

TH/M100

TH2.1419  
PJF



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 nicotiques 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  
Examinateur  
Examinateur  
Examinateur  
Directeur de thèse

Tabouret 21

<b>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>16</b>
<b>A- Introduction générale</b> .....	<b>16</b>
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>B- Les cancers broncho-pulmonaires</b> .....	<b>25</b>
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

<b>C- Le système cholinergique de l'appareil respiratoire .....</b>	<b>36</b>
I- Le système cholinergique neuronal .....	36
I-1 Généralités .....	36
I-2 L'acétylcholine neuronale.....	36
II- Le système cholinergique non-neuronale 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
<b>D- Les cancers broncho-pulmonaires et le polymorphisme des nAChRs.....</b>	<b>56</b>
I- Généralités .....	56
II- Le polymorphisme nucléotidique des nAChRs.....	56
III- Rôle du polymorphisme CHRNA3/A5/B4 dans les cancers broncho-pulmonaires..	58
<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE .....</b>	<b>59</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>61</b>

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
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>78</b>

<b>A-</b>	<b>Implication des nAChRs <math>\alpha 7</math> et nAChRs <math>\alpha 3\alpha 5\beta 2</math> dans la progression des cancers pulmonaires non à petites cellules.....</b>	<b>78</b>
I-	Expression des nAChRs $\alpha 7$ et nAChRs $\alpha 3\alpha 5\beta 2$ dans les tissus bronchiques humains 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>B-</b>	<b>Etude de l'implication du polymorphisme rs16969968 de la sous-unité <math>\alpha 5</math> dans le développement des cancers broncho-pulmonaires .....</b>	<b>93</b>
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

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>113</b>

## 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