumorales issues de tumeurs bien différenciées (n=15, test Wilcoxon) (B) et peu différenciées (n=12, test Wilcoxon) (C) a été analysée *in vitro* en présence de concentrations croissantes de nicotine (10⁻⁸ à 10⁻⁴ M), d'α-bungarotoxine MII (10⁻⁷ à 10⁻⁵ M), d'α-conotoxine (10⁻⁸ à 10⁻⁵ M) et de mécamylamine (cellules bronchiques normales uniquement) (10⁻⁶ à 10⁻⁴ M). L'effet des drogues a été comparé de façon appariée au témoin (cellules non traitées). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes (DO_{560nm}) ± écart-type : * : p<0,05 ; ** : p<0,01 ; *** : p<0,001.

Résultats

De ces résultats, nous pouvons conclure que la prolifération des cellules respiratoires normales 1) est régulée négativement par le nAChR $\alpha 7$, 2) dépend partiellement de l'activité fonctionnelle des hétéropentamères de type $\alpha \beta \gamma$ et particulièrement des nAChRs $\alpha 5 \beta 2$, et 3) est régulé différemment selon la concentration de nicotine : à de faibles concentrations, la nicotine inhibe la prolifération et à de fortes concentrations elle stimule la prolifération des cellules bronchiques normales (**Figure 48 A**).

Concernant la prolifération des cellules dérivées des tumeurs (n=27), la nicotine et les antagonistes nicotiniques agissent différemment en fonction du stade de différenciation de la tumeur à partir de laquelle les cellules ont été isolées.

Le traitement des cellules dérivées de tumeurs bien différenciées (6 carcinomes épidermoïdes et 9 adénocarcinomes) avec la nicotine et les antagonistes nicotiniques (α -bungarotoxine et α -conotoxine MII) a des effets similaires à ceux observés sur les tissus normaux. L' α -bungarotoxine induit une augmentation significative et dose dépendante de la prolifération des cellules tumorales (+22% à 10^{-7} M, +117% à 10^{-6} M et +289% à 10^{-5} M) et aucun effet significatif n'a été observé pour l' α -conotoxine MII. Contrairement au tissu normal, la nicotine n'a aucun effet à de faibles concentrations, cependant à de fortes concentrations (10^{-4} M) on observe une augmentation significative de la prolifération (+43%) (**Figure 48 B**). La mécamylamine, n'a pas été utilisée pour cette étude étant donné le nombre limité de cellules tumorales isolées à partir de prélèvements qui étaient de petites tailles.

Lorsqu'on traite les cellules tumorales dérivées des tumeurs peu différenciées (7 carcinomes épidermoïdes et 5 adénocarcinomes) avec les drogues (nicotine, α -bungarotoxine et α -conotoxine MII), nous observons qu'à l'inverse des tumeurs bien différenciées, le traitement avec la nicotine induit une augmentation significative de la prolifération cellulaire et cela à partir de 10^{-6} M (+207% à 10^{-6} M, +146% à 10^{-5} M et + 32% à 10^{-4} M). Nous observons également que les augmentations de la prolifération pour des concentrations en nicotine de 10^{-5} M et 10^{-4} M sont moins importantes par rapport au pic observé à 10^{-6} M de nicotine. Le traitement avec l' α -bungarotoxine induit une diminution significative de la prolifération cellulaire à partir de 10^{-6} M (- 42%) jusqu'à 80% d'inhibition à 10^{-5} M. Suite à cette observation, nous avons exposé simultanément quelques cultures cellulaires, dérivées de tumeurs peu différenciées, à la nicotine (10^{-6} M) et à l' α -bungarotoxine (10^{-6} M). Nous

Résultats

observons que la stimulation de la prolifération cellulaire par la nicotine était moindre en présence de d' α -bungarotoxine, suggérant ainsi que le nAChRs $\alpha 7$ est impliqué dans la stimulation de la prolifération en réponse à la nicotine. L' α -conotoxine MII n'agit qu'à de fortes concentrations (10^{-5} M) en diminuant significativement la prolifération des cellules tumorales (25%) (**Figure 48 C**).

L'ensemble de ces résultats suggère que dans les tissus bronchiques normaux et dans la majorité des tumeurs bien différenciées, le nAChR $\alpha 7$ joue un rôle de répresseur de la prolifération cellulaire et que la nicotine régule différemment la prolifération cellulaire en fonction de sa concentration. A de faibles concentrations, la nicotine inhibe la prolifération des cellules bronchiques normales (-7%) et n'a aucun effet sur les cellules tumorales, dérivant des tumeurs bien différenciées, et à de fortes concentrations (10^{-5} M et 10^{-4} M), elle stimule la prolifération des cellules bronchiques normales ainsi que celle des cellules tumorales isolées des tumeurs bien différenciées. Dans les cultures de cellules isolées des tumeurs peu différenciées, la nicotine stimule la prolifération cellulaire, avec un effet maximal observé pour une concentration en nicotine de 1 μ M, et ceci en agissant sur le nAChR $\alpha 7$. Concernant les nAChRs hétéropentamériques et en particulier le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, ces nAChRs ne participent que de façon limitée à la régulation de la prolifération des cellules bronchiques normales et des cellules tumorales dérivant des tumeurs peu différenciées (effet observé uniquement pour des concentrations élevées en inhibiteurs : 10^{-5} M), alors que dans les tumeurs bien différenciées aucun effet n'a été observé.

II-2.1 Les voies de signalisations impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire

L'étude précédente montre que le récepteur nAChR $\alpha 7$ régule différemment la prolifération cellulaire en fonction du stade de différenciation des tumeurs. Le nAChR $\alpha 7$ stimule la prolifération cellulaire, en réponse à la nicotine, dans les tumeurs peu différenciés alors que dans les tumeurs bien différenciées, il agit comme un répresseur de la prolifération cellulaire, de façon identique à ce qui est observé dans le tissu bronchique normal. Au vu de ces résultats, nous suggérons qu'il existe des différences dans les voies de signalisation activées par le nAChR $\alpha 7$ dans les tumeurs peu différenciées par rapport aux tumeurs bien différenciées.

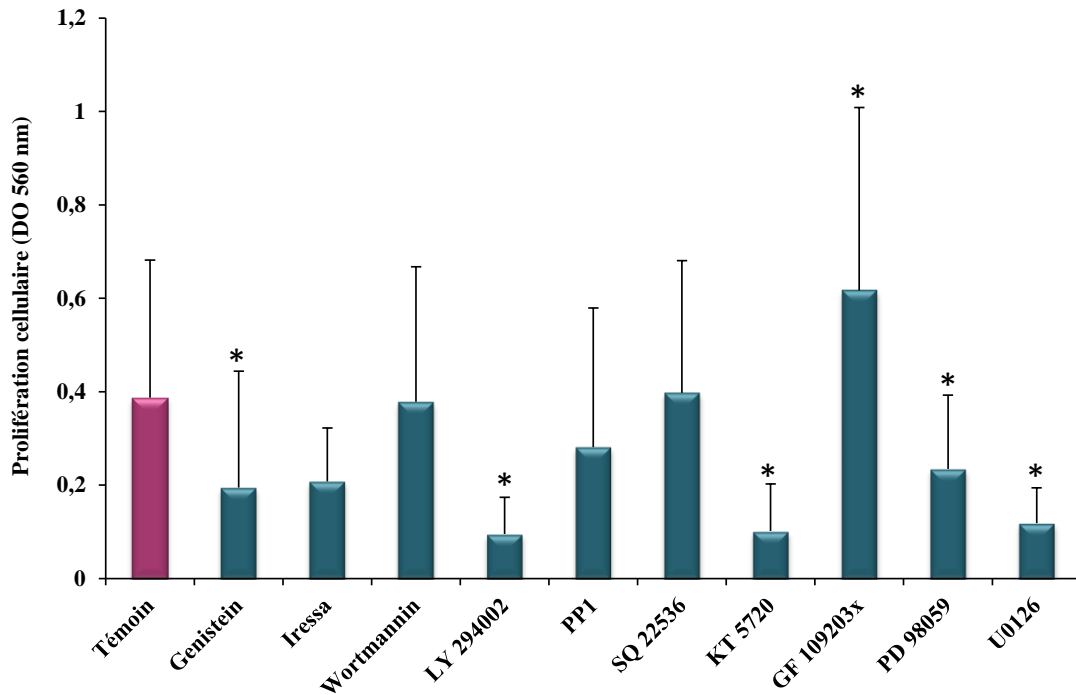


Figure 49: Analyse des voies de signalisations impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules de l'épithélium respiratoire.

La prolifération des cellules respiratoires normales a été analysée sur des cultures primaires de cellules isolées de polypes nasaux (7 patients) en présence de différents inhibiteurs : Genistein (RTK), Iressa (EGFR), Wortmannin (PI3Ks), LY 294002 (PI3K α , β , δ , γ), PP1 (src (p56^{lck} et p59^{FynT})), SQ 22536 (adénylates cyclases), KT 5720 (PKA), GF 109203x (PKC α , β 1, δ , ϵ , ξ), PD 98059 (MEK) et U0126 (MEK1/2). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne (DO_{560nm}) \pm écart-type. * : p<0,05, test de Wilcoxon.

Résultats

Dans la littérature, le nAChR $\alpha 7$ est décrit comme étant impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales en activant de nombreuses voies de signalisation impliquant l'EGFR, la PI3K/Akt, la β -arrestin/SRC (Schuller 2009), la PKC, MEK/ERK (Improgo et al. 2011), les adénylates cyclases et la PKA (Schuller 2009).

Dans une étude préliminaire nous avons choisi de nous intéresser aux voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules respiratoires isolées de polypes nasaux en utilisant des inhibiteurs spécifiques voies de signalisation impliquant : 1) les récepteurs à tyrosine kinase (RTK et EGFR), 2) les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K et PI3K α , β , δ , γ), 3) les tyrosines kinases de la famille src (p56^{lck} et p59^{FynT}), 4) les adénylates cyclases , 5) la protéine kinase A (PKA), 6) la protéine kinase C (les formes α , $\beta 1$, δ , ϵ , ξ) et 7) les MAPKK (MEK et MEK1/2).

Cette étude a été effectuée sur 7 échantillons (polypes nasaux), et nous avons observé une diminution significative de la prolifération cellulaire en présence des inhibiteurs des RTK (Genistein, -50%), des PI3Ks (α , β , δ , γ) (LY 294002, -75%) de la PKA (KT 5720, -74%), des MEK (PD 98059, -39%) et de MEK1/MEK2 (U0126, -69%) et une augmentation significative de la prolifération cellulaire en inhibant la PKC (formes α , $\beta 1$, δ , ϵ , ξ) (GF 109203x, +59%). Aucun effet significatif n'a été observé en présence des inhibiteurs de l'EGFR (Iressa), des PI3Ks en général (Wortmannin), des adénylates cyclases (SQ 22536) et de src (p56^{lck} et p59^{FynT}) (PP1) (**Figure 49**).

En résumé, ces résultats montrent que la prolifération des cellules respiratoires (polypes nasaux) est activée par les voies de signalisation impliquant les RTK, PI3K(α , β , δ , γ), PKA, MEK et particulièrement MEK1/2 et elle est inhibée par les voies de signalisation impliquant la PKC (les formes α , $\beta 1$, δ , ϵ , ξ .)

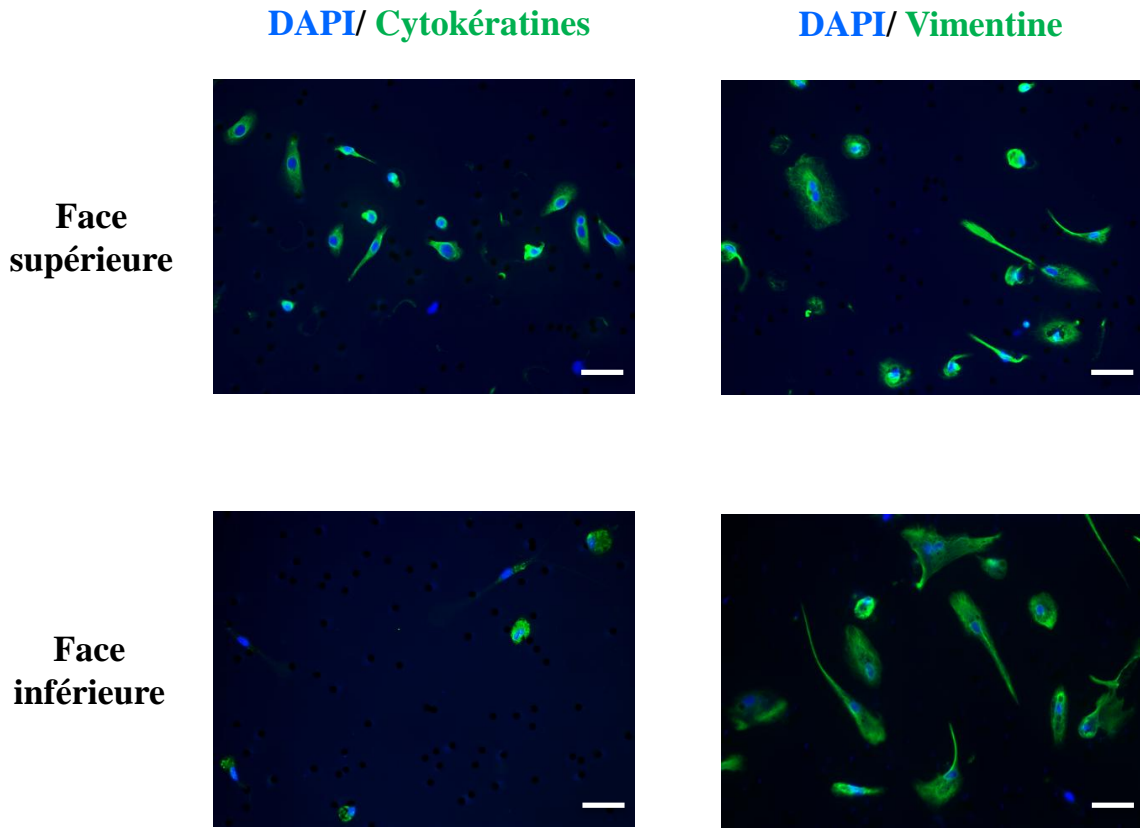


Figure 50: Analyse par immunocytochimie de l'expression des cytokératines et de la vimentine dans les cellules des faces supérieure et inférieure des membranes de chambres de Boyden.

Les cellules de la face supérieure et de la face inférieure des membranes de chambres de Boyden ont été caractérisées par immunocytochimie en analysant l'expression des cytokératines (anticorps Pan-cytokératine) et de la vimentine après 3 jours de culture. Les protéines sont révélés avec le fluorochrome Alexa 488 (fluorescence en vert) et les noyaux sont détectés avec du DAPI (bleu). La barre d'échelle est de 26µm.

II-3 Etude *in vitro* de la régulation de l'invasion des cellules tumorales par les nAChRs

Parmi les processus impliqués dans la progression tumorale, l'invasion cellulaire est un processus clé qui permet aux cellules tumorales d'envahir le stroma tissulaire en dégradant la matrice extracellulaire et de migrer vers la circulation sanguine pour former à distance des métastases. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication des nAChRs dans la régulation de l'invasion des cellules tumorales. Le test d'invasion en chambre de Boyden modifiée a été réalisé sur des cellules tumorales fraîchement dissociées à partir de carcinomes épidermoïdes (9 bien différenciés et 7 peu différenciés) et d'adénocarcinomes (7 bien différenciés et 3 peu différenciés) en présence de concentrations croissantes en nicotine (10^{-8} à 10^{-6} M), α -bungarotoxine (10^{-7} à 10^{-5} M), α -conotoxine MII (10^{-8} à 10^{-6} M) et mécamylamine (10^{-7} à 10^{-5} M).

II-3.1 Caractérisation des cellules de la face supérieure et inférieure des membranes de Boyden

Les cellules de la face supérieure des membranes des chambres de Boyden (cellules adhérentes avant invasion) et les cellules de face inférieure des membranes (cellules infiltrantes) ont été caractérisées après 2 à 3 jours de culture (en fonction de l'adhérence des cellules tumorales) avec les mêmes techniques (immunocytochimiques et cytochimiques) utilisées pour la caractérisation des cellules fraîchement isolées (cytospins).

L'immunomarquage des cytokératines (anti-pan-cytokératine) et de la vimentine (marqueur de cellules mésenchymateuses et/ou de transition épithélio-mésenchymateuse) sur les cellules de la face supérieure des membranes montre que le pourcentage des cellules exprimant les cytokératines varie d'un patient à autre et est compris entre 30% et 65% (par rapport au nombre total de cellules comptées). Le pourcentage des cellules exprimant la vimentine est un peu plus élevé par rapport à celles qui sont positives pour les cytokératines, il varie également d'un patient à un autre et est compris entre 55% et 90% (**Figure 50**).

Concernant la face inférieure des membranes, pour la plupart des cultures primaires réalisées, la technique d'immunocytochimie a engendré la perte de nombreuses cellules. Le pourcentage de cellules exprimant les cytokératines varie entre 26% à 75% alors que, le pourcentage des cellules exprimant la vimentine reste toujours élevé et varie entre 40% et 90% (**Figure 50**).

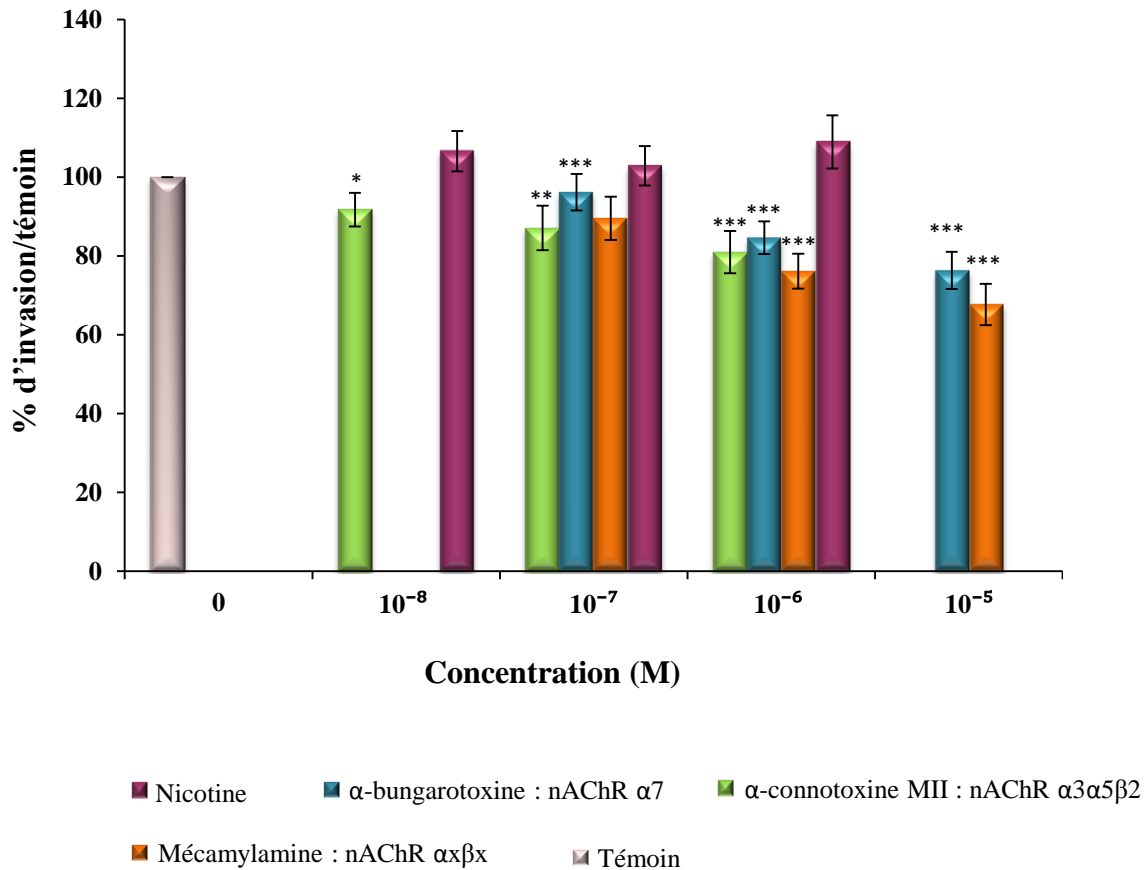


Figure 51: Etude de l'invasion des cellules tumorales dérivées des carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes, bien et peu différenciés.

L'implication des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la régulation de l'invasion des cellules tumorales isolées de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes (n=26) a été analysée en présence de concentrations croissantes de nicotine (10^{-8} à 10^{-6} M), d' α -bungarotoxine (10^{-7} à 10^{-5} M), d' α -conotoxine MII (10^{-8} à 10^{-6} M) et de mécamylamine (10^{-7} à 10^{-5} M). L'effet des drogues a été comparé de façon appariée aux témoins (cellules non traitées). Les résultats sont rapportés sous forme de moyennes \pm erreur standard et exprimés en pourcentages des valeurs des cultures témoins. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$; test de Wilcoxon.

Résultats

Ces résultats suggèrent que, pendant le processus d'invasion, les cellules tumorales perdent en partie leurs caractéristiques épithéliales et elles acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses.

Des colorations de Papanicolaou et de Feulgen ont également été effectuées sur les cellules des faces supérieures et inférieures des membranes de Boyden. Nous avons observé, par ces deux colorations, que le pourcentage de cellules tumorales ayant adhéré sur les membranes varie de 70% à 90%. Cependant, les conditions des deux types de coloration, principalement les lavages en milieu acide au cours de la coloration Papanicolaou et surtout au cours de la coloration de Feulgen, ont conduit à une perte de la majorité des cellules présentes sur les membranes.

II-3.2 Analyse en chambres de Boyden de l'invasion des cellules tumorales

Le traitement des cellules tumorales issues de carcinomes épidermoïdes (9 bien différenciées et 7 peu différenciés) et d'adénocarcinomes (7 bien différenciées et 3 peu différenciés) avec l' α -conotoxine MII, la mécamylamine et l' α -bungarotoxine induit une diminution significative de l'invasion cellulaire et cela de façon dose dépendante. L'effet de l' α -conotoxine MII (10^{-8} M) et de l' α -bungarotoxine (10^{-7} M) est significatif à faibles doses, alors que la mécamylamine ne diminue l'invasion qu'à des concentrations supérieures à 10^{-6} M. A l'inverse des autres drogues, l'effet de la nicotine est très variable selon les cultures étudiées : la nicotine pouvant inhiber ou au contraire stimuler l'invasion cellulaire. Cependant, lorsque l'on considère l'ensemble des cultures étudiées, la nicotine a tendance à augmenter l'invasion des cellules tumorales (d'une façon non significative) (**Figure 51**). Ces résultats ont été observés dans l'ensemble des tumeurs étudiées (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes) mais aucune différence significative n'a été observée selon le degré de différenciation des tissus tumoraux, contrairement à ce que nous avons observé à propos de la régulation de la prolifération des cellules tumorales par les nAChRs.

En résumé, cette étude nous a permis de montrer que les nAChRs hétéropentamériques en particulier les nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ et nAChRs $\alpha 7$ sont impliqués dans la régulation de l'invasion des cellules tumorales pulmonaires.

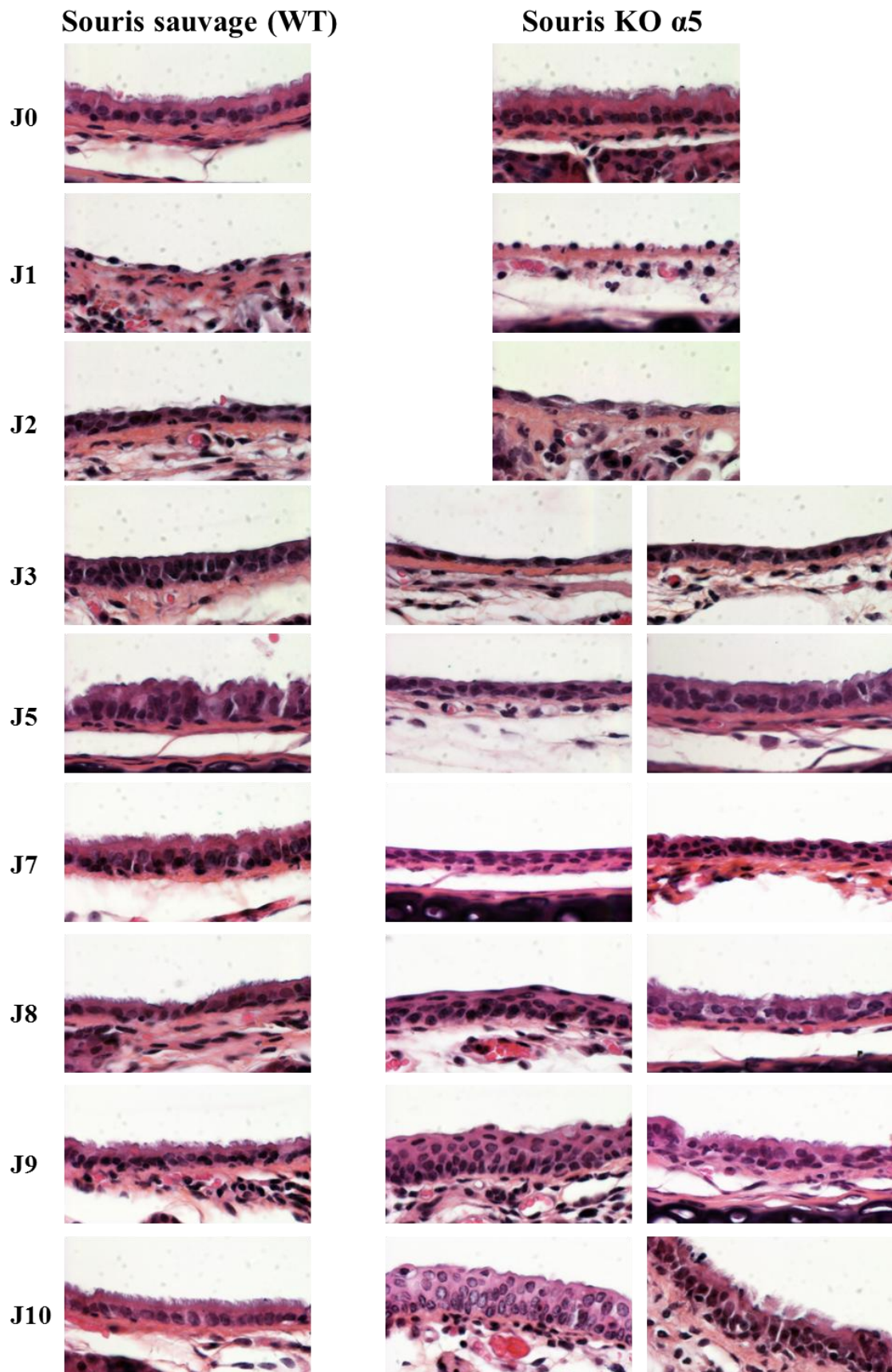


Figure 52: Régénération de l'épithélium trachéal de souris contrôles (WT) et KO $\alpha 5$.

B- Etude de l'implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ dans le développement des cancers broncho-pulmonaires

I- Etude *in vivo* de la régénération de l'épithélium trachéal des souris KO $\alpha 5$

Nous avons montré que les nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ sont impliqués dans la régulation de l'invasion des cellules tumorales et, à un degré moindre, dans la régulation de la prolifération des cellules respiratoires normales. Le gène codant pour la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs présente différents types de polymorphismes nucléotidiques, en particulier le polymorphisme rs16969968 qui se traduit par le remplacement de l'acide aspartique (D) par l'asparagine (N) en position 398 (**D398N**). Ce polymorphisme est étroitement lié à l'incidence des cancers broncho-pulmonaires, cependant les mécanismes par lesquels ce polymorphisme est associé à ces cancers n'est pas connu.

Nous avons analysé, dans un premier temps le rôle de la sous-unité $\alpha 5$ en étudiant la régénération de l'épithélium trachéal des souris invalidées pour la sous-unité $\alpha 5$ (KO $\alpha 5$). Pour cela, nous avons effectué une lésion au polidocanol de la trachée de souris KO $\alpha 5$ et comparé la régénération de l'épithélium trachéal de ces souris à celle des souris sauvages (contrôles) durant 10 jours. Maouche et al (2009) ont précédemment montré que, dans ce modèle de lésion/régénération, l'épithélium trachéal des souris contrôles est capable de régénérer en 7 jours environ.

Nous montrons que la trachée de souris contrôles (WT) régénère normalement sur une période d'environ 1 semaine. Deux jours après la lésion (J2), l'épithélium est constitué de cellules aplaties, témoins d'une métaplasie malpighienne transitoire. Dès J3, on observe l'apparition de cellules cylindriques et à partir du 5^{ème} jour, les premières cellules ciliées apparaissent. Après 8 à 10 jours de régénération, l'épithélium est normal et pseudostratifié (**Figure 52**, colonne de gauche). Pour ce qui concerne la régénération de l'épithélium trachéal des souris KO $\alpha 5$, nous avons toujours observé, sur les quatre séries de souris analysées, des régénérations caractérisées par des anomalies variables selon les séries analysées : deux cas extrêmes de régénération sont rapportés dans la figure 52. Dans le meilleur des cas, nous observons un allongement, de J2 à J8, de l'étape transitoire de métaplasie malpighienne, les cellules cylindriques ainsi que les premières cellules ciliées n'apparaissant qu'à partir du 8^{ème}

Résultats

jour de régénération. Dix jours après la lésion, l'épithélium a encore une hauteur importante et est caractérisé par une hyperplasie des cellules basales (**Figure 52**, colonne de droite). Dans les cas les plus extrêmes, le passage des cellules aplaties puis cuboïdales à des cellules cylindriques puis différenciées, ne se fait jamais. Dès J3, la régénération de l'épithélium évolue progressivement vers une métaplasie malpighienne. Après 10 jours de régénération, on observe un épithélium anormal, métaplasique et de hauteur importante (**Figure 52**, colonne du milieu).

En conclusion, notre étude montre que l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ chez la souris se traduit, quelques fois, par un retard important de la régénération aboutissant, après 10 jours de régénération, à un épithélium anormal (hyperplasie des cellules basales, hauteur élevée) et, dans la majorité des souris analysées, par la mise en place progressive d'une métaplasie malpighienne plus au moins prononcée, suggérant ainsi que la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs est essentielle à la régénération normale de l'épithélium respiratoire.

II- Etude *in vivo* du rôle du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs dans la régénération de l'épithélium trachéal murin.

Nous avons montré que l'absence de la sous-unité $\alpha 5$ chez la souris, se traduit par une régénération anormale de l'épithélium trachéal après lésion. Afin de déterminer le rôle du polymorphisme D398N dans la régénération de l'épithélium respiratoire de la souris, des souris KO $\alpha 5$ ont été transduites, au niveau de la trachée, avec des lentivirus permettant l'expression locale soit de la protéine GFP (GFP), soit de la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398) ou de la forme mutée de la sous-unité $\alpha 5$ associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398N). Quatre semaines après la transduction, les trachées de souris ont été localement lésées au polidocanol et la régénération de l'épithélium trachéal a été suivie sur une période de 11 jours. La morphologie de l'épithélium ainsi que l'expression de la GFP ont été analysées avant la réalisation de la lésion (J0) et ensuite pendant 11 jours suivant la lésion (J2 à J11) (**Figure 53**). Lorsqu'on infecte les souris avec le lentivirus contrôle (GFP), nous observons une régénération épithéliale similaire à celle observée chez les souris KO $\alpha 5$ non infectées (**Figure 52**, colonne de milieu), à savoir que l'épithélium trachéal régénère anormalement, et on observe après 11 jours de régénération une métaplasie malpighienne modérée (**Figure 53**, 2 lignes du haut).

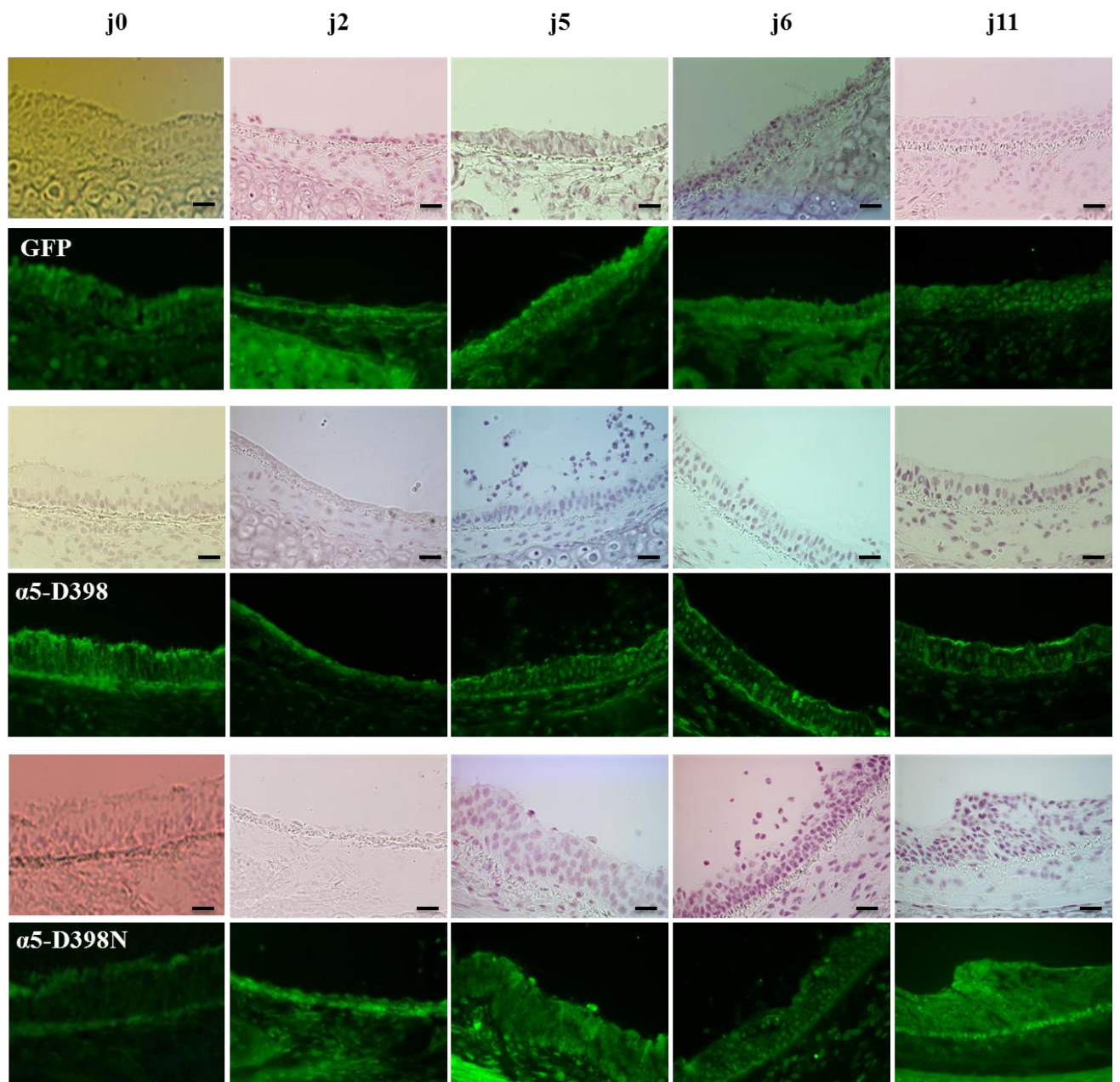


Figure 53: Régénération de l'épithélium trachéal de souris KO $\alpha 5$ transduites avec les lentivirus exprimant la GFP, la sous-unité $\alpha 5$ sauvage (D398) ou mutée (D398N).

L'implication du polymorphisme D398N dans la régénération de l'épithélium trachéal de souris a été analysée après infection au niveau trachéal de souris KO $\alpha 5$ avec des lentivirus exprimant la sous-unité $\alpha 5$ muté associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398N, les **2 lignes du bas**). Cette régénération épithéliale a été comparée à celle des souris KO $\alpha 5$ transduites avec les lentivirus exprimant soit la GFP (les **2 lignes du haut**) ou la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398, les **2 lignes du milieu**). Après une lésion locale des trachées au polidocanol, la régénération de l'épithélium trachéal a été suivie durant 11 jours. A J0 (avant lésion) et à J2-J5-J6 et J11 (après lésion) sont rapportées : la morphologie de l'épithélium trachéal (coloration à l'hématoxyline de Harris) et l'expression de la GFP en immunofluorescence (anticorps A11122). La barre d'échelle est de 10 μ m.

Résultats

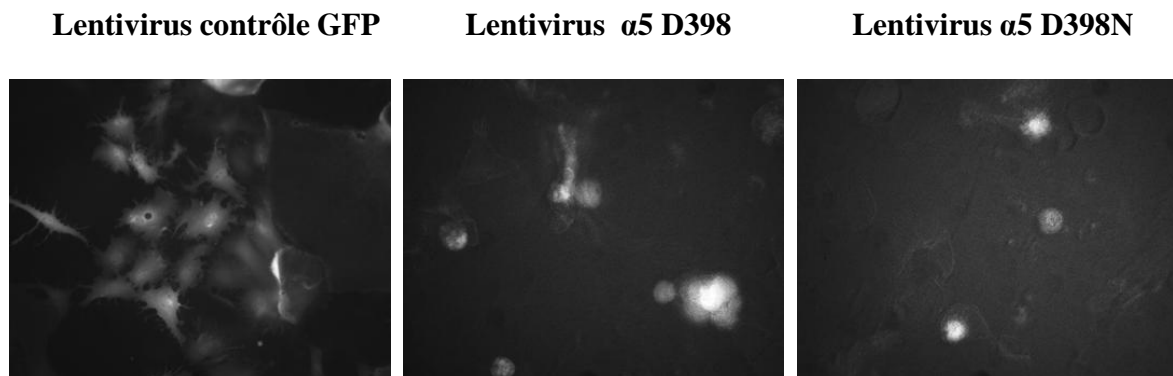
L'infection préalable des souris avec les lentivirus exprimant la sous-unité $\alpha 5$ mutée associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398N) conduit également à une régénération anormale de l'épithélium trachéal : dès le 5^{ème} jour on observe une hyperplasie des cellules basales qui donne naissance par la suite à une métaplasie malpighienne (J6). Cette métaplasie perdure dans le temps et après 11 jours de régénération, nous observons 1) un épithélium avec une hauteur encore plus augmentée par rapport à celle observée chez les souris KO $\alpha 5$ (GFP), 2) un état de remaniement épithélial dépassant le stade de métaplasie malpighienne et se rapprochant de la dysplasie précoce caractérisée par une anisocaryose, une désorganisation architectural discrète de l'épithélium et un pôle apical en dôme (**Figure 53**, 2 lignes du bas). Lorsqu'on infecte les souris KO $\alpha 5$ avec des lentivirus exprimant la sous-unité $\alpha 5$ sauvage (D398), nous observons une régénération épithéliale normale (**Figure 53**, 2 lignes de milieu) comme celle qui a été observée avec les souris sauvages (**Figure 52**, colonne de gauche) : dès J5, des cellules cylindriques sont bien visibles et à J11, l'épithélium est pseudostratifié.

En résumé, cette étude nous a permis de montrer d'une part l'importance de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régénération normale de l'épithélium respiratoire et d'autre part que le polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ conduit à une régénération épithéliale anormale avec des remaniements épithéliaux encore plus prononcés que ceux observés en absence totale de la sous-unité $\alpha 5$.

III- Etude de l'implication du polymorphisme D398N dans la régulation de la prolifération cellulaire

Nous avons observé que la régénération de l'épithélium trachéal de souris, préalablement transduites avec le lentivirus exprimant la sous-unité $\alpha 5$ mutée associée à la GFP ($\alpha 5$ -D398N), est anormale et induit en particulier une hyperplasie des couches de cellules basales de l'épithélium. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication du polymorphisme D398N dans la régulation de la prolifération cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles cellulaires : les cultures primaires de souris KO $\alpha 5$ infectées avec des lentivirus et des lignées cellulaires exprimant ou non le polymorphisme D398N.

(A)



(B)

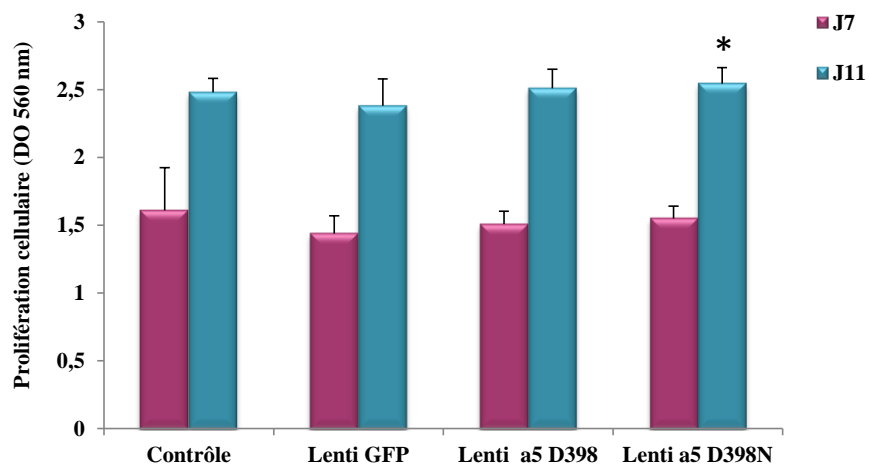


Figure 54: Analyse de la prolifération des cellules de souris KO $\alpha 5$ infectées *in vitro* avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N

L'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régulation de la prolifération cellulaire a été analysée sur des cultures primaires de souris KO $\alpha 5$, pendant 11 jours après infection *in vitro* avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ D398 (sauvage) et $\alpha 5$ -D398N (muté). (A) : fluorescence de la protéine GFP dans les cultures, 11 jours après infection par les différents lentivirus. (B) : quantifications de la prolifération cellulaire 7 jours et 11 jours après l'infection par les lentivirus. * : $p < 0,05$, test Mann Withney

Résultats

Concernant les cultures primaires de souris KO $\alpha 5$, deux approches expérimentales ont été réalisées :

1) Nous avons, dans une première approche, infecté *in vitro* des cultures primaires de souris KO $\alpha 5$, ensemencées dans des microplaques, avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N et nous avons ensuite analysé la prolifération cellulaire 7 et 11 jours après l'infection lentivirale. Nous avons suivi, durant 11 jours, l'évolution de la fluorescence de la protéine GFP, témoin de l'expression des gènes transduits par les lentivirus. La GFP est visible dès le 5^{ème} jour suivant la transduction, cependant, nous avons toujours observé une efficacité de transduction supérieure pour le lentivirus GFP par rapport aux lentivirus $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N (**Figure 54 A**). Onze jours après l'infection, nous observons une augmentation significative de la prolifération cellulaire uniquement lorsque les cellules de souris KO $\alpha 5$ ont été infectées avec le lentivirus exprimant la sous-unité $\alpha 5$ mutée (D398N) (**Figure 54 B**). Cependant, cette approche expérimentale ne permet pas d'analyser la prolifération cellulaire rapidement après l'isolement des cellules trachéales murines.

2) Dans une 2^{ème} approche, nous avons choisi de réaliser la transduction *in vivo*, comme nous l'avons réalisée pour l'étude *in vivo* de la régénération de l'épithélium trachéal des souris KO $\alpha 5$ (**Figure 53**). Cette approche permet, quatre semaines après l'infection, une expression plus importante de la protéine GFP au niveau des cellules épithéliales (**Figure 53**). Après 30 jours d'infection avec les différents lentivirus, les trachées de souris (6 souris contrôles KO $\alpha 5$, 9 souris GFP, 12 souris $\alpha 5$ -D398 et 9 souris $\alpha 5$ -D398N) sont disséquées, les cellules trachéales ont été isolées et ensemencées dans des microplaques et la prolifération cellulaire a été quantifiée 8 et 12 jours après l'ensemencement. L'observation des cellules en contraste de phase (**Figure 55-A**) et la quantification de la prolifération cellulaire (**Figure 55 B**) montrent que la prolifération des cellules murines, transduites *in vivo* avec le lentivirus $\alpha 5$ D398N est augmentée après 8 et 12 jours de culture *in vitro*. A l'inverse, après 8 jours de culture, nous observons une diminution de la prolifération des cellules transduites *in vivo* avec le lentivirus $\alpha 5$ D398, par rapport aux cellules témoins. De plus, la prolifération des cellules, transduites *in vivo* avec le lentivirus contrôle GFP, est similaire à celle des cellules témoins (**Figure 55 B**).

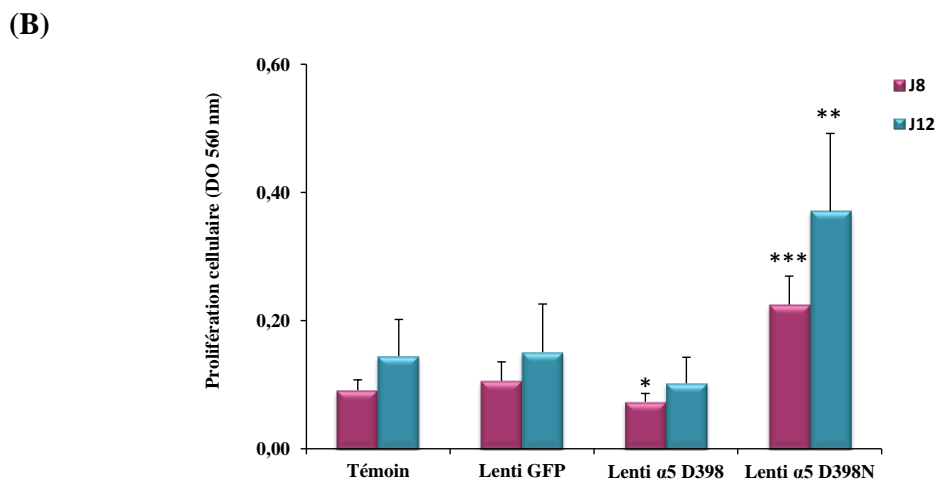
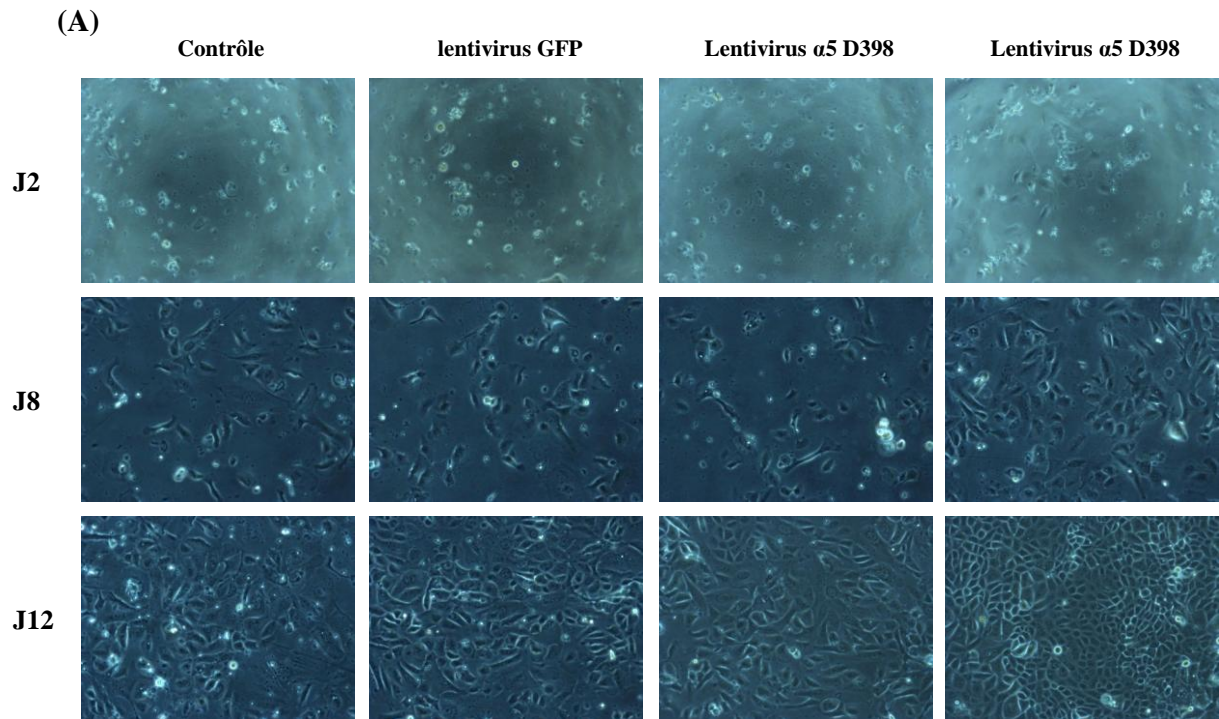


Figure 55: Analyse *in vitro* de la prolifération des cellules de souris KO $\alpha 5$ infectées *in vivo* avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N

L'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régulation de la prolifération cellulaire a été analysée sur des cultures primaires de souris KO $\alpha 5$ infectées *in vivo* avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ D398 (sauvage) et $\alpha 5$ -D398N (muté). L'évolution de la prolifération cellulaire en fonction des différents lentivirus a été analysée par microscopie (images en contraste de phase à J2, J8 et à J12) (A) et quantifiée avec le test MTT à J8 et à J12 (B). L'effet des transfectants sur la prolifération cellulaire a été comparé au témoin (cellules de souris KO $\alpha 5$ non transduites). Les résultats sont représentés sous forme de moyennes (DO_{560nm}) \pm écart-type * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$, test de Mann Withney.

Résultats

Nous avons ensuite analysé l'implication du polymorphisme de la sous-unité $\alpha 5$ D398N sur la régulation de la prolifération en utilisant deux lignées issues de cellules épithéliales bronchiques (HBE4 et B2B), exprimant la forme sauvage de sous-unité $\alpha 5$ (D398, WT), et une lignée issue d'un carcinome épidermoïde (NCI-H1299), exprimant la forme mutée de la sous-unité $\alpha 5$ (D398N, SNP) (**Figure 56 A**). Nous montrons que la prolifération *in vitro* de la lignée cellulaire NCI-H1299 (SNP) est plus importante que celle des lignées HBE4 et B2B (WT). Le taux de prolifération de la lignée NCI-H1299 est augmenté de 379% par rapport à la lignée HBE4 et de 113% par rapport à la lignée B2B (**Figure 56 B**).

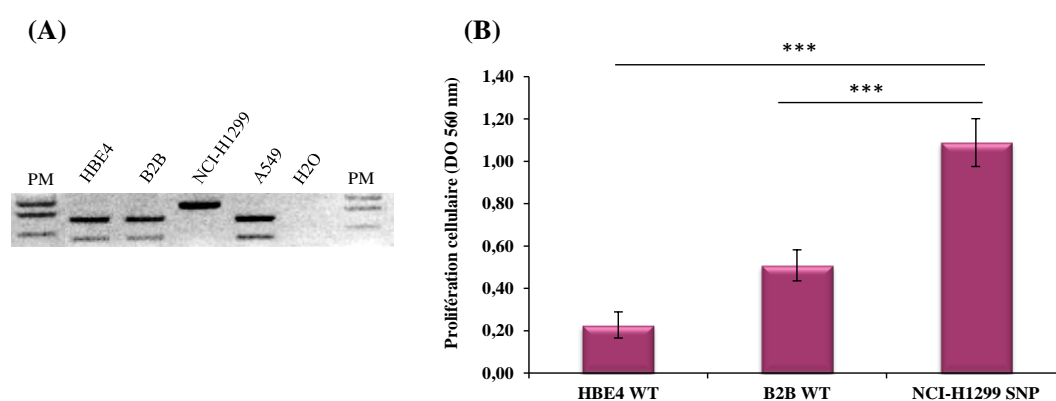


Figure 56: Analyse de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régulation de la prolifération des lignées cellulaires HBE4, B2B et NCI-H1299

(A) Le génotypage des lignées HBE4, B2B et NCI-H1299 indique la présence de deux bandes (124 pb et 311 pb) pour les lignées HBE4 et B2B, témoin de la présence de la sous-unité $\alpha 5$ sauvage, et une seule bande à 435pb pour la lignée NCI-H1299, témoin de l'expression de la forme mutée de la sous-unité $\alpha 5$; la lignée A549 est utilisée comme contrôle de l'expression de la sous-unité $\alpha 5$ sauvage. (B) La prolifération cellulaire de NCI-H1299 (SNP, D398N) a été comparée à celles des lignées HBE4 (WT) et B2B (WT). *** : $p < 0,001$, test Mann Withney. PM : poids moléculaire

En résumé, l'ensemble des résultats observés avec les cultures primaires des cellules murines et les lignées cellulaires humaines suggère que le polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ est associé à une stimulation de la prolifération cellulaire.

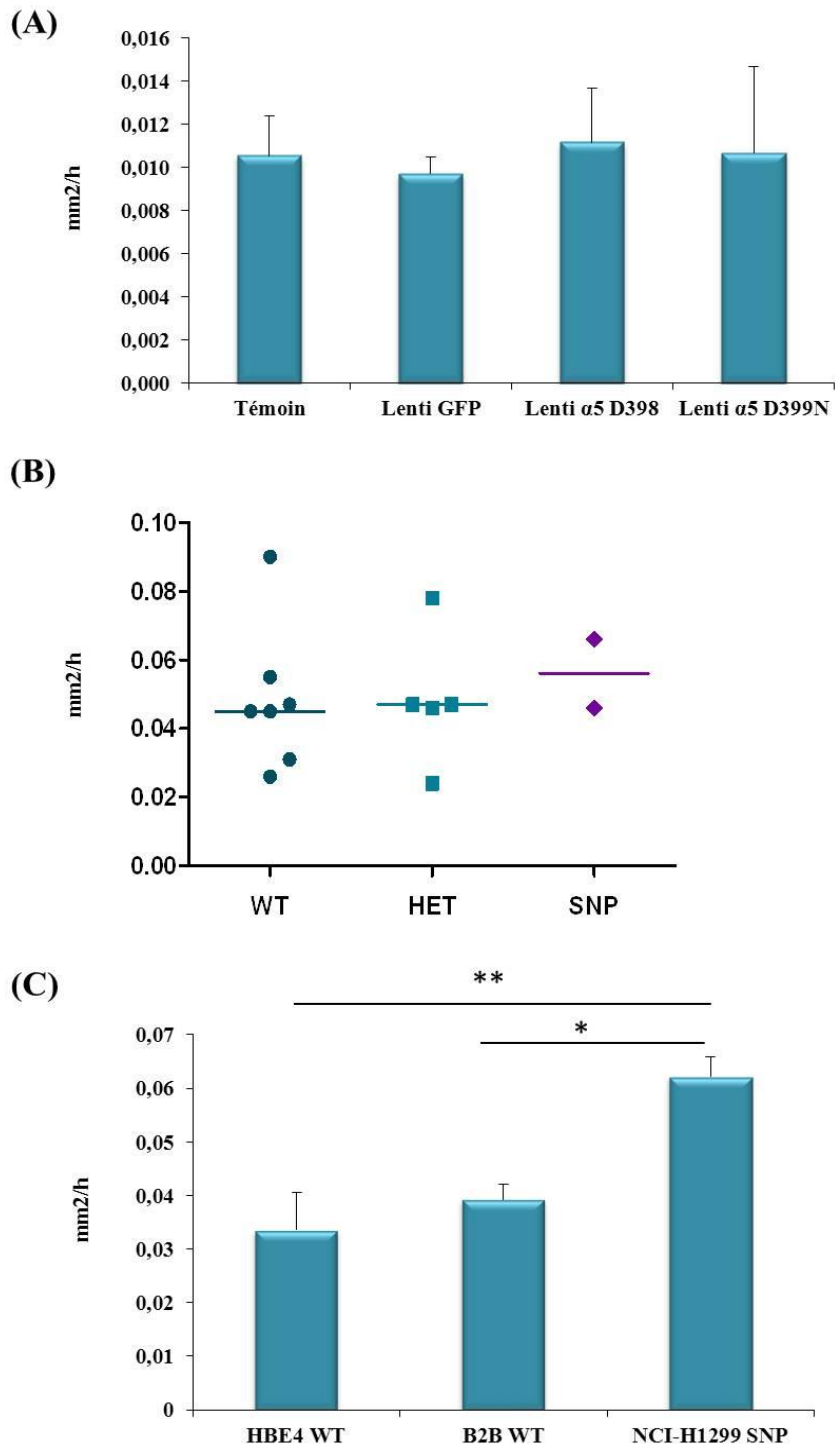


Figure 57: Analyse de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ des nChRs dans la migration cellulaire

L'implication du polymorphisme D398N des nAChRs dans la migration cellulaire a été analysée en utilisant des cultures primaires de souris KO $\alpha 5$ infectées avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D399N (A), des cultures primaires de polypes nasaux de génotypes sauvage (WT), hétérozygote (HET) ou homozygote (SNP) pour la mutation D398N de la sous-unité $\alpha 5$ (B) et des lignées cellulaires de différents génotypes HBE4 (WT), B2B (WT) et NCI-H1299 (SNP) (C). * : $p < 0,05$ et ** : $p < 0,01$, test t non apparié.

IV- Etude de l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la migration et de l'invasion cellulaires

L'invasion et la migration cellulaires sont des processus déterminants de la progression tumorale. Nous nous sommes donc intéressés à l'implication du polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régulation de ces processus en utilisant des cultures primaires de souris KO $\alpha 5$ infectées *in vitro* par les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N, puis des cultures primaires de cellules respiratoires humaines (polypes nasaux) et enfin des lignées cellulaires.

Pour l'étude de la migration sur les cultures primaires de souris, nous avons infecté *in vitro* des cellules de souris KO $\alpha 5$ avec les lentivirus GFP, $\alpha 5$ -D398 et $\alpha 5$ -D398N. A confluence, une lésion des cultures est réalisée et la migration cellulaire est enregistrée durant 48h. La migration des cellules de souris est très lente et la mesure de la vitesse de migration montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la migration des cellules de souris KO $\alpha 5$ infectées avec le lentivirus $\alpha 5$ -D398N ou $\alpha 5$ -D398 et les contrôles (souris non infectées ou infectées avec le lentivirus GFP) (**Figure 57 A**).

Concernant notre étude sur les cellules respiratoires humaines (polypes nasaux), nous avons analysé leur migration en fonction de leur génotype. L'étude a été effectuée sur 14 échantillons dont 7 exprimant la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ (WT), 5 sont hétérozygotes pour le polymorphisme $\alpha 5$ -D398N (HET) et 2 sont homozygotes pour le polymorphisme $\alpha 5$ -D398N (SNP). Nous montrons que globalement il n'y a pas de différence significative dans la migration des cellules respiratoires humaines en relation avec le génotype (**Figure 57 B**).

Concernant notre étude sur les lignées cellulaires, nous avons choisi les mêmes lignées que celles utilisés pour l'étude de la prolifération cellulaire : lignées HBE4 et B2B qui expriment la sous-unité $\alpha 5$ sauvage (D398, WT) et lignée NCI-H1299 qui exprime la forme mutée de la sous-unité $\alpha 5$ (D398N, SNP). Nous montrons que les cellules NCI-H1299 (SNP) ont une vitesse de migration plus élevée par rapport aux cellules HBE4 et B2B (WT). Nous observons une augmentation de la vitesse de migration des cellules NCI-H1299 de 85% par rapport aux cellules HBE4 et de 58% par rapport aux cellules B2B (**Figure 57 C**).

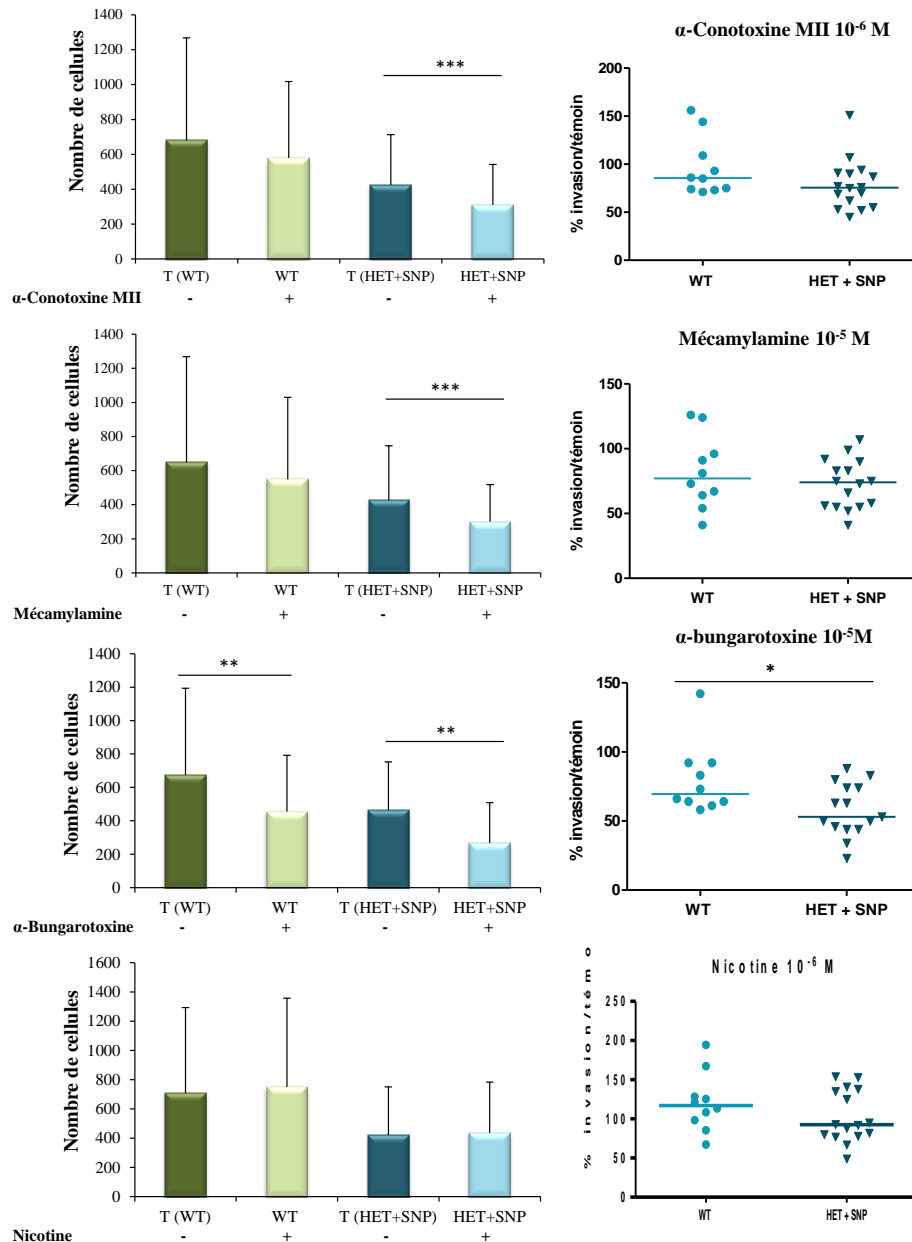


Figure 58: Analyse de l'effet des drogues nicotiques (α -conotoxine MII, mécamylamine, α -bungarotoxine et la nicotine) sur l'invasion des cellules tumorales en relation avec le génotype de la sous-unité $\alpha 5$ (WT ou HET+SNP)

L'effet des drogues nicotiques (α -conotoxine MII, mécamylamine, α -bungarotoxine et la nicotine) sur l'invasion des cellules tumorales de génotype WT ou hétérozygote et homozygote pour le polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ (HET+SNP) a été comparé à leur témoin respectif (cellules non traitées) (graphes de gauche) (test de Wilcoxon). Un pourcentage d'invasion des cellules WT et HET+SNP a été rapporté à leur témoins respectif, en absence de drogue, et l'effet des drogues nicotiques a été analysé entre les deux types cellulaires (WT versus HET+SNP) (graphes de droite) (test de Mann Whitney). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$

Résultats

Pour l'étude du rôle du polymorphisme D398N dans la régulation de l'invasion cellulaire, 26 échantillons de tumeurs pulmonaires (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes) ont été analysés. Après génotypage de 26 échantillons nous avons identifié 10 tumeurs qui expriment la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ (WT), 12 tumeurs sous forme hétérozygote (HET) et 3 tumeurs sous forme homozygote (SNP). En raison du faible nombre de patients homozygote D398N (SNP), nous avons rassemblé les patients hétérozygotes et homozygotes dans un même groupe (HET+SNP).

Dans une première analyse, nous avons comparé l'invasion des cellules tumorales de génotype WT ou (HET+SNP) traitées avec les drogues nicotiques (nicotine (10^{-6} M), α -bungarotoxine (10^{-5} M), α -conotoxine MII (10^{-6} M) et la mécamylamine (10^{-6} M)) à leur témoin respectif non traité et nous observons que le traitement des cellules tumorales de génotype WT avec les inhibiteurs des nAChRs hétéropentamériques (mécamylamine et α -conotoxine MII) ainsi qu'avec la nicotine n'a aucun effet significatif sur l'invasion des cellules tumorales à l'exception de l' α -bungarotoxine, inhibiteur des nAChRs $\alpha 7$, qui induit une diminution significative de l'invasion des cellules tumorales WT, par rapport au témoin (-33%) (**Figure 58**, graphes de gauche). A l'inverse, les cellules tumorales de génotype (HET+SNP) sont plus sensibles aux différentes drogues des récepteurs nicotiques et nous observons une diminution significative de l'invasion cellulaire par rapport aux témoins (cellules non traitées) (-27% avec l' α -conotoxine MII, -30% avec la mécamylamine et -42% avec l' α -bungarotoxine), à l'exception de la nicotine qui n'a aucun effet sur l'invasion des cellules tumorales (HET+SNP).

Dans une 2^{ème} analyse, nous avons déterminé, pour chaque culture de cellules tumorales, le pourcentage d'invasion des cellules traitées avec les différentes drogues des récepteurs nicotiques (α -conotoxine MII, mécamylamine, l' α -bungarotoxine) et nicotine, et comparé d'une façon appariée ce pourcentage à la culture témoin respective et non traitée. Lorsqu'on compare l'effet de l' α -conotoxine MII, la mécamylamine, l' α -bungarotoxine et la nicotine sur l'invasion des cellules de génotype sauvage (WT) par rapport aux cellules (HET+SNP), nous observons qu'il n'y a aucune différence significative de réponse aux drogues (α -conotoxine MII, mécamylamine et nicotine) entre les deux populations cellulaires à l'exception de l' α -bungarotoxine qui diminue, de façon significative, l'invasion des cellules

Résultats

tumorales (HET+SNP) par rapport aux cellules tumorales WT (**Figure 58**, graphes de droite)

En résumé, les cellules tumorales, hétérozygotes ou homozygotes pour le polymorphisme D398N, sont plus sensibles à l'effet inhibiteur de l'invasion de l' α -conotoxine MII, de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine par rapport aux cellules qui expriment la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$. La nicotine n'a aucun effet significatif sur l'invasion des cellules tumorales, quel que soit le génotype de ces cellules. Cette étude nous montre également qu'il n'y a pas de différence de réponse aux drogues (α -conotoxine MII, mécamylamine) et à la nicotine lorsqu'on compare le pourcentage d'invasion des cellules sauvages (WT) aux pourcentage d'invasion de cellules hétérozygotes ou homozygotes pour le polymorphisme D398N, à l'exception de la réponse à l' α -bungarotoxine qui a un effet inhibiteur d'invasion plus important sur les cellules tumorales (HET+SNP) par rapport aux cellules tumorales WT.

DISCUSSION

Le but de ce travail a été d'étudier le rôle potentiel des nAChRs en général puis, en particulier, du polymorphisme rs16969968 (D398N) de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs, dans la progression des cancers broncho-pulmonaires. Dans la première partie de notre étude, nous montrons que la localisation *in vivo* des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ varie en fonction du type et du stade de différenciation des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules. Puis, nous montrons *in vitro*, que ces récepteurs agissent différemment au cours de la progression tumorale, en particulier dans les processus de prolifération et d'invasion cellulaires, et que leurs rôles dans la régulation de ces processus varient selon le stade de différenciation des tumeurs. Dans la deuxième partie de notre étude, nous montrons que le polymorphisme rs16969968 (D398N) de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs module la prolifération cellulaire et la plasticité de l'épithélium respiratoire en contribuant à l'apparition de métaplasies malpighiennes, voire de dysplasies légères au sein de celui-ci.

Nous montrons tout d'abord que les nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, exprimés dans l'épithélium respiratoire normal, sont également exprimés dans les tumeurs broncho-pulmonaires. *In vivo*, dans les tissus bronchiques normaux, le nAChRs $\alpha 7$ est exprimé par les cellules basales et les cellules ciliées au niveau de l'épithélium de surface et par les cellules basales et dans les régions apicales des glandes de la sous-muqueuse bronchique, alors que le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ est exprimé au niveau des cellules basales de l'épithélium de surface et glandulaire. L'analyse par RT-PCR de l'expression globale des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 4$ des nAChRs dans les tumeurs broncho-pulmonaires, en comparaison avec le tissu bronchiques normal, prélevé chez chaque patient et à distance de la tumeur, ne met en évidence aucune différence significative, à l'exception de la sous-unité $\alpha 7$ dont l'expression est diminuée dans les carcinomes peu différenciés par rapport aux tissus sains. Nos résultats sont en accord avec les données de Lam et coll., à l'exception de la sous-unité $\beta 4$ pour laquelle ces auteurs notaient une augmentation de l'expression dans les tumeurs pulmonaires (Lam *et al.* 2007).

L'étude de l'expression des nAChRs, par des techniques immunohistochimiques, nous a, à l'inverse, permis de faire des observations intéressantes. Dans les tumeurs broncho-pulmonaires non à petites cellules et les plus fréquemment diagnostiquées (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes), la localisation des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ varie en fonction du type et du stade de différenciation des tumeurs. Dans les tumeurs bien différenciées, le nAChR $\alpha 7$ est exprimé par la majorité des cellules bien différenciées et

Discussion

situées au centre des massifs tumoraux des carcinomes épidermoïdes et au niveau apical des structures glandulaires des adénocarcinomes. Dans les tumeurs peu différenciées, l'expression du nAChRs $\alpha 7$, étudiée par des techniques d'immunohistochimie mais aussi par RT-PCR, est globalement diminuée dans les deux types de tumeurs, carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes, en comparaison avec le tissu bronchique normal, cependant, le nAChR $\alpha 7$ reste surexprimé au niveau des cellules les plus différenciées. Ces résultats suggèrent une relation entre l'état de différenciation des cellules tumorales et l'expression du nAChR $\alpha 7$. Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs du laboratoire qui montraient que l'absence ou l'inactivation du nAChRs $\alpha 7$ conduit à des altérations de l'état de différenciation de l'épithélium respiratoire à la fois *in vivo*, chez la souris, et *in vitro*, dans des cultures primaires de cellules bronchiques humaines (Maouche *et al.* 2009). Cette relation entre le nAChR $\alpha 7$ et la différenciation épithéliale a également été rapportée pour les lymphocytes T hépatiques (Qian *et al.* 2011), les kératinocytes (Arredondo *et al.* 2002) et les cellules germinales des testicules (spermatogonies et spermatoocytes) (Schirmer *et al.* 2011), lesquelles sont à l'origine de 95% des cancers testiculaires. Nous avons également observé la présence du nAChR $\alpha 7$ aux fronts d'invasion de certaines tumeurs broncho-pulmonaires, suggérant un lien de ce récepteur avec l'invasion cellulaire, une fonction déjà mise en évidence dans des lignées cellulaires tumorales (Dasgupta *et al.* 2009).

Dans l'ensemble des tumeurs, nous avons systématiquement retrouvé le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ surexprimé au niveau des fronts d'invasion des massifs tumoraux, suggérant que l'expression du nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ est en relation avec les propriétés invasives des cellules tumorales. Cette observation est cohérente avec les précédents travaux du laboratoire qui montre que le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ est surexprimé par les cellules en migration au cours de la réparation de lésions *in vitro* (Tournier *et al.* 2006). Des études sur des lignées cellulaires tumorales pulmonaires rapportent également l'implication des nAChRs hétéropentamériques contenant les sous-unités ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 2$ et $\beta 4$) dans l'invasion cellulaire (Schuller 2009).

De nombreux travaux ont montré que la nicotine stimule la prolifération de lignées cellulaires tumorales en agissant sur le nAChR $\alpha 7$. C'est ainsi qu'une action pro-proliférative de la nicotine a été mise en évidence via le nAChR $\alpha 7$ dans les cellules endothéliales (Li et Wang 2006) et dans des lignées cellulaires tumorales pulmonaires (Heeschen *et al.* 2002; Trombino *et al.* 2004; Dasgupta *et al.* 2006, 2009; Grozio *et al.* 2008; Schuller 2009).

Discussion

Cependant, notre approche immunohistochimique, sur des coupes tissulaires de cancers pulmonaires non à petites cellules (carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes bien ou peu différenciés), montre que les cellules tumorales exprimant fortement le nAChR $\alpha 7$ ont un faible pouvoir prolifératif, et inversement. Ces observations suggèrent que le nAChR $\alpha 7$ pourrait réprimer la prolifération de certaines cellules tumorales, comme ceci est le cas pour les cellules bronchiques normales (Maouche *et al.* 2009) et les kératinocytes de la peau (Arredondo *et al.* 2002, 2003). Nous avons donc étudié l'implication du nAChR $\alpha 7$ dans la régulation de la prolifération cellulaire en utilisant des cultures primaires de cellules bronchiques normales ou tumorales, modèle permettant, en comparaison aux lignées cellulaires, de tenir compte à la fois de l'hétérogénéité tumorale et des variabilités biologiques inter-patients. Nous montrons que l'exposition des cultures de cellules tumorales à l' α -bungarotoxine, antagoniste spécifique des nAChR $\alpha 7$, stimule la prolifération des cellules isolées des tissus tumoraux bien différenciés et inhibe la prolifération de celles issues des tumeurs peu différenciées. En parallèle, nous avons observé que l'expression du nAChR $\alpha 7$, analysée par RT-PCR, est plus faible au sein des tumeurs broncho-pulmonaires peu différenciées en comparaison avec le tissu bronchique normal à distance de la tumeur. L'ensemble de ces résultats suggère que l'expression du nAChR $\alpha 7$, d'une part, et le mode de régulation de la prolifération des cellules tumorales par le nAChR $\alpha 7$, d'autre part, dépendent de l'état de différenciation des tumeurs.

Le nAChR $\alpha 7$ agit comme un répresseur de la prolifération cellulaire dans les tumeurs bien différenciées, comme dans le tissu bronchique normal, alors qu'il favorise la prolifération cellulaire dans les tumeurs peu différenciées. Nous supposons donc que les voies de signalisation, activées par le nAChR $\alpha 7$, sont différentes selon le stade de différenciation des tumeurs. Dans la littérature, il est décrit que l'activation du nAChR $\alpha 7$, par la nicotine ou la NNK, stimule la prolifération de lignées tumorales dérivées de cancers broncho-pulmonaires, en activant plusieurs voies de signalisations : la voie EGF/EGFR qui régule la voie ERK1/2 et PI3K/Akt, la voie β -arrestin/SRC (Dasgupta *et al.* 2006; Laag *et al.* 2006; Schuller 2009) et la voie sérotonine/bombésine qui stimule la PKC qui elle-même active les modules MEK/ERK (Wu *et al.* 2011; Improgo *et al.* 2011). Dans les cancers gastro-intestinaux ainsi que dans les adénocarcinomes dérivant des voies respiratoires distales, l'activation spécifique du nAChR $\alpha 7$ par la NNK induit indirectement l'activation des récepteurs β -adrénergiques capables de

Discussion

stimuler la voie de signalisation adénylate cyclase/AMPC/PKA (Schuller *et al.* 1999; Laag *et al.* 2006; Majidi *et al.* 2007; Schuller 2009). Nous avons observé, qu'en absence de tout stimulus nicotinique, la prolifération des cellules respiratoires normales, isolées de polypes nasaux, nécessite l'implication des RTK, des PI3Ks (α , β , δ , γ), de la PKA et des MEK(MEK1/2). La PKC (isoformes α , β 1, δ , ϵ , ζ), contrairement à ce qui est couramment décrit pour les lignées de cellules tumorales, est la seule voie qui, lorsqu'elle est inhibée, stimule la prolifération des cellules respiratoires normales. La voie PKC pourrait donc, comme le nAChR α 7, réguler négativement la prolifération des cellules bronchiques normales. Le rôle répresseur de la prolifération cellulaire de la voie des PKC est assez peu argumenté dans la littérature. A l'inverse, de nombreux travaux mettent en avant son rôle pour favoriser la prolifération et la survie cellulaires (Dasgupta *et al.* 2006, 2009; Grozio *et al.* 2008; Schuller 2009). Il existe 10 isoformes différentes de la PKC, réparties en trois sous-groupes : les PKC classiques (α , β 1, β 2 et γ), les PKC nouvelles (δ , ϵ , η , et θ) et les PKC atypiques (ζ , ι/λ). Leurs fonctions dépendent de l'environnement cellulaire et elles sont impliquées dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la survie et l'apoptose cellulaires. Ces isoformes peuvent avoir des fonctions différentes. Alors que les isoformes α , β , ϵ et les isoformes atypiques (ζ , ι/λ) ont des fonctions anti-apoptotiques, les isoformes δ et θ sont plutôt impliquées dans l'induction de l'apoptose cellulaire (Gutcher *et al.* 2003; Reyland 2009). Le GF 109203x, inhibiteur de PKC utilisé dans notre étude, cible les isoformes α , β 1, δ , ϵ et ξ , ayant toutes des activités anti-apoptotiques et stimulatrices de la prolifération cellulaire, à l'exception de l'isoforme δ , décrite comme pro-apoptotique (Gutcher *et al.* 2003). Il nous paraît donc important d'utiliser des inhibiteurs plus spécifiques, de façon à expliquer l'effet anti-prolifératif observé pour la PKC dans les cellules respiratoires normales et étudier ultérieurement son interaction possible avec le nAChR α 7.

L'effet *in vitro* de la nicotine sur la prolifération cellulaire varie beaucoup selon le type de cellules exposées et la concentration de nicotine utilisée. Sur les cellules bronchiques normales, alors qu'une exposition à l' α -bungarotoxine (de 10^{-7} à 10^{-5} M) induit une augmentation significative et dose dépendante de la prolifération cellulaire, témoin d'un contrôle négatif de la prolifération cellulaire par le nAChR α 7, la nicotine à la concentration de 1 μ M, correspondant à la nicotémie observée chez les fumeurs, diminue sensiblement la

Discussion

prolifération cellulaire. On peut donc supposer que, dans ces conditions, la nicotine active les nAChRs $\alpha 7$, ce qui conduit à une répression de la prolifération. A fortes concentrations (10^{-5} à 10^{-4} M), l'effet de la nicotine s'inverse sur les cellules bronchiques normales et induit une augmentation significative et dose dépendante de la prolifération cellulaire. L'augmentation de la prolifération en présence de concentrations élevées de nicotine, notamment dans les cellules bronchiques normales, peut être expliquée par le fait que, contrairement aux agonistes endogènes tels que l'ACh ou la choline rapidement dégradés ou déplacés, la nicotine n'est pas véritablement dégradée ou déplacée. L'accumulation de nicotine et les liaisons incessantes aux récepteurs peuvent entraîner une désensibilisation soutenue et une inactivation complète du nAChR $\alpha 7$ (Couturier *et al.* 1990; Revah *et al.* 1991; McGehee et Role 1995; Gerzanich *et al.* 1997; Hogg *et al.* 2003), témoins d'un effet antagoniste de la nicotine. De façon similaire, nous observons une stimulation de la prolifération des cellules dérivées des tumeurs bien différenciées et exposées soit à l' α -bungarotoxine (10^{-7} à 10^{-5} M), soit à des concentrations élevées de nicotine (10^{-4} M).

Contrairement à ce qui est observé avec le tissu normal et les tumeurs bien différenciées, une exposition à la nicotine (10^{-7} à 10^{-4} M) se traduit par une augmentation importante de la prolifération des cellules isolées des tumeurs peu différenciées, correspondant très probablement aux formes de cancers les plus agressives. L'effet de la nicotine est optimal pour une concentration de nicotine de 1 μ M, correspondant à la nicotémie moyenne constatée chez les fumeurs. Ces résultats sont tout à fait similaires à ceux décrits dans la littérature, à savoir que la nicotine stimule de façon dose dépendante la prolifération cellulaire des lignées tumorales avec un effet maximal observé à 1 μ M (Dasgupta *et al.* 2009).

L'implication des nAChRs hétéropentamériques, de type $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 4\beta 2$ ou $\alpha 3\beta 4$, dans la stimulation de la prolifération des lignées cellulaires tumorales de cancers pulmonaires à petites cellules (SCLC) et non à petites cellules (NSCLC), en réponse à une activation par la nicotine ou la NNN, a été décrit récemment (Schuller 2009). Par exemple, la NNN, agoniste spécifique des nAChRs $\alpha 3\beta 2$ (Grando 2008), stimule la prolifération de la lignée cellulaire bronchique humaine BEP2D (Arredondo *et al.* 2006) et la NNK, stimule la prolifération des cellules épithéliales bronchiques humaines via les nAChRs exprimant la sous-unité $\alpha 3$ en

Discussion

activant la cycline D1 (Ho *et al.* 2005). Dans l'épithélium bronchique normal, le nAChR $\alpha3\alpha5\beta2$ est exprimé dans les cellules basales et pourrait donc réguler la prolifération de ces cellules. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la prolifération cellulaire en présence d'antagonistes des nAChRs hétéropentamériques : α -conotoxine MII 10^{-5} M et mécamylamine 10^{-5} M à 10^{-4} M pour les cellules bronchiques normales et α -conotoxine MII 10^{-5} M pour les cultures de cellules dérivées des tumeurs bien différenciées. On peut néanmoins suspecter un manque de spécificité dans l'action de ces drogues, utilisées à de telles concentrations, vis-à-vis des nAChRs et, tout a plus, suggérer que les nAChRs hétéropentamériques ne participent que partiellement à la régulation de la prolifération cellulaire dans le tissu bronchique humain normal et dans les tumeurs broncho-pulmonaires.

Nous avons montré que les nAChRs $\alpha7$ et $\alpha3\alpha5\beta2$ sont impliqués au moins *in vitro* dans la régulation des propriétés invasives des cellules tumorales, des antagonistes respectifs de ces deux types de nAChRs inhibant l'invasion des cellules tumorales en chambres de Boyden. Par ailleurs, l'identification quasi-systématique du nAChR $\alpha3\alpha5\beta2$, révélé avec un anticorps spécifique de la sous-unité $\beta2$, et l'identification moins fréquente du nAChR $\alpha7$ aux fronts d'invasion des massifs tumoraux, suggèrent également des rôles potentiels de ces deux types de nAChRs dans le processus d'invasion tumorale. L'implication des nAChRs $\alpha7$ et hétéropentamériques dans les processus de migration cellulaire est bien documentée dans la littérature. Les nAChRs $\alpha3\alpha5\beta2$ sont impliqués dans la migration des cellules basales au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire (Tournier *et al.* 2006). Le nAChRs $\alpha7$ et les nAChRs $\alpha3\beta^*$ sont impliqués dans la migration directionnelle des kératinocytes (Grando *et al.* 2006). L'acétylcholine et la nicotine régulent l'adhérence et la motilité des kératinocytes de la peau (Trinkaus-Randall et Gipson 1984; Grando *et al.* 1995; Nguyen *et al.* 2004) ainsi que des cellules épithéliales bronchiques humaines (Zia *et al.* 1997; Maus *et al.* 1998).

Il est maintenant bien établi que les agonistes nicotiques favorisent l'invasion de lignées tumorales issues de cancers pulmonaires à petites cellules ou non à petites cellules. La NNK, agoniste spécifique des nAChRs $\alpha7$, favorise l'invasion et la migration des cellules cancéreuses pulmonaires en activant la voie de signalisation ERK/Calpaïnes (Xu et Deng 2004; Schuller 2009; Improgo *et al.* 2011). La nicotine favorise le développement de tumeur et des métastases chez la souris (Davis R *et al.* 2009).

Discussion

La nicotine stimule la migration et l'invasion des cellules A549 avec un effet maximal observé pour une concentration de 1 μ M (Dasgupta *et al.* 2009). Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'effet global de la nicotine sur les propriétés invasives des cellules tumorales en cultures primaires. Cependant, si l'on regarde l'effet patient par patient, nous avons observé, selon les patients, des effets très variables de la nicotine sur l'invasion cellulaire : stimulation, inhibition ou aucun effet significatif. Plusieurs explications peuvent être proposées pour expliquer ces observations divergentes : 1) il est probablement plus facile d'inhiber *in vitro* des nAChRs avec des antagonistes que de les stimuler, en présence d'agonistes potentiels produits par les cellules tumorales elles-mêmes, 2) comme nous l'avons déjà évoqué, la nicotine, selon sa concentration, peut stimuler ou au contraire désensibiliser et inactiver les nAChRs.

Nous avons observé une proportion plus importante de cellules exprimant la vimentine, marqueur mésoenchymateux, à la fois, parmi les cellules présentes sur les membranes de chambre de Boyden, par rapport aux cellules isolées des tumeurs et dans la population de cellules invasives en chambre de Boyden, par rapport aux cellules adhérees sur les membranes des chambres de Boyden. Cette augmentation de l'expression de la vimentine est concomitante à une diminution de l'expression des cytokératines. Nous éliminons la possibilité d'une contamination ou d'un enrichissement des cultures en cellules fibroblastiques puisque 1) ces cultures ont été réalisées en milieu défini sans utilisation de sérum de veau fœtal et 2) nous montrons que la majorité des cellules adhérees sur les membranes de chambre de Boyden ont des caractéristiques morphologiques de cellules tumorales. Nos résultats suggèrent que les modifications phénotypiques des cellules tumorales invasives en chambres de Boyden sont caractéristiques d'une transition épithélio-mésoenchymateuse de la part de ces cellules. L'expression de la vimentine est d'ailleurs décrite comme un prérequis à l'invasion cellulaire (Gilles *et al.* 1999; Satelli et Li 2011). Il est intéressant de noter que l'exposition de lignées tumorales à la nicotine induit une diminution de l'expression des marqueurs épithéiaux (E-cadhérine, β -caténine et ZO-1) avec une augmentation concomitante de l'expression des protéines mésoenchymateuses comme la fibronectine et la vimentine (Davis *et al.* 2009; Dasgupta *et al.* 2009).

Discussion

En résumé, la première partie de cette étude nous a permis de montrer, en utilisant des cultures primaires de cellules tumorales, que les nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ sont impliqués dans la progression tumorale des cancers pulmonaires non à petites cellules. Nous montrons, en complément des données de la littérature, que le nAChR $\alpha 7$ agit comme un répresseur de la prolifération dans les tumeurs bien différenciées, alors qu'il stimule la prolifération, en réponse à la nicotine, dans les tumeurs peu différenciées. A l'inverse, le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ n'est que partiellement impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire aussi bien dans les tumeurs pulmonaires que dans l'épithélium respiratoire normal. Finalement, en cohérence avec les données de la littérature, nous montrons que les nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ participent à la stimulation de l'invasion des cellules tumorales pulmonaires.

En conclusion, les nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ sont impliqués dans la prolifération et l'invasion cellulaires, deux processus clés de la progression tumorale, suggérant que des thérapeutiques ciblant ces nAChRs pourraient être envisagées selon le stade de différenciation des tumeurs.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous nous sommes intéressés au rôle du polymorphisme rs16969968 (D398N) de la sous-unité $\alpha 5$ dans la progression tumorale. Ce polymorphisme a été identifié dans la région 15q25 comme étant fortement associé à la dépendance tabagique et à l'incidence des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et des cancers broncho-pulmonaires (Hung *et al.* 2008; Young *et al.* 2008; Pillai *et al.* 2009; Brennan *et al.* 2011). Le polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ a pour conséquence, une mutation non-synonyme au niveau d'un acide aminé hautement conservé entre les espèces (D398N). Cependant, les mécanismes par lesquels le polymorphisme rs16969968 (D398N) est associé au développement du cancer du poumon ne sont pas connus. En particulier, nous ne savons pas si la mutation D398N se traduit par une perte ou un gain de la fonction de la sous-unité $\alpha 5$. Par exemple, l'introduction de la mutation D398N dans la sous-unité $\alpha 5$ dans des lignées cellulaires, augmente le taux de transcrits de la sous-unité $\alpha 5$ (Falvella *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009) mais, à l'inverse, diminue les flux calciques à travers le nAChR $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ (Bierut *et al.* 2008).

Dans notre étude, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle du polymorphisme rs16969968 (D398N) dans la progression tumorale. La prolifération, la migration et l'invasion cellulaire sont des processus clés de la progression tumorale. Notre

Discussion

laboratoire a précédemment montré que la sous-unité $\alpha 5$ fait partie d'un complexe $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, impliqué dans le processus de migration cellulaire au cours de la régénération de l'épithélium respiratoire (Tournier *et al.* 2006). Nous avons donc analysé, dans un premier temps, le rôle de la sous-unité $\alpha 5$ dans la régénération de l'épithélium respiratoire, en utilisant un modèle de régénération *in vivo* de l'épithélium trachéal chez la souris, développé au sein du laboratoire (Coraux *et al.* 2005). Nous montrons que la régénération de l'épithélium trachéal de souris invalidées pour la sous-unité $\alpha 5$ (KO $\alpha 5$) est caractérisée par un retard de la différenciation épithéliale, ainsi que par une hyperplasie des cellules basales et une métaplasie malpighienne plus au moins prononcées.

Nous avons ensuite étudié les effets de la réintroduction, localement au niveau trachéal et chez la souris KO $\alpha 5$, de la sous-unité $\alpha 5$ muté ($\alpha 5$ -D398N) ou de la forme sauvage ($\alpha 5$ -D398) sur la régénération épithéliale. La régénération épithéliale, chez les souris KO $\alpha 5$ + $\alpha 5$ -D398N, est anormale et caractérisée par des remaniements épithéliaux encore plus prononcés qu'en absence totale de la sous-unité $\alpha 5$: hauteur importante de l'épithélium, métaplasie malpighienne plus ou moins prononcée, dysplasie précoce occasionnelle, certains de ces remaniements pouvant être déjà considérés comme des lésions précancéreuses (Kerr 2001). A l'inverse, la régénération épithéliale, chez les souris KO $\alpha 5$ + $\alpha 5$ -D398, est normale. Nos résultats suggèrent 1) que la sous-unité $\alpha 5$ joue un rôle important dans la régénération de l'épithélium respiratoire et, 2) la mutation $\alpha 5$ -D398N suffit pour favoriser l'émergence d'un état précancéreux au sein de l'épithélium respiratoire.

En complément de ces données obtenues *in vivo* chez la souris, nous montrons *in vitro* 1) une prolifération accrue dans les cultures primaires de cellules trachéales isolées des souris KO $\alpha 5$ + $\alpha 5$ -D398N et de lignées, isolées de tumeurs humaines et exprimant la sous-unité $\alpha 5$ -D398N, 2) une augmentation de la vitesse de migration des lignées cellulaires NCI-H1299 (D398N) par rapport aux lignées sauvages B2B et HBE4, et 3) une inhibition de l'invasion tumorale, plus importante en présence d'antagonistes des nAChRs hétéropentamériques (α -conotoxine MII et mécamylamine), lorsque les cellules sont isolées de patients hétérozygotes ou homozygotes pour le polymorphisme rs16969968, par rapport aux patients présentant la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ -D398. Ces résultats suggèrent que la mutation $\alpha 5$ -D398N module le comportement de cellules normales ou tumorales, en particulier pour ce qui concerne la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. Cependant, l'invasion *in vitro* des cellules isolées de patients hétérozygotes ou homozygotes pour le polymorphisme

Discussion

rs16969968, par rapport aux patients présentant la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ -D398. Ces résultats suggèrent que la mutation $\alpha 5$ -D398N module le comportement de cellules normales ou tumorales, en particulier pour ce qui concerne la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires. Cependant, l'invasion *in vitro* des cellules isolées de patients hétérozygotes ou homozygotes pour le polymorphisme rs16969968, est plus sensible à l' α -bungarotoxine, inhibiteur spécifique des nAChRs $\alpha 7$, que celles isolées de patients présentant la forme sauvage de la sous-unité $\alpha 5$ -D398, suggérant des interactions différentes du nAChR $\alpha 7$ avec les $\alpha 5$ (D398N) $\alpha^*\beta^*$ et les $\alpha 5$ (D398) $\alpha^*\beta^*$. Une telle interaction entre les nAChRs $\alpha 5^*$ et les nAChRs $\alpha 7$ a été évoquée récemment (Krais *et al.* 2011).

Les modifications dynamiques et séquentielles du phénotype des cellules épithéliales au cours de la réparation/régénération de l'épithélium lésé, témoignent de la remarquable plasticité de l'épithélium respiratoire et de sa capacité à préserver et protéger les voies aériennes. Nous montrons ici, pour la première fois, que la présence de nAChRs contenant la sous-unité $\alpha 5$ mutée (D398N) altère la prolifération et la différenciation des cellules respiratoires et module l'invasion des cellules tumorales, en synergie avec les nAChRs $\alpha 7$.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail nous a permis de démontrer l'importance des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans la progression tumorale. Nous montrons pour la première fois que le nAChR $\alpha 7$ régule différemment la prolifération cellulaire selon le stade de différenciation des cancers pulmonaires non à petites cellules, carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes. Le nAChR $\alpha 7$ agit en effet comme un répresseur de la prolifération dans les tumeurs bien différenciées, comme dans le tissu bronchique normal, alors que dans les tumeurs peu différenciées il stimule la prolifération cellulaire en réponse à la nicotine. A l'inverse, les nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, systématiquement localisés aux fronts d'invasion des massifs tumoraux, ne sont que partiellement impliqués dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales, cependant ils jouent un important rôle dans le processus d'invasion cellulaire où ils participent avec les nAChRs $\alpha 7$ à l'augmentation du pouvoir invasif des cellules tumorales.

De nombreuses études épidémiologiques et d'association pangénomiques ont montré un lien entre le polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ des nAChRs dans le développement des cancers broncho-pulmonaires. Dans notre étude, nous montrons que le polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ stimule la prolifération cellulaire en favorisant la genèse de lésions précancéreuses. Nous montrons également que le polymorphisme D398N de la sous-unité $\alpha 5$ module, en synergie avec le nAChR $\alpha 7$, le pouvoir invasif des cellules tumorales.

En perspective à la première partie de ce travail, nous envisageons de déterminer :

1) les différentes voies de signalisation activées par le nAChR $\alpha 7$ selon le stade de différenciation des tumeurs pulmonaires,

2) les voies de signalisation, sous le contrôle des nAChRs, impliquées dans l'invasion des cellules tumorales de carcinomes épidermoïdes et adénocarcinomes, notamment en identifiant le type de métalloprotéinases (MMPs) activées.

Nous envisageons également de poursuivre nos investigations sur l'implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité $\alpha 5$ dans la progression tumorale.

Dans un premier temps, nous comptons approfondir nos études sur l'implication du variant $\alpha 5$ D398N dans la régulation de la migration et de l'invasion cellulaire en utilisant

Conclusion et perspectives

d'une part, d'autres lignées cellulaires et un plus grand nombre d'échantillons humains et murins.

Ensuite, nous envisageons d'analyser la fonctionnalité, en terme de flux calciques, des récepteurs hétéropentamériques, exprimant le variant $\alpha 5$ D398N, en utilisant des cultures primaires humaines et murines. Il serait également intéressant d'identifier les interactions potentielles entre le nAChR $\alpha 7$ et les nAChRs $\alpha 5$ (D398N).

Enfin, dans le but de vérifier si les nAChRs, exprimant la sous-unité $\alpha 5$ mutée (D398N), sont sensibles aux différents inhibiteurs des hétéropentamères, nous envisageons de réitérer nos études sur la prolifération et la migration cellulaire selon le génotype des cellules (murines et humaines) en présence d' α -conotoxine MII et de la mécamylamine.

L'ensemble de ces données devrait aboutir à une meilleure compréhension de l'implication fonctionnelle des nAChRs $\alpha 7$ et $\alpha 3\alpha 5\beta 2$, exprimant ou non le polymorphisme rs16969968 (D398N), dans les différents processus de la progression tumorale, principalement dans la prolifération et l'invasion cellulaires. A terme, les données obtenues devraient permettre de définir de nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des cancers broncho-pulmonaires.

BIBLIOGRAPHIE

Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX.

Choline is a selective agonist of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons.
Eur J Neurosci 1997 ; 9 (12) : 2734–42.

Amos CI, Wu X, Broderick P, Gorlov IP, Gu J, Eisen T, et al.

Genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility locus for lung cancer at 15q25.1.
Nat Genet 2008 ; 40 (5) : 616–22.

Anand R, Conroy WG, Schoepfer R, Whiting P, Lindstrom J.

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure.
J Biol Chem 1991 ; 266 (17) : 11192–8.

Arias HR.

Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor.
Brain Res Brain Res Rev 1997 ; 25 (2) : 133–91.

Arredondo J, Chernyavsky AI, Grando SA.

The nicotinic receptor antagonists abolish pathobiologic effects of tobacco-derived nitrosamines on BEP2D cells.
J Cancer Res Clin Oncol 2006 ; 132 (10) : 653–63.

Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Kummer W, et al.

Central role of alpha7 nicotinic receptor in differentiation of the stratified squamous epithelium.
J Cell Biol 2002 ; 159 (2) : 325–36.

Arredondo J, Nguyen VT, Chernyavsky AI, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, et al.

Functional role of alpha7 nicotinic receptor in physiological control of cutaneous homeostasis.
Life Sci 2003 ; 72 (18-19) : 2063–7.

Avril-Delplanque A, Casal I, Castillon N, Hinnrasky J, Puchelle E, Péault B.

Aquaporin-3 expression in human fetal airway epithelial progenitor cells.
Stem Cells 2005 ; 23 (7) : 992–1001.

Ayala CA.

Stimulation of choline acetyl transferase activity by l- and d-carnitine in brain areas of neonate rats.
J Neurosci Res 1995 ; 41 (3) : 403–8.

Ayers MM, Jeffery PK.

Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium.
Eur Respir J 1988 ; 1 (1) : 58–80.

Baldwin F.

Basal cells in human bronchial epithelium.
Anat Rec 1994 ; 238 (3) : 360–7.

Barnes PJ.

Adrenergic and non-adrenergic, non-cholinergic control of airways.
Respiration 1986a ; 50 Suppl 2 : 9–16.

Barnes PJ.

Non-adrenergic non-cholinergic neural control of human airways.
Arch Int Pharmacodyn Ther 1986b ; 280 (2 Suppl) : 208–28.

Barnes PJ.

The role of anticholinergics in chronic obstructive pulmonary disease.
Am J Med 2004 ; 117 Suppl 12A : 24S-32S.

Berrettini W, Yuan X, Tozzi F, Song K, Francks C, Chilcoat H, et al.

Alpha-5/alpha-3 nicotinic receptor subunit alleles increase risk for heavy smoking.
Mol Psychiatry 2008 ; 13 (4) : 368–73.

Bertrand D, Bertrand S, Ballivet M.

Pharmacological properties of the homomeric alpha 7 receptor.
Neurosci Lett 1992 ; 146 (1) : 87–90.

Bierut LJ, Stitzel JA, Wang JC, Hinrichs AL, Gruzza RA, Xuei X, et al.

Variants in nicotinic receptors and risk for nicotine dependence.
Am J Psychiatry 2008 ; 165 (9) : 1163–71.

Bierut LJ.

Nicotine dependence and genetic variation in the nicotinic receptors.
Drug Alcohol Depend 2009 ; 104 Suppl 1 : S64–9.

Blanchet M-R, Langlois A, Israël-Assayag E, Beaulieu M-J, Ferland C, Laviolette M, et al.

Modulation of eosinophil activation in vitro by a nicotinic receptor agonist.
J Leukoc Biol 2007 ; 81 (5) : 1245–51.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB.

Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium.
Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 157 (6 Pt 1) : 2000–6.

Bray C, Son J-H, Kumar P, Meizel S.

Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility.
Biol Reprod 2005 ; 73 (4) : 807–14.

Breeze RG, Wheeldon EB.

The cells of the pulmonary airways.
Am Rev Respir Dis 1977 ; 116 (4) : 705–77.

Brennan P, Hainaut P, Boffetta P.

Genetics of lung-cancer susceptibility.
Lancet Oncol 2011 ; 12 (4) : 399–408.

Brézillon S, Zahm JM, Pierrot D, Gaillard D, Hinnrasky J, Millart H, et al.

ATP depletion induces a loss of respiratory epithelium functional integrity and down-regulates CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) expression.
J Biol Chem 1997 ; 272 (44) : 27830–8.

Brüske-Hohlfeld I.

Environmental and occupational risk factors for lung cancer.
Methods Mol Biol 2009 ; 472 : 3–23.

Bibliographie

Cachelin AB, Jaggi R.

Beta subunits determine the time course of desensitization in rat alpha 3 neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Pflugers Arch 1991 ; 419 (6) : 579–82.

Caporaso N, Gu F, Chatterjee N, Sheng-Chih J, Yu K, Yeager M, et al.

Genome-wide and candidate gene association study of cigarette smoking behaviors.

PLoS ONE 2009 ; 4 (2) : e4653.

Carlisle DL, Hopkins TM, Gaither-Davis A, Silhanek MJ, Luketich JD, Christie NA, et al.

Nicotine signals through muscle-type and neuronal nicotinic acetylcholine receptors in both human bronchial epithelial cells and airway fibroblasts.

Respir Res 2004 ; 5 : 27.

Cartier GE, Yoshikami D, Gray WR, Luo S, Olivera BM, McIntosh JM.

A new alpha-conotoxin which targets alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors.

J Biol Chem 1996 ; 271 (13) : 7522–8.

Cataldo JK, Dubey S, Prochaska JJ.

Smoking cessation: an integral part of lung cancer treatment.

Oncology 2010 ; 78 (5-6) : 289–301.

Catassi A, Servent D, Paleari L, Cesario A, Russo P.

Multiple roles of nicotine on cell proliferation and inhibition of apoptosis: implications on lung carcinogenesis.

Mutat Res 2008 ; 659 (3) : 221–31.

Champtiaux N, Han Z-Y, Bessis A, Rossi FM, Zoli M, Marubio L, et al.

Distribution and pharmacology of alpha 6-containing nicotinic acetylcholine receptors analyzed with mutant mice.

J Neurosci 2002 ; 22 (4) : 1208–17.

Changeux J-P.

Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice.

Nat Rev Neurosci 2010 ; 11 (6) : 389–401.

Chavez-Noriega LE, Crona JH, Washburn MS, Urrutia A, Elliott KJ, Johnson EC.

Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h alpha 2 beta 2, h alpha 2 beta 4, h alpha 3 beta 2, h alpha 3 beta 4, h alpha 4 beta 2, h alpha 4 beta 4 and h alpha 7 expressed in *Xenopus* oocytes.

J Pharmacol Exp Ther 1997 ; 280 (1) : 346–56.

Chen D, Patrick JW.

The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit.

J Biol Chem 1997 ; 272 (38) : 24024–9.

Chen Q, Rabach L, Noble P, Zheng T, Lee CG, Homer RJ, et al.

IL-11 receptor alpha in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling.

J Immunol 2005 ; 174 (4) : 2305–13.

Christensen TG, Hayes JA.

Endogenous peroxidase in the conducting airways of hamsters: morphologic evidence of synthesis and secretion.

Am Rev Respir Dis 1982 ; 125 (3) : 341–6.

Bibliographie

Conklin BS, Zhao W, Zhong D-S, Chen C.

Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells.
Am J Pathol 2002 ; 160 (2) : 413–8.

Conroy WG, Berg DK.

Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions.

J Biol Chem 1995 ; 270 (9) : 4424–31.

Conroy WG, Saedi MS, Lindstrom J.

TE671 cells express an abundance of a partially mature acetylcholine receptor alpha subunit which has characteristics of an assembly intermediate.

J Biol Chem 1990 ; 265 (35) : 21642–51.

Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD.

Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity?

Eur J Pharmacol 2000 ; 393 (1-3) : 279–94.

Cooke JP, Ghebremariam YT.

Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis.

Trends Cardiovasc Med 2008 ; 18 (7) : 247–53.

Cooper E, Couturier S, Ballivet M.

Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor.

Nature 1991 ; 350 (6315) : 235–8.

Coraux C, Hajj R, Lesimple P, Puchelle E.

[Repair and regeneration of the airway epithelium].

Med Sci (Paris) 2005 ; 21 (12) : 1063–9.

Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP.

Nicotinic receptors at the amino acid level.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 2000 ; 40 : 431–58.

Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J.

Endothelial cells and VEGF in vascular development.

Nature 2005 ; 438 (7070) : 937–45.

Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, et al.

A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX.

Neuron 1990 ; 5 (6) : 847–56.

Cutz E, Chan W, Track NS.

Bombesin, calcitonin and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of human lung.

Experientia 1981 ; 37 (7) : 765–7.

Bibliographie

Cutz E, Perrin DG, Hackman R, Czegledy-Nagy EN.

Maternal smoking and pulmonary neuroendocrine cells in sudden infant death syndrome.

Pediatrics 1996 ; 98 (4 Pt 1) : 668–72.

Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, et al.

Critical role of p63 in the development of a normal esophageal and tracheobronchial epithelium.

Am J Physiol, Cell Physiol 2004 ; 287 (1) : C171–81.

Dasgupta P, Rastogi S, Pillai S, Ordonez-Ercan D, Morris M, Haura E, et al.

Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways.

J Clin Invest 2006 ; 116 (8) : 2208–17.

Dasgupta P, Rizwani W, Pillai S, Kinkade R, Kovacs M, Rastogi S, et al.

Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines.

Int J Cancer 2009 ; 124 (1) : 36–45.

Davis R, Rizwani W, Banerjee S, Kovacs M, Haura E, Coppola D, et al.

Nicotine promotes tumor growth and metastasis in mouse models of lung cancer.

PLoS ONE 2009 ; 4 (10) : e7524.

Deneris ES, Connolly J, Rogers SW, Duvoisin R.

Pharmacological and functional diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Trends Pharmacol Sci 1991 ; 12 (1) : 34–40.

Devillers-Thiéry A, Galzi JL, Eiselé JL, Bertrand S, Bertrand D, Changeux JP.

Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channels.

J Membr Biol 1993 ; 136 (2) : 97–112.

DiPaola M, Czajkowski C, Karlin A.

The sidedness of the COOH terminus of the acetylcholine receptor delta subunit.

J Biol Chem 1989 ; 264 (26) : 15457–63.

DOLL R, HILL AB.

Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report.

Br Med J 1950 ; 2 (4682) : 739–48.

Donnelly GM, Haack DG, Heird CS.

Tracheal epithelium: cell kinetics and differentiation in normal rat tissue.

Cell Tissue Kinet 1982 ; 15 (2) : 119–30.

Drisdel RC, Green WN.

Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers.

J Neurosci 2000 ; 20 (1) : 133–9.

Dupuit F, Gaillard D, Hinnrasky J, Mongodin E, de Bentzmann S, Copreni E, et al.

Differentiated and functional human airway epithelium regeneration in tracheal xenografts.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000 ; 278 (1) : L165–76.

Bibliographie

- Dupuit F, Kälin N, Brézillon S, Hinnrasky J, Tümmler B, Puchelle E.**
CFTR and differentiation markers expression in non-CF and delta F 508 homozygous CF nasal epithelium.
J Clin Invest 1995 ; 96 (3) : 1601–11.
- Duvoisin RM, Deneris ES, Patrick J, Heinemann S.**
The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4.
Neuron 1989 ; 3 (4) : 487–96.
- Edelstein SJ, Changeux JP.**
Allosteric transitions of the acetylcholine receptor.
Adv Protein Chem 1998 ; 51 : 121–84.
- Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P.**
Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis.
Trends Pharmacol Sci 2008 ; 29 (3) : 151–8.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S.**
Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells.
Cell 1994 ; 79 (4) : 705–15.
- Ellefsen P, Tos M.**
Goblet cells in the human trachea. Quantitative studies of normal tracheae.
Anat Anz 1972 ; 130 (5) : 501–20.
- Elwood W, Sakamoto T, Barnes PJ, Chung KF.**
Allergen-induced airway hyperresponsiveness in Brown-Norway rat: role of parasympathetic mechanisms.
J Appl Physiol 1993 ; 75 (1) : 279–84.
- Evans MJ, Plopper CG.**
The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane.
Am Rev Respir Dis 1988 ; 138 (2) : 481–3.
- Falvella FS, Galvan A, Frullanti E, Spinola M, Calabrò E, Carbone A, et al.**
Transcription deregulation at the 15q25 locus in association with lung adenocarcinoma risk.
Clin Cancer Res 2009 ; 15 (5) : 1837–42.
- Fenster CP, Rains MF, Noerager B, Quick MW, Lester RA.**
Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine.
J Neurosci 1997 ; 17 (15) : 5747–59.
- Franke WW, Goldschmidt MD, Zimbelmann R, Mueller HM, Schiller DL, Cowin P.**
Molecular cloning and amino acid sequence of human plakoglobin, the common junctional plaque protein.
Proc Natl Acad Sci USA 1989 ; 86 (11) : 4027–31.
- Fu XW, Lindstrom J, Spindel ER.**
Nicotine Activates and Up-Regulates Nicotinic Acetylcholine Receptors in Bronchial Epithelial Cells.
Am J Respir Cell Mol Biol 2009 ; 41 (1) : 93–9.

Bibliographie

- Fucile S, Matter JM, Erkman L, Ragozzino D, Barabino B, Grassi F, et al.**
The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells.
Eur J Neurosci 1998 ; 10 (1) : 172–8.
- Gahring LC, Rogers SW.**
Neuronal nicotinic acetylcholine receptor expression and function on nonneuronal cells.
AAPS J 2005 ; 7 (4) : E885–94.
- Galvis G, Lips KS, Kummer W.**
Expression of nicotinic acetylcholine receptors on murine alveolar macrophages.
J Mol Neurosci 2006 ; 30 (1-2) : 107–8.
- Galzi JL, Changeux JP.**
Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations.
Neuropharmacology 1995 ; 34 (6) : 563–82.
- Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J.**
« Orphan » alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor.
Mol Pharmacol 1997 ; 51 (2) : 320–7.
- Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, et al.**
Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration.
J Cell Sci 1999 ; 112 (Pt 24) : 4615–25.
- Gilliland FD, Li Y-F, Dubeau L, Berhane K, Avol E, McConnell R, et al.**
Effects of glutathione S-transferase M1, maternal smoking during pregnancy, and environmental tobacco smoke on asthma and wheezing in children.
Am J Respir Crit Care Med 2002 ; 166 (4) : 457–63.
- Goodman MR, Link DW, Brown WR, Nakane PK.**
Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium.
Am Rev Respir Dis 1981 ; 123 (1) : 115–9.
- Gosens R, Zaagsma J, Grootte Bromhaar M, Nelemans A, Meurs H.**
Acetylcholine: a novel regulator of airway smooth muscle remodelling?
Eur J Pharmacol 2004 ; 500 (1-3) : 193–201.
- Gosney JR, Sissons MC, Allibone RO.**
Neuroendocrine cell populations in normal human lungs: a quantitative study.
Thorax 1988 ; 43 (11) : 878–82.
- Gotti C, Clementi F, Fornari A, Gaimarri A, Guiducci S, Manfredi I, et al.**
Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors.
Biochem Pharmacol 2009 ; 78 (7) : 703–11.
- Grando SA, Horton RM, Pereira EF, Diethelm-Okita BM, George PM, Albuquerque EX, et al.**
A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes.
J Invest Dermatol 1995 ; 105 (6) : 774–81.

Bibliographie

Grando SA, Kawashima K, Wessler I.

Introduction: the non-neuronal cholinergic system in humans.

Life Sci 2003 ; 72 (18-19) : 2009–12.

Grando SA, Pittelkow MR, Schallreuter KU.

Adrenergic and cholinergic control in the biology of epidermis: physiological and clinical significance.

J Invest Dermatol 2006 ; 126 (9) : 1948–65.

Grando SA.

Basic and clinical aspects of non-neuronal acetylcholine: biological and clinical significance of non-canonical ligands of epithelial nicotinic acetylcholine receptors.

J Pharmacol Sci 2008 ; 106 (2) : 174–9.

Grando SA.

Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors.

J Invest Dermatol Symp Proc 1997 ; 2 (1) : 41–8.

Grant GA, Luetje CW, Summers R, Xu XL.

Differential roles for disulfide bonds in the structural integrity and biological activity of kappa-Bungarotoxin, a neuronal nicotinic acetylcholine receptor antagonist.

Biochemistry 1998 ; 37 (35) : 12166–71.

Groot-Kormelink PJ, Luyten WH, Colquhoun D, Sivilotti LG.

A reporter mutation approach shows incorporation of the « orphan » subunit beta3 into a functional nicotinic receptor.

J Biol Chem 1998 ; 273 (25) : 15317–20.

Gross A, Ballivet M, Rungger D, Bertrand D.

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes: role of the alpha subunit in agonist sensitivity and desensitization.

Pflugers Arch 1991 ; 419 (5) : 545–51.

Grozio A, Paleari L, Catassi A, Servent D, Cilli M, Piccardi F, et al.

Natural agents targeting the alpha7-nicotinic-receptor in NSCLC: a promising prospective in anti-cancer drug development.

Int J Cancer 2008 ; 122 (8) : 1911–5.

Gutcher I, Webb PR, Anderson NG.

The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C.

Cell Mol Life Sci 2003 ; 60 (6) : 1061–70.

Gwilt CR, Donnelly LE, Rogers DF.

The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation?

Pharmacol Ther 2007 ; 115 (2) : 208–22.

Hajj R, Baranek T, Le Naour R, Lesimple P, Puchelle E, Coraux C.

Basal cells of the human adult airway surface epithelium retain transit-amplifying cell properties.

Stem Cells 2007 ; 25 (1) : 139–48.

Hanahan D, Weinberg RA.

Hallmarks of cancer: the next generation.
Cell 2011 ; 144 (5) : 646–74.

Harvey SC, McIntosh JM, Cartier GE, Maddox FN, Luetje CW.

Determinants of specificity for alpha-conotoxin MII on alpha3beta2 neuronal nicotinic receptors.
Mol Pharmacol 1997 ; 51 (2) : 336–42.

Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP.

A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors.
J Clin Invest 2002 ; 110 (4) : 527–36.

Hiemstra PS.

Epithelial antimicrobial peptides and proteins: their role in host defence and inflammation.
Paediatr Respir Rev 2001 ; 2 (4) : 306–10.

Ho Y-S, Chen C-H, Wang Y-J, Pestell RG, Albanese C, Chen R-J, et al.

Tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induces cell proliferation in normal human bronchial epithelial cells through NFkappaB activation and cyclin D1 up-regulation.
Toxicol Appl Pharmacol 2005 ; 205 (2) : 133–48.

Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D.

Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function.
Rev Physiol Biochem Pharmacol 2003 ; 147 : 1–46.

Horiguchi K, Horiguchi S, Yamashita N, Irie K, Masuda J, Takano-Ohmuro H, et al.

Expression of SLURP-1, an endogenous alpha7 nicotinic acetylcholine receptor allosteric ligand, in murine bronchial epithelial cells.
J Neurosci Res 2009 ; 87 (12) : 2740–7.

Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, et al.

Evolutional study on acetylcholine expression.
Life Sci 2003 ; 72 (15) : 1745–56.

Hung RJ, McKay JD, Gaborieau V, Boffetta P, Hashibe M, Zaridze D, et al.

A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25.
Nature 2008 ; 452 (7187) : 633–7.

Improgo MR, Tapper AR, Gardner PD.

Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer.
Biochem Pharmacol 2011 ; 82 (8) : 1015–21.

Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA.

Structure and functions of classical cadherins.
Biochemistry Mosc 2001 ; 66 (10) : 1174–86.

Bibliographie

Jame AJ, Lackie PM, Cazaly AM, Sayers I, Penrose JF, Holgate ST, et al.

Human bronchial epithelial cells express an active and inducible biosynthetic pathway for leukotrienes B4 and C4.

Clin Exp Allergy 2007 ; 37 (6) : 880–92.

Jarzynka MJ, Guo P, Bar-Joseph I, Hu B, Cheng S-Y.

Estradiol and nicotine exposure enhances A549 bronchioloalveolar carcinoma xenograft growth in mice through the stimulation of angiogenesis.

Int J Oncol 2006 ; 28 (2) : 337–44.

Jeffery PK.

Morphologic features of airway surface epithelial cells and glands.

Am Rev Respir Dis 1983 ; 128 (2 Pt 2) : S14–20.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D.

Global cancer statistics.

CA Cancer J Clin 2011 ; 61 (2) : 69–90.

Jin Z, Gao F, Flagg T, Deng X.

Nicotine induces multi-site phosphorylation of Bad in association with suppression of apoptosis.

J Biol Chem 2004 ; 279 (22) : 23837–44.

Joos GF, De Swert KO, Pauwels RA.

Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists.

Eur J Pharmacol 2001 ; 429 (1-3) : 239–50.

Kaiser SA, Soliakov L, Harvey SC, Luetje CW, Wonnacott S.

Differential inhibition by alpha-conotoxin-MII of the nicotinic stimulation of [3H]dopamine release from rat striatal synaptosomes and slices.

J Neurochem 1998 ; 70 (3) : 1069–76.

Kaliner MA.

Human nasal respiratory secretions and host defense.

Am Rev Respir Dis 1991 ; 144 (3 Pt 2) : S52–6.

Kauffman SL.

Cell proliferation in the mammalian lung.

Int Rev Exp Pathol 1980 ; 22 : 131–91.

Kawashima K, Fujii T.

Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes.

Pharmacol Ther 2000 ; 86 (1) : 29–48.

Kawashima K, Fujii T.

The lymphocytic cholinergic system and its biological function.

Life Sci 2003a ; 72 (18-19) : 2101–9.

Kawashima K, Fujii T.

The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity.

Life Sci 2003b ; 74 (6) : 675–96.

Bibliographie

Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, et al.

Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems.

Life Sci 2007 ; 80 (24-25) : 2206–9.

Kerr KM.

Pulmonary preinvasive neoplasia.

J Clin Pathol 2001 ; 54 (4) : 257–71.

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, Wessler I.

The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance.

Jpn J Pharmacol 2001 ; 85 (1) : 24–8.

Kitamura H, Yazawa T, Sato H, Okudela K, Shimoyamada H.

Small cell lung cancer: significance of RB alterations and TTF-1 expression in its carcinogenesis, phenotype, and biology.

Endocr Pathol 2009 ; 20 (2) : 101–7.

Kiyohara C, Ohno Y.

Sex differences in lung cancer susceptibility: a review.

Gend Med 2010 ; 7 (5) : 381–401.

Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Münch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, et al.

Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1997 ; 355 (4) : 515–23.

Knowles MR, Boucher RC.

Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways.

J Clin Invest 2002 ; 109 (5) : 571–7.

Krais AM, Hautefeuille AH, Cros M-P, Krutovskikh V, Tournier J-M, Birembaut P, et al.

CHRNA5 as negative regulator of nicotine signaling in normal and cancer bronchial cells: effects on motility, migration and p63 expression.

Carcinogenesis 2011 ; 32 (9) : 1388–95.

Kumar NM, Gilula NB.

The gap junction communication channel.

Cell 1996 ; 84 (3) : 381–8.

Kummer W, Lips KS, Pfeil U.

The epithelial cholinergic system of the airways.

Histochem Cell Biol 2008 ; 130 (2) : 219–34.

Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, et al.

Role of acetylcholine and muscarinic receptors in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse.

J Mol Neurosci 2006 ; 30 (1-2) : 67–8.

Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J.

Human alpha6 AChR subtypes: subunit composition, assembly, and pharmacological responses.

Neuropharmacology 2000 ; 39 (13) : 2570–90.

Bibliographie

Laag E, Majidi M, Cekanova M, Masi T, Takahashi T, Schuller HM.

NNK activates ERK1/2 and CREB/ATF-1 via beta-1-AR and EGFR signaling in human lung adenocarcinoma and small airway epithelial cells.

Int J Cancer 2006 ; 119 (7) : 1547–52.

Lam DC-L, Girard L, Ramirez R, Chau W-S, Suen W-sing, Sheridan S, et al.

Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers.

Cancer Res 2007 ; 67 (10) : 4638–47.

Lambers DS, Clark KE.

The maternal and fetal physiologic effects of nicotine.

Semin Perinatol 1996 ; 20 (2) : 115–26.

Léna C, Changeux JP.

Allosteric modulations of the nicotinic acetylcholine receptor.

Trends Neurosci 1993 ; 16 (5) : 181–6.

Leube RE, Rustad TJ.

Squamous cell metaplasia in the human lung: molecular characteristics of epithelial stratification.

Virchows Arch, B, Cell Pathol 1991 ; 61 (4) : 227–53.

Li X-W, Wang H.

Non-neuronal nicotinic alpha 7 receptor, a new endothelial target for revascularization.

Life Sci 2006 ; 78 (16) : 1863–70.

Lindstrom J, Anand R, Gerzanich V, Peng X, Wang F, Wells G.

Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Prog Brain Res 1996 ; 109 : 125–37.

Lips KS, Lührmann A, Tschernig T, Stoeger T, Alessandrini F, Grau V, et al.

Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse.

Life Sci 2007 ; 80 (24-25) : 2263–9.

Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, et al.

Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 2005 ; 33 (1) : 79–88.

Luetje CW, Maddox FN, Harvey SC.

Glycosylation within the cysteine loop and six residues near conserved Cys192/Cys193 are

determinants of neuronal bungarotoxin sensitivity on the neuronal nicotinic receptor alpha3 subunit.

Mol Pharmacol 1998 ; 53 (6) : 1112–9.

Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, et al.

International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits.

Pharmacol Rev 1999 ; 51 (2) : 397–401.

Bibliographie

Luo J, Taylor P, Losen M, de Baets MH, Shelton GD, Lindstrom J.

Main immunogenic region structure promotes binding of conformation-dependent myasthenia gravis autoantibodies, nicotinic acetylcholine receptor conformation maturation, and agonist sensitivity.
J Neurosci 2009 ; 29 (44) : 13898–908.

Lustig LR, Peng H, Hiel H, Yamamoto T, Fuchs PA.

Molecular cloning and mapping of the human nicotinic acetylcholine receptor alpha10 (CHRNA10).
Genomics 2001 ; 73 (3) : 272–83.

Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM.

Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors.
J Pharmacol Exp Ther 1998 ; 287 (1) : 435–9.

Mai H, May WS, Gao F, Jin Z, Deng X.

A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis.
J Biol Chem 2003 ; 278 (3) : 1886–91.

Majidi M, Al-Wadei HA, Takahashi T, Schuller HM.

Nongenomic beta estrogen receptors enhance beta1 adrenergic signaling induced by the nicotine-derived carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in human small airway epithelial cells.
Cancer Res 2007 ; 67 (14) : 6863–71.

Mak JC, Barnes PJ.

Autoradiographic visualization of muscarinic receptor subtypes in human and guinea pig lung.
Am Rev Respir Dis 1990 ; 141 (6) : 1559–68.

Maneckjee R, Minna JD.

Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines.
Proc Natl Acad Sci USA 1990 ; 87 (9) : 3294–8.

Maouche K, Polette M, Jolly T, Medjber K, Cloëz-Tayarani I, Changeux J-P, et al.

{alpha}7 nicotinic acetylcholine receptor regulates airway epithelium differentiation by controlling basal cell proliferation.
Am J Pathol 2009 ; 175 (5) : 1868–82.

Maus AD, Pereira EF, Karachunski PI, Horton RM, Navaneetham D, Macklin K, et al.

Human and rodent bronchial epithelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors.
Mol Pharmacol 1998 ; 54 (5) : 779–88.

McCrea PD, Popot JL, Engelman DM.

Transmembrane topography of the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit.
EMBO J 1987 ; 6 (12) : 3619–26.

McDowell EM, Combs JW, Newkirk C.

Changes in secretory cells of hamster tracheal epithelium in response to acute sublethal injury: a quantitative study.
Exp Lung Res 1983 ; 4 (3) : 227–43.

Bibliographie

McGehee DS, Role LW.

Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons.
Annu Rev Physiol 1995 ; 57 : 521–46.

McIntosh JM, Azam L, Staheli S, Dowell C, Lindstrom JM, Kuryatov A, et al.

Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for alpha6-containing nicotinic acetylcholine receptors.
Mol Pharmacol 2004 ; 65 (4) : 944–52.

Mercer RR, Russell ML, Roggli VL, Crapo JD.

Cell number and distribution in human and rat airways.
Am J Respir Cell Mol Biol 1994 ; 10 (6) : 613–24.

Metzen J, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H, Wessler I.

Proliferative effect of acetylcholine on rat trachea epithelial cells is mediated by nicotinic receptors and muscarinic receptors of the M1-subtype.
Life Sci 2003 ; 72 (18-19) : 2075–80.

Millar NS.

Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors.
Biochem Soc Trans 2003 ; 31 (Pt 4) : 869–74.

Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N.

Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall.
J Mol Biol 1999 ; 288 (4) : 765–86.

Mogi A, Kuwano H.

TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer.
J Biomed Biotechnol 2011 ; 2011 : 583929.

Nadel JA.

Regulation of airway secretions.
Chest 1985 ; 87 (1 Suppl) : 111S-113S.

Nakajima M, Kawanami O, Jin E, Ghazizadeh M, Honda M, Asano G, et al.

Immunohistochemical and ultrastructural studies of basal cells, Clara cells and bronchiolar cuboidal cells in normal human airways.
Pathol Int 1998 ; 48 (12) : 944–53.

Ng MKC, Wu J, Chang E, Wang B-yin, Katzenberg-Clark R, Ishii-Watabe A, et al.

A central role for nicotinic cholinergic regulation of growth factor-induced endothelial cell migration.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007 ; 27 (1) : 106–12.

Nguyen VT, Chernyavsky AI, Arredondo J, Bercovich D, Orr-Urtreger A, Vetter DE, et al.

Synergistic control of keratinocyte adhesion through muscarinic and nicotinic acetylcholine receptor subtypes.
Exp Cell Res 2004 ; 294 (2) : 534–49.

Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, et al.

Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits.
Nature 1983 ; 302 (5908) : 528–32.

Bibliographie

Oda Y, Nakanishi I, Deguchi T.

A complementary DNA for human choline acetyltransferase induces two forms of enzyme with different molecular weights in cultured cells.

Brain Res Mol Brain Res 1992 ; 16 (3-4) : 287–94.

Ohtani M, Oka T, Badyuk M, Xiao Y, Kellar KJ, Daly JW.

Mouse beta-TC6 insulinoma cells: high expression of functional alpha3beta4 nicotinic receptors mediating membrane potential, intracellular calcium, and insulin release.

Mol Pharmacol 2006 ; 69 (3) : 899–907.

Olivier M, Taniere P.

Somatic mutations in cancer prognosis and prediction: lessons from TP53 and EGFR genes.

Curr Opin Oncol 2011 ; 23 (1) : 88–92.

Ozlu T, Bülbül Y.

Smoking and lung cancer.

Tuberk Toraks 2005 ; 53 (2) : 200–9.

Pao W, Girard N.

New driver mutations in non-small-cell lung cancer.

Lancet Oncol 2011 ; 12 (2) : 175–80.

Papke RL, Boulter J, Patrick J, Heinemann S.

Single-channel currents of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes.

Neuron 1989 ; 3 (5) : 589–96.

Papke RL, Duvoisin RM, Heinemann SF.

The amino terminal half of the nicotinic beta-subunit extracellular domain regulates the kinetics of inhibition by neuronal bungarotoxin.

Proc Biol Sci 1993 ; 252 (1334) : 141–8.

Park K-S, Wells JM, Zorn AM, Wert SE, Laubach VE, Fernandez LG, et al.

Transdifferentiation of ciliated cells during repair of the respiratory epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 34 (2) : 151–7.

Parsons SM.

Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage.

FASEB J 2000 ; 14 (15) : 2423–34.

Pereira EFR, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX.

Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors.

J Neurobiol 2002 ; 53 (4) : 479–500.

Pfeil U, Haberberger RV, Lips KS, Eberling L, Grau V, Kummer W.

Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in epithelia.

Life Sci 2003a ; 72 (18-19) : 2087–90.

Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W.

Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea.

Am J Respir Cell Mol Biol 2003b ; 28 (4) : 473–7.

Bibliographie

Pillai SG, Ge D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AC, et al.

A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci.

PLoS Genet 2009 ; 5 (3) : e1000421.

Plummer HK 3rd, Dhar M, Schuller HM.

Expression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human lung cells.

Respir Res 2005 ; 6 : 29.

Polak JM, Becker KL, Cutz E, Gail DB, Goniakowska-Witalinska L, Gosney JR, et al.

Lung endocrine cell markers, peptides, and amines.

Anat Rec 1993 ; 236 (1) : 169–71.

Porter JL, Bukey BR, Geyer AJ, Willnauer CP, Reynolds PR.

Immunohistochemical detection and regulation of $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits by FoxA2 during mouse lung organogenesis.

Respir Res 2011 ; 12 : 82.

Prado MAM, Reis RAM, Prado VF, de Mello MC, Gomez MV, de Mello FG.

Regulation of acetylcholine synthesis and storage.

Neurochem Int 2002 ; 41 (5) : 291–9.

Profita M, Bonanno A, Montalbano AM, Ferraro M, Siena L, Bruno A, et al.

Cigarette smoke extract activates human bronchial epithelial cells affecting non-neuronal cholinergic system signalling in vitro.

Life Sci 2011 ; 89 (1-2) : 36–43.

Profita M, Giorgi RD, Sala A, Bonanno A, Riccobono L, Mirabella F, et al.

Muscarinic receptors, leukotriene B4 production and neutrophilic inflammation in COPD patients.

Allergy 2005 ; 60 (11) : 1361–9.

Profita M, Sala A, Riccobono L, Pace E, Paternò A, Zarini S, et al.

15(S)-HETE modulates LTB(4) production and neutrophil chemotaxis in chronic bronchitis.

Am J Physiol, Cell Physiol 2000 ; 279 (4) : C1249–58.

Proskocil BJ, Sekhon HS, Jia Y, Savchenko V, Blakely RD, Lindstrom J, et al.

Acetylcholine is an autocrine or paracrine hormone synthesized and secreted by airway bronchial epithelial cells.

Endocrinology 2004 ; 145 (5) : 2498–506.

Puchelle E, Gaillard D, Ploton D, Hinnrasky J, Fuchey C, Bouterin MC, et al.

Differential localization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis airway epithelium.

Am J Respir Cell Mol Biol 1992 ; 7 (5) : 485–91.

Qian J, Galitovskiy V, Chernyavsky AI, Marchenko S, Grando SA.

Plasticity of the murine spleen T-cell cholinergic receptors and their role in in vitro differentiation of naïve CD4 T cells toward the Th1, Th2 and Th17 lineages.

Genes Immun 2011 ; 12 (3) : 222–30.

Bibliographie

Racké K, Juergens UR, Matthiesen S.

Control by cholinergic mechanisms.

Eur J Pharmacol 2006 ; 533 (1-3) : 57–68.

Racké K, Matthiesen S.

The airway cholinergic system: physiology and pharmacology.

Pulm Pharmacol Ther 2004 ; 17 (4) : 181–98.

Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L.

Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels.

Nature 1996 ; 380 (6572) : 347–51.

Randell SH, Boucher RC.

Effective mucus clearance is essential for respiratory health.

Am J Respir Cell Mol Biol 2006 ; 35 (1) : 20–8.

Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racké K, et al.

Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa.

Am J Physiol 1996 ; 270 (5 Pt 1) : L722–8.

Reinheimer T, Münch M, Bittinger F, Racké K, Kirkpatrick CJ, Wessler I.

Glucocorticoids mediate reduction of epithelial acetylcholine content in the airways of rats and humans.

Eur J Pharmacol 1998 ; 349 (2-3) : 277–84.

Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiéry A, Mulle C, Hussy N, et al.

Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor.

Nature 1991 ; 353 (6347) : 846–9.

Reyland ME.

Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death.

Front Biosci 2009 ; 14 : 2386–99.

Reynolds PR, Allison CH, Willnauer CP.

TTF-1 regulates $\alpha 5$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits in proximal and distal lung epithelium.

Respir Res 2010 ; 11 : 175.

Reynolds PR, Hoidal JR.

Temporal-spatial expression and transcriptional regulation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor by thyroid transcription factor-1 and early growth response factor-1 during murine lung development.

J Biol Chem 2005 ; 280 (37) : 32548–54.

Rhodin JA.

The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa.

Am Rev Respir Dis 1966 ; 93 (3) : Suppl:1–15.

Richardson SB, Prasad JA, Hollander CS.

Acetylcholine, melatonin, and potassium depolarization stimulate release of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus in vitro.

Proc Natl Acad Sci USA 1982 ; 79 (8) : 2686–9.

Bibliographie

Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al.

Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium.
Proc Natl Acad Sci USA 2009 ; 106 (31) : 12771–5.

Rogers DF.

Motor control of airway goblet cells and glands.
Respir Physiol 2001 ; 125 (1-2) : 129–44.

Rogers DF.

The airway goblet cell.
Int J Biochem Cell Biol 2003 ; 35 (1) : 1–6.

Role LW.

Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels.
Curr Opin Neurobiol 1992 ; 2 (3) : 254–62.

Rose MC, Nickola TJ, Voynow JA.

Airway mucus obstruction: mucin glycoproteins, MUC gene regulation and goblet cell hyperplasia.
Am J Respir Cell Mol Biol 2001 ; 25 (5) : 533–7.

Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al.

The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans.
Cancer Res 2009a ; 69 (17) : 6848–56.

Saccone NL, Wang JC, Breslau N, Johnson EO, Hatsukami D, Saccone SF, et al.

The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans.
Cancer Res 2009b ; 69 (17) : 6848–56.

Saccone SF, Hinrichs AL, Saccone NL, Chase GA, Konvicka K, Madden PAF, et al.

Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs.
Hum Mol Genet 2007 ; 16 (1) : 36–49.

Saez JC, Spray DC, Nairn AC, Hertzberg E, Greengard P, Bennett MV.

cAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide.
Proc Natl Acad Sci USA 1986 ; 83 (8) : 2473–7.

Satelli A, Li S.

Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.
Cell Mol Life Sci 2011 ; 68 (18) : 3033–46.

Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, et al.

The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin.
Reproduction 2011 ; 142 (1) : 157–66.

Schoepfer R, Conroy WG, Whiting P, Gore M, Lindstrom J.

Brain alpha-bungarotoxin binding protein cDNAs and MAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel gene superfamily.
Neuron 1990 ; 5 (1) : 35–48.

Bibliographie

Schuller HM, McGavin MD, Orloff M, Riechert A, Porter B.

Simultaneous exposure to nicotine and hyperoxia causes tumors in hamsters.
Lab Invest 1995 ; 73 (3) : 448–56.

Schuller HM, Tithof PK, Williams M, Plummer H 3rd.

The tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone is a beta-adrenergic agonist and stimulates DNA synthesis in lung adenocarcinoma via beta-adrenergic receptor-mediated release of arachidonic acid.
Cancer Res 1999 ; 59 (18) : 4510–5.

Schuller HM.

Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors?
Nat Rev Cancer 2009 ; 9 (3) : 195–205.

Schuller HM.

Neurotransmitter receptor-mediated signaling pathways as modulators of carcinogenesis.
Prog Exp Tumor Res 2007 ; 39 : 45–63.

Schutte BC, McCray PB Jr.

[beta]-defensins in lung host defense.
Annu Rev Physiol 2002 ; 64 : 709–48.

Schwartz AG, Cote ML, Wenzlaff AS, Land S, Amos CI.

Racial differences in the association between SNPs on 15q25.1, smoking behavior, and risk of non-small cell lung cancer.
J Thorac Oncol 2009 ; 4 (10) : 1195–201.

Sekhon HS, Jia Y, Raab R, Kuryatov A, Pankow JF, Whitsett JA, et al.

Prenatal nicotine increases pulmonary alpha7 nicotinic receptor expression and alters fetal lung development in monkeys.
J Clin Invest 1999 ; 103 (5) : 637–47.

Sekhon HS, Keller JA, Proskocil BJ, Martin EL, Spindel ER.

Maternal nicotine exposure upregulates collagen gene expression in fetal monkey lung. Association with alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.
Am J Respir Cell Mol Biol 2002 ; 26 (1) : 31–41.

Sekhon HS, Proskocil BJ, Clark JA, Spindel ER.

Prenatal nicotine exposure increases connective tissue expression in foetal monkey pulmonary vessels.
Eur Respir J 2004 ; 23 (6) : 906–15.

Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, et al.

A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit.
Mol Pharmacol 2002 ; 61 (1) : 150–9.

Sharpley CG, Kaiser S, Soliakov L, Marks MJ, Collins AC, Washburn M, et al.

UB-165: a novel nicotinic agonist with subtype selectivity implicates the alpha4beta2* subtype in the modulation of dopamine release from rat striatal synaptosomes.
J Neurosci 2000 ; 20 (8) : 2783–91.

Shebani E, Shahana S, Janson C, Roomans GM.

Attachment of columnar airway epithelial cells in asthma.

Tissue Cell 2005 ; 37 (2) : 145–52.

Shigematsu H, Gazdar AF.

Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers.

Int J Cancer 2006 ; 118 (2) : 257–62.

Singh S, Pillai S, Chellappan S.

Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis.

J Oncol 2011 ; 2011 : 456743.

Small RC, Good DM, Dixon JS, Kennedy I.

The effects of epithelium removal on the actions of cholinomimetic drugs in opened segments and perfused tubular preparations of guinea-pig trachea.

Br J Pharmacol 1990 ; 100 (3) : 516–22.

Smith DR, Beh EJ.

Hirayama, passive smoking and lung cancer: 30 years on and the numbers still don't lie.

Public Health 2011 ; 125 (4) : 179–81.

Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, et al.

Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma.

Cancer Res 2003 ; 63 (1) : 214–21.

Spina D.

Epithelium smooth muscle regulation and interactions.

Am J Respir Crit Care Med 1998 ; 158 (5 Pt 3) : S141–5.

Spitz MR, Amos CI, Dong Q, Lin J, Wu X.

The CHRNA5-A3 region on chromosome 15q24-25.1 is a risk factor both for nicotine dependence and for lung cancer.

J Natl Cancer Inst 2008 ; 100 (21) : 1552–6.

Stevens TP, McBride JT, Peake JL, Pinkerton KE, Stripp BR.

Cell proliferation contributes to PNEC hyperplasia after acute airway injury.

Am J Physiol 1997 ; 272 (3 Pt 1) : L486–93.

Sunday ME, Hua J, Dai HB, Nusrat A, Torday JS.

Bombesin increases fetal lung growth and maturation in utero and in organ culture.

Am J Respir Cell Mol Biol 1990 ; 3 (3) : 199–205.

Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, et al.

A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease.

Nature 2008 ; 452 (7187) : 638–42.

Tournier J-M, Maouche K, Coraux C, Zahm J-M, Cloëz-Tayarani I, Nawrocki-Raby B, et al.

alpha3alpha5beta2-Nicotinic acetylcholine receptor contributes to the wound repair of the respiratory epithelium by modulating intracellular calcium in migrating cells.

Am J Pathol 2006 ; 168 (1) : 55–68.

Bibliographie

Trinkaus-Randall V, Gipson IK.

Role of calcium and calmodulin in hemidesmosome formation in vitro.

J Cell Biol 1984 ; 98 (4) : 1565–71.

Trombino S, Cesario A, Margaritora S, Granone P, Motta G, Falugi C, et al.

Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway.

Cancer Res 2004 ; 64 (1) : 135–45.

Tsetlin V, Kuzmin D, Kasheverov I.

Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors.

J Neurochem 2011 ; 116 (5) : 734–41.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M.

Multifunctional strands in tight junctions.

Nat Rev Mol Cell Biol 2001 ; 2 (4) : 285–93.

Tsuruta D, Hopkinson SB, Jones JCR.

Hemidesmosome protein dynamics in live epithelial cells.

Cell Motil Cytoskeleton 2003 ; 54 (2) : 122–34.

Tucek S, Rincý J, Dolezal V.

Acetylcoenzyme A and the control of the synthesis of acetylcholine in the brain.

Acta Neurobiol Exp (Wars) 1982 ; 42 (1) : 59–68.

Unwin N.

Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution.

J Mol Biol 1993 ; 229 (4) : 1101–24.

Varsano S, Basbaum CB, Forsberg LS, Borson DB, Caughey G, Nadel JA.

Dog tracheal epithelial cells in culture synthesize sulfated macromolecular glycoconjugates and release them from the cell surface upon exposure to extracellular proteinases.

Exp Lung Res 1987 ; 13 (2) : 157–84.

Verdugo P.

Goblet cells secretion and mucogenesis.

Annu Rev Physiol 1990 ; 52 : 157–76.

Wada E, Wada K, Boulter J, Deneris E, Heinemann S, Patrick J, et al.

Distribution of alpha 2, alpha 3, alpha 4, and beta 2 neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat.

J Comp Neurol 1989 ; 284 (2) : 314–35.

Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, et al.

Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits.

J Biol Chem 1996a ; 271 (30) : 17656–65.

Wang JC, Cruchaga C, Saccone NL, Bertelsen S, Liu P, Budde JP, et al.

Risk for nicotine dependence and lung cancer is conferred by mRNA expression levels and amino acid change in CHRNA5.

Hum Mol Genet 2009 ; 18 (16) : 3125–35.

Bibliographie

Wang Y, Pereira EF, Maus AD, Ostlie NS, Navaneetham D, Lei S, et al.

Human bronchial epithelial and endothelial cells express alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.
Mol Pharmacol 2001 ; 60 (6) : 1201–9.

Wang ZZ, Hardy SF, Hall ZW.

Membrane tethering enables an extracellular domain of the acetylcholine receptor alpha subunit to form a heterodimeric ligand-binding site.
J Cell Biol 1996b ; 135 (3) : 809–17.

Wanner A, Salathé M, O’Riordan TG.

Mucociliary clearance in the airways.
Am J Respir Crit Care Med 1996 ; 154 (6 Pt 1) : 1868–902.

Weichselbaum M, Sparrow MP, Hamilton EJ, Thompson PJ, Knight DA.

A confocal microscopic study of solitary pulmonary neuroendocrine cells in human airway epithelium.
Respir Res 2005 ; 6 : 115.

Weiss RB, Baker TB, Cannon DS, von Niederhausern A, Dunn DM, Matsunami N, et al.

A candidate gene approach identifies the CHRNA5-A3-B4 region as a risk factor for age-dependent nicotine addiction.
PLoS Genet 2008 ; 4 (7) : e1000125.

Wess J, Eglén RM, Gautam D.

Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development.
Nat Rev Drug Discov 2007 ; 6 (9) : 721–33.

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Kirkpatrick CJ.

The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans.
Jpn J Pharmacol 2001 ; 85 (1) : 2–10.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.

Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans.
Pharmacol Ther 1998 ; 77 (1) : 59–79.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K.

The cholinergic « pitfall »: acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans.
Clin Exp Pharmacol Physiol 1999 ; 26 (3) : 198–205.

Wessler IK, Kirkpatrick CJ.

The Non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways.
Pulm Pharmacol Ther 2001 ; 14 (6) : 423–34.

West KA, Brognard J, Clark AS, Linnoila IR, Yang X, Swain SM, et al.

Rapid Akt activation by nicotine and a tobacco carcinogen modulates the phenotype of normal human airway epithelial cells.
J Clin Invest 2003 ; 111 (1) : 81–90.

Bibliographie

Wharton J, Polak JM, Bloom SR, Ghatei MA, Solcia E, Brown MR, et al.

Bombesin-like immunoreactivity in the lung.
Nature 1978 ; 273 (5665) : 769–70.

White HL, Wu JC.

Separation of apparent multiple forms of human brain choline acetyltransferase by isoelectric focusing.
J Neurochem 1973 ; 21 (4) : 939–47.

Wongtrakool C, Roser-Page S, Rivera HN, Roman J.

Nicotine alters lung branching morphogenesis through the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007 ; 293 (3) : L611–8.

Wright SC, Zhong J, Zheng H, Larrick JW.

Nicotine inhibition of apoptosis suggests a role in tumor promotion.
FASEB J 1993 ; 7 (11) : 1045–51.

Wu C-H, Lee C-H, Ho Y-S.

Nicotinic acetylcholine receptor-based blockade: applications of molecular targets for cancer therapy.
Clin Cancer Res 2011 ; 17 (11) : 3533–41.

Xin M, Deng X.

Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation.
J Biol Chem 2005 ; 280 (11) : 10781–9.

Xu L, Deng X.

Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of mu- and m-calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion.
J Biol Chem 2004 ; 279 (51) : 53683–90.

Yamada KM, Geiger B.

Molecular interactions in cell adhesion complexes.
Curr Opin Cell Biol 1997 ; 9 (1) : 76–85.

Young RP, Hopkins RJ, Hay BA, Epton MJ, Black PN, Gamble GD.

Lung cancer gene associated with COPD: triple whammy or possible confounding effect?
Eur Respir J 2008 ; 32 (5) : 1158–64.

Zahm JM, Pierrot D, Vaquez-Girod S, Duvivier C, King M, Puchelle E.

The role of mucus sol phase in clearance by simulated cough.
Biorheology 1989 ; 26 (4) : 747–52.

Zeidler R, Albermann K, Lang S.

Nicotine and apoptosis.
Apoptosis 2007 ; 12 (11) : 1927–43.

Zetter BR.

Angiogenesis and tumor metastasis.
Annu Rev Med 1998 ; 49 : 407–24.

Bibliographie

Zhang J, Kamdar O, Le W, Rosen GD, Upadhyay D.

Nicotine induces resistance to chemotherapy by modulating mitochondrial signaling in lung cancer.
Am J Respir Cell Mol Biol 2009 ; 40 (2) : 135–46.

Zhang W, Du L, Gunst SJ.

The effects of the small GTPase RhoA on the muscarinic contraction of airway smooth muscle result from its role in regulating actin polymerization.
Am J Physiol, Cell Physiol 2010 ; 299 (2) : C298–306.

Zia S, Ndoye A, Lee TX, Webber RJ, Grando SA.

Receptor-mediated inhibition of keratinocyte migration by nicotine involves modulations of calcium influx and intracellular concentration.
J Pharmacol Exp Ther 2000 ; 293 (3) : 973–81.

Zia S, Ndoye A, Nguyen VT, Grando SA.

Nicotine enhances expression of the alpha 3, alpha 4, alpha 5, and alpha 7 nicotinic receptors modulating calcium metabolism and regulating adhesion and motility of respiratory epithelial cells.
Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1997 ; 97 (3) : 243–62.

Zoli M, Le Novère N, Hill JA Jr, Changeux JP.

Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems.
J Neurosci 1995 ; 15 (3 Pt 1) : 1912–39.