



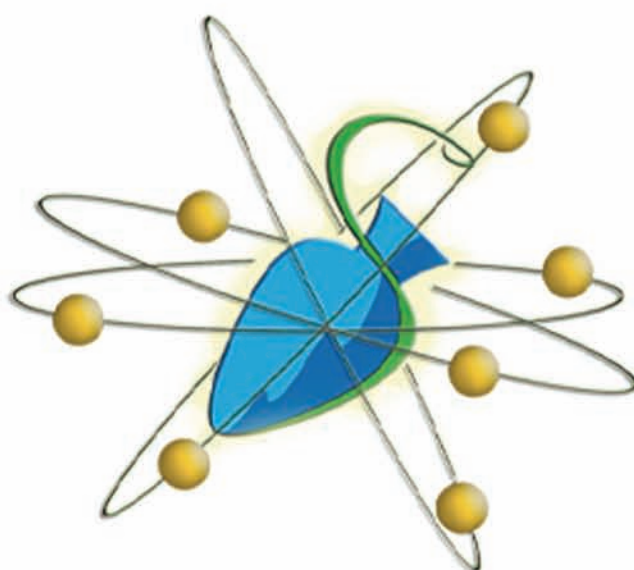
FACULTÉ DE PHARMACIE  
DE MARSEILLE

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE  
AIX-MARSEILLE II



UNIVERSITÉ  
DE LA MÉDITERRANÉE  
AIX-MARSEILLE II

# 7<sup>ème</sup> Journée de la Recherche

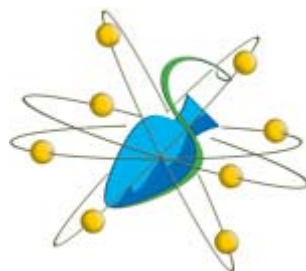


## de la Faculté de Pharmacie

**Inserm**



**Mercredi 24 Mars 2010**



## Programme de la Journée

### 13h30 - 15h00 - Grand hall

Communications autour des posters

### 15h00 - 16h00 - Salle TD 13

Table ronde animée par des enseignants-chercheurs et des étudiants en thèse :  
Les Pharmaciens et les métiers de la recherche ?

### Amphithéâtre 3

#### 16h00

Ouverture de la 7<sup>ème</sup> Journée de la Recherche

*Pr. P. Vanelle et Pr. F. Dignat George*

#### 16h15 - 17h30

Communications orales par les doctorants

- Le cycle de *Plasmodium falciparum* : Rôle de la protéine kinase AMPc dépendante.  
*UMR MD3 - Dr. Nathalie WURTZ*
- Analyse génomique d'une souche d'*Enterobacter aerogenes* multirésistante isolée chez l'homme.  
*URMITE / UMR 6236 - Dr. Seydina DIENE*
- Rôle de PTK7 dans l'hématopoïèse normale et pathologique. Développement d'un modèle murin.  
*UMR 891 - Dr. Anne-Catherine LHOUMEAU*

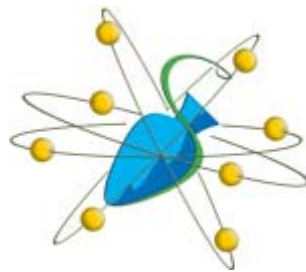
#### 17h30 - 18h00

Conférence : Thérapie cellulaire : réalités et perspectives

*UMR S 608 - Pr. Florence SABATIER*

**CONFÉRENCE :**  
**Thérapie cellulaire : réalités et perspectives**

**Pr. Florence SABATIER**



**INSERM UMR-S 608**  
**Université de la Méditerranée**

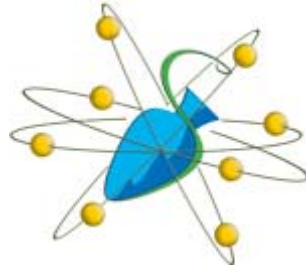
**Physiopathologie de l'Endothélium**

## **Thérapie Cellulaire : Réalités et Perspectives**

**Pr F Sabatier , UMR-S 608 « Physiopathologie e l'endothélium »**

**UFR de Pharmacie, Université de la Méditerranée**

La thérapie cellulaire est un domaine émergent parmi les biothérapies appliquées à la médecine régénérative. Elle désigne les stratégies thérapeutiques visant à apporter à un organisme des cellules choisies, multipliées ou pharmacologiquement modifiées ex vivo, pour restaurer la fonction d'organes ou tissus déficitaires ou lésés. Le champ d'application des thérapies cellulaires couvre un large éventail de pathologies telles que les cancers, les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou les insuffisances d'organes. Le développement de la thérapie cellulaire est basé sur la connaissance croissante des processus biologiques impliqués dans la génération et le fonctionnement normal des tissus et en particulier la biologie des cellules souches. Les cellules utilisables sont multiples incluant des cellules différenciées fonctionnelles, ou différentes populations de cellules souches adultes, fœtales, ou embryonnaires se distinguant par leur immaturité et potentiel de différenciation. Les greffes de cellules souches hématopoïétiques en onco-hématologie sont parmi les applications les plus éprouvées de la thérapie cellulaire. Dans ce cadre, l'utilisation du sang de cordon ombilical, source de cellules particulièrement avantageuse, connaît un essor important ces dernières années. Pratiquées depuis plusieurs dizaines d'années, les greffes de kératinocytes ont pris une place importante dans le traitement des plaies chroniques ou brûlures sévères. Au delà de ces réalités, des développements thérapeutiques très nombreux émanent de la caractérisation d'autres sous populations de progéniteurs et cellules souches multipotentes dans le sang de cordon ou la moelle osseuse chez l'adulte. L'injection de progéniteurs endothéliaux a montré son efficacité dans différents modèles précliniques de régénération vasculaire appliquées aux pathologies ischémiques et est en cours d'évaluation clinique. Enfin les cellules souches mésenchymateuses représentent une sous-population cellulaire très prometteuse de part leur capacité d'expansion in vitro, leur capacité de différenciation en différents types cellulaires, mais également leurs propriétés trophiques et immunomodulatrices. Cependant le transfert de ces stratégies thérapeutiques en pratique clinique nécessite de poursuivre le développement de modèles précliniques pertinents, de progresser dans la maîtrise de procédés de production de grade pharmaceutique et de mettre en place des études cliniques randomisées permettant d'affirmer l'intérêt thérapeutique et d'évaluer les risques à long terme.



## Communications orales

**Dr. Nathalie WURTZ**

*UMR MD3 - Université de la Méditerranée*

Le cycle de *Plasmodium falciparum* : Rôle de la protéine kinase AMPc dépendante.

**Dr. Seydina DIENE**

*URMITE / UMR 6236 - Université de la Méditerranée*

Analyse génomique d'une souche d'*Enterobacter aerogenes* multirésistante isolée chez l'homme.

**Dr. Anne-Catherine LHOUMEAU**

*UMR 891 - Université de la Méditerranée*

Rôle de PTK7 dans l'hématopoïèse normale et pathologique.  
Développement d'un modèle murin.

## Le cycle de *Plasmodium falciparum* : Étude du rôle de la protéine kinase AMP cyclique dépendante

**Dr. Nathalie WURTZ**

UMR MD3 - Université de la Méditerranée

L'élucidation des mécanismes moléculaires contrôlant le cycle de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme, est un enjeu majeur pour la lutte contre cette maladie pour laquelle aucun vaccin n'existe. Chez la plupart des eucaryotes, les protéines kinases sont impliquées dans des fonctions cellulaires essentielles telles que la transduction du signal ou le contrôle du cycle cellulaire, et constituent une cible privilégiée pour la conception et le développement de nouveaux médicaments. Dans ce cadre, nous nous intéressons à la voie de signalisation qui implique l'AMP cyclique et en particulier la protéine kinase AMP cyclique dépendante de *P. falciparum*. Deux stratégies complémentaires ont été développées pour étudier cette kinase plasmodiale : tout d'abord au niveau biochimique par clonage, expression, purification et caractérisation enzymatique, puis au niveau cellulaire en regardant l'effet de son inhibition par siRNA sur *i*) le cycle et *ii*) le transcriptome parasitaire.

# Analyse génomique d'une souche d'*Enterobacter aerogenes* multi-résistante isolée chez l'homme

Seydina M. Diene, Catherine Robert, Adil El Filali, Didier Raoult and Jean-Marc Rolain\*

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergents (URMITE), CNRS-IRD, UMR 6236, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, 27 Bd Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 05, France.

## **Introduction :**

*Enterobacter aerogenes* est un pathogène opportuniste émergent, responsable d'infections nosocomiales, de septicémies et de bactériémies. C'est une Bactérie Multi Résistante (BMR) vis-à-vis de nombreuses familles d'antibiotiques telles que les  $\beta$ -lactamines, les Aminosides, les Sulfamides, les Quinolones, la Fosfomycine, et les Macrolides. Cependant elle demeure sensible habituellement à la gentamicine, à l'imipenème et à la colistine.

En 2005, il a été isolé à Marseille une souche multirésistante d'*E. aerogenes*, qui montrait une résistance successive au cours du traitement à l'imipenème et à la colistine chez une patiente hospitalisée à l'hôpital de la Timone. Cette souche multirésistante a entraîné une septicémie et une défaillance multiviscérale chez la patiente qui est décédée de cette infection du fait de l'absence d'antibiotiques efficaces.

## **Objectif :**

L'objectif de cette étude était de déterminer la séquence complète du genome de cette bactérie afin d'identifier tous les déterminants de la résistance aux antibiotiques et de comprendre la capacité de cette bactérie multirésistante à s'adapter aux traitements antibiotiques.

Il était essentiel dans cette étude de caractériser le mécanisme de résistance à la colistine chez *E. aerogenes*, un phénotype nouveau jamais décrit chez cette espèce bactérienne dans une infection chez l'homme.

## **Résultats :**

Le séquençage puis l'assemblage complet du genome de cette bactérie en collaboration avec le Genoscope d'Evry, nous a permis d'obtenir un génome de 5.515.582 pb assemblé en 135 contigs de taille variant entre 1.235 à 676.842 pb. Une comparaison de ces contigs aux bases de données génomiques disponibles nous a permis de réaliser l'annotation fonctionnelle de ce génome. Nous avons pu ainsi identifier tous les déterminants de la résistance aux antibiotiques tel que les gènes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, aux Aminosides, aux Sulfamides, aux Quinolones, aux Macrolides, aux antiseptiques et aux métaux.

La résistance à la colistine a également été élucidée et liée à une mutation sur le gene *pmrA*, un activateur de l'opéron *pmrHFIJKLM*, qui synthétise une molécule, l'aminoarabinose. Cette mutation augmente le taux de phosphorylation de la protéine *PmrA* qui a comme conséquence la sur-activation de cet opéron conduisant à une augmentation de la synthèse de l'aminoarabinose. L'ajout de cette molécule aux lipides A de la membrane bactérienne modifie la charge électrique de la membrane bactérienne, conférant ainsi une très haute résistance à la colistine.

***Conclusion :***

Nous décrivons pour la première fois la séquence complète du génome d'une souche d'*E. aerogenes* isolée chez l'Homme, ce qui nous a permis d'élucider les mécanismes de résistance aux antibiotiques y compris à la colistine. L'acquisition d'une telle résistance au cours d'un traitement est inquiétante dans ce contexte de bactéries multirésistantes pour lesquelles aucune alternative n'existe.



## **Role of the PTK7 receptor in normal and malignant haematopoiesis**

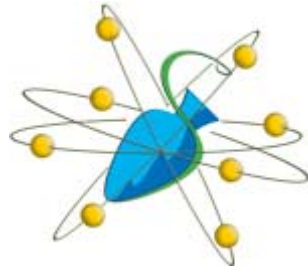
**A.C. Lhoumeau, T.Prébet, M.-L. Arcangeli C.Arnolet, S.Marchetto , Orsoni J.-C.,  
F.Bardin, M.Aurrand-Lions, J.-P.Borg**

Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Inserm UMR891. Institut Paoli-Calmettes. Université de la Méditerranée.  
27 Bd Lei Roure, 13009 Marseille, France.

The pseudo tyrosine kinase receptor 7 (PTK7) is an orphan tyrosine kinase receptor with kinase-dead activity. This receptor has been described as a pivotal protein in embryogenesis. Knock-out of PTK7 in mice leads to a major neural tube defect. Several reports have shown that PTK7 is overexpressed in cancers including colon carcinoma and melanoma. We have investigated the expression of PTK7 in leukaemias.

Our data show a strong expression of PTK7 at the surface of acute myeloid leukaemia blasts cells. Furthermore, expression of PTK7 was limited to monocytic-derived leukaemias and in the bone marrow of healthy donors. To understand the role of PTK7 in hematopoiesis, we are developing a mouse model using Embryonic Stem (ES) cells deficient for PTK7 functions (gene-trapped *ptk7*). We are now analysing the hematopoietic lineages (FACS analysis of foetal liver) in this mouse model. To evaluate the potential role of PTK7 in leukemogenesis, we are currently doing transplantations of hematopoietic stem cells in previously irradiated mice.

This project will contribute to better evaluate the role of PTK7 in haematopoiesis and leukemia development. Furthermore, it will precise if PTK7 could be considered as a therapeutic target in AML.



**INSERM UMR-S 608**  
**Université de la Méditerranée**

**Physiopathologie de l'Endothélium**

## STANDARDIZATION OF FLOW CYTOMETRY-BASED ENUMERATION OF PLATELET MICROPARTICLES USING CALIBRATED BEADS: RESULTS OF INSTRUMENT QUALIFICATION.

R. Lacroix\*<sup>1</sup>, P. Poncelet<sup>2</sup>, S. Robert<sup>1</sup>, N. S. Key<sup>3</sup>, F. Dignat-George, on behalf of the ISTH SSC Workshop<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR-S 608 INSERM-Université de la Méditerranée, UFR de Pharmacie, <sup>2</sup>Biocytex, 140, Chemin de l'Armée d'Afrique, Marseille, France, <sup>3</sup>Department of Medicine, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, United States

### Abstract:

Objective: Three ISTH Scientific and Standardization Subcommittees (Vascular Biology, DIC and Haemostasis & Malignancy) have initiated a project aimed at standardizing the enumeration of cellular microparticles (MP). The objective of the first exercise is to standardize flow cytometry (FCM)-based enumeration of platelet microparticles (PMP) using an optimized blend of fluorescent beads calibrated for both size and relative amounts (Megamix, BioCytex, F). The initial step was instrument qualification, based on Forward Scatter (FS) resolution and background testing.

Methods: 40 laboratories (labs) representing 52 potential instruments including FACS Scan, Calibur, Canto, LSRII (Becton-Dickinson), EPICS XL, Cyan and FC500 (Beckman-Coulter) are participating in the workshop. FCM analysis of beads utilizing a standardized approach was reported by each lab using their individual instrument(s). Data were re-analyzed by the core lab with respect to FS resolution and background.

Data: To date, 17 labs (22 instruments, 42%) have submitted results. 10 labs (13 instruments, 59%) qualified. As expected from previous limited experience, the assayed specifications regarding FS resolution and background were highly variable across instruments, even using the same model, resulting in significant variation in the ability to count MPs under standardized conditions. This result justifies the need for specialized Quality Control tools. Final statistics of instrument qualification will be presented and illustrated with FCM graphs. In addition, we will illustrate technical features such as i) long-term evolution of individual instrument, ii) effect of flow speed or light-reducing components, and iii) impact of different threshold strategies.

Conclusion: This workshop will help delineate the effect of instrument performance on PMP counts and provide proven recommendations on how to optimize flow cytometers of all kinds for this technically-demanding application.

## ROLE DES TOXINES UREMiques DANS LA PRODUCTION ENDOTHELIALE DE FACTEUR TISSULAIRE

Gondouin B<sup>1,2</sup>, Cerini C<sup>1</sup>, Dou L<sup>1</sup>, Arnaud L<sup>3</sup>, Camoin L<sup>1,3</sup>, Berland Y<sup>2</sup>, Dignat-George F<sup>1,3</sup>, Brunet P<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM U 608, Université de la Méditerranée, UFR Pharmacie, Marseille, France

<sup>2</sup> Centre de Néphrologie et Transplantation Rénale, Hôpital de la Conception, Marseille, France

<sup>3</sup> Laboratoire d'Hématologie, Hôpital de la Conception, Marseille, France

L'insuffisance rénale chronique (IRC) conduit à un état d'intoxication progressive de l'organisme par accumulation de toxines urémiques. Les patients IRC présentent une mortalité cardiovasculaire accrue, un nombre élevé d'événements thrombotiques et un dysfonctionnement endothélial particulièrement important. Devant les relations très étroites existant entre le dysfonctionnement endothélial, la coagulation et l'athérosclérose, un intérêt particulier a été porté au facteur tissulaire, élément clé de la coagulation mais également acteur potentiel de l'athérogénèse. L'objectif de notre travail est de montrer que les toxines urémiques jouent un rôle dans l'expression du facteur tissulaire.

Pour cela, nous avons étudié in vitro l'expression du facteur tissulaire dans des cellules endothéliales en culture en présence d'une toxine urémique particulièrement délétère pour l'endothélium, l'indoxyl sulfate. Nous avons également mesuré les taux de facteur tissulaire circulant chez les patients IRC.

Les résultats obtenus montrent que l'indoxyl sulfate augmente les taux d'ARNm du facteur tissulaire endothélial. Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de la synthèse et de l'expression membranaire de cette protéine. Enfin, elle a des répercussions fonctionnelles puisqu'elle s'accompagne d'une augmentation de l'activité procoagulante dépendante du facteur tissulaire. Chez les patients, nous avons mis en évidence une augmentation des taux de facteur tissulaire circulant. De plus, nous avons montré une corrélation entre ces taux de facteur tissulaire et la diminution de la fonction rénale, suggérant un rôle des toxines urémiques.

Ce travail montre l'implication des toxines urémiques dans la production de facteur tissulaire endothélial, et permet de cibler le facteur tissulaire comme un acteur et/ou un marqueur du dysfonctionnement endothélial dans l'IRC.

## ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS FROM PREMATURE NEONATES DISPLAY IMPAIRED ANGIOGENIC PROPERTIES

Ligi I<sup>1\*</sup>, Simoncini S<sup>1</sup>, Tellier E<sup>1</sup>, Sabatier F, Lamy E, Guillet B, Vassallo P, Simeoni U\*, Dignat-George F, Anfosso F

UMR 608 INSERM, Physiopathologie de l'Endothélium, Université de la Méditerranée, UFR de Pharmacie, Marseille

\* : service de néonatalogie, hôpital de la Conception, Marseille

1 : principaux investigateurs

Endothelial progenitor cells (EPC) which participates to postnatal blood vessel formation by their mobilization and recruitment to the site of vascular injury. EPC have been extensively studied as biomarkers to assess the cardiovascular risk in human subjects. Both their numbers and regenerative functions are impaired in cardiovascular disorders. In peripheral adult blood and umbilical cord blood, endothelial colony forming cells (ECFC) characterize a population of EPC with a high proliferative potential able to form blood vessels *in vivo*.

Low birth weight, whether due to intra-uterine growth restriction (IUGR) or to preterm birth, and factors acting as early as during the fetal period determine the risk for cardio-vascular disease at adulthood. The process, whereby harmful events that occur at a critical period of intra-uterine life, have long-term deleterious consequences is known as fetal or early developmental programming of adult disease and predispose the individual to increased risk of cardiovascular disease in adult life.

Our aim was to study the angiogenic properties of EPC from cord blood of neonates born with a low birth weight.

Umbilical blood was recovered from 25 neonates with a gestational age between 28 and 35 weeks of amenorrhea and from 25 neonates born at term. MNC were isolated by Ficoll and cultured in an endothelial medium.

MNC from cord blood of term (T) or premature (PT) neonates form proliferative colonies of ECFC. The cells expressed immature markers (CD34+) and displayed an endothelial phenotype (CD31+, CD146+, CD144+). Nevertheless, ECFC-PT formed significantly less colonies than ECFC-T and their clonogenic potential was decreased. *In vitro* the angiogenic potential of ECFC-PT was greatly reduced. They form significantly less vessel-like structures in Matrigel™ than ECFC-T. Their proliferative activity and their capacity to migrate were also reduced. *In vivo* injection of a matrigel plug containing ECFC-PT into nude mice gave less vascular structures than ECFC-T.

Taken together these data indicate that a low birth weight impairs the angiogenic properties of EPC that would promote endothelial dysfunction and vascular diseases at adulthood.

## **The interaction of CD146/MCAM with galectin-1 is involved in the control of endothelial cell apoptosis**

Nathalie JOUVE<sup>1\*</sup>, Aurélie S. Leroyer<sup>1</sup>, Nicolas DESPOIX<sup>1\*</sup>, Marion ESPELI<sup>2\*</sup>,  
Sophie CYPWYJ<sup>1</sup>,  
Karim FALLAGUE<sup>1</sup>, Nathalie BARDIN<sup>1</sup>, Marcel BLOT-CHABAUD<sup>1</sup>, Laurent  
GAUTHIER<sup>3</sup>,  
Frédéric VELY<sup>1</sup>, Claudine SCHIFF<sup>2</sup> and Françoise DIGNAT-GEORGE<sup>1</sup>

-<sup>1</sup> UMR-S608, INSERM-Université de la Méditerranée, Marseille, France

-<sup>2</sup> U631-UMR6102, INSERM-CNRS-Université de la Méditerranée, CIML,  
Marseille, France.

-<sup>3</sup> INNATE-PHARMA, Marseille, France

CD146 has been discovered as important adhesion molecule of inter-endothelial junctions involved in angiogenesis and tumor growth. However, very little is known about its functions and nothing is described about its extracellular ligands. Interestingly, galectin-1 shares similarities with CD146, in term of structure and function. Thus, we hypothesized that galectin-1 could be one CD146 ligand and could play a role in endothelial cell apoptosis.

We demonstrated a specific binding of galectin-1 to recombinant CD146, dependent of glycosylations, either in ELISA and Biacore; whereas galectin-2 was not able to bind CD146. Moreover, immunofluorescence stainings showed a co-localization between CD146 and galectin-1 on pseudopodes of activated Human Umbilical Vein Endothelial Cells in culture. In term of function, we observed that galectin-1 induced apoptosis of endothelial cells, demonstrated by annexin-V/PI staining and by the presence of cytoplasmic histone-associated-DNA-fragments. Moreover, deletion of endothelial CD146 by the use of siRNA or neutralizing antibody against CD146 increased this galectin-1 induced-apoptosis. Consequently, our data suggested a protective role of CD146 in galectin-1 induced-apoptosis.

Taken together, we have find a new partner to CD146 : Galectin-1. We showed that this interaction modulated apoptosis of endothelial cells with a protective role attributed to CD146.

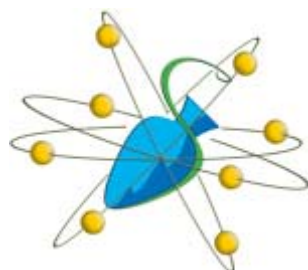
## **Localisation and role of CD146 isoforms in endothelial progenitor cells**

**Abdeldjalil Kebir, Karim Harhour, Elise Kaspi, Alexandrine Foucault-Bertaud, Edouard Lamy, Frédéric Vely, Florence Sabatier, José Sampol, Nathalie Bardin, Françoise Dignat-George, and Marcel Blot-Chabaud**

**INSERM UMR-S 608, Université de la méditerranée, UFR de pharmacie, Marseille.**

CD146 is a transmembrane immunoglobulin mainly present in endothelial cells, including circulating endothelial progenitors. It is involved in various functions such as vascular growth, angiogenesis and controls permeability and cohesion of the endothelial monolayer. Moreover, this molecule was identified as a marker of melanoma progression. It was suggested by PCR that, in addition to the already known form of CD146, another shorter form could exist. These two isoforms differ by their intracellular domain. The goal of our work was: 1) to determine the cellular localisation of the two isoforms, and 2) to define their role, in endothelial progenitor derived cells (EPC). In our experiments, we used specific serums for both isoforms, siRNA able to specifically suppress the expression of one or the other form, and lentivirus containing either CD146 lacking its intracellular part, or the short/long forms. Confocal microscopy, cell proliferation (BrdU incorporation), pseudo capillaries formation in matrigel, cell migration (Wound Healing) and transendothelial permeability experiments (diffusion of dextran through EPC grown on semi-permeable filters) were performed. The results show that, in EPC, short CD146 was localised at the membrane and in the nucleus in migrating cells, whereas it was localised at the apical side in confluent cells. It was involved in angiogenic functions such as proliferation and cell migration. The long isoform was intracellular in migrating cells and located at the intercellular junctions in confluent cells. It was involved in structural functions, as the control of the transendothelial permeability and organization of cellular junctions in capillaries.

In conclusion, we propose that the short isoform of CD146 confers angiogenic properties to EPC whereas the long isoform carries structural functions at the junction.



**UMR - CNRS 6264**  
**Université de la Méditerranée**

**Laboratoire Chimie Provence (LCP)**  
**Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LCPR)**



# ORIGINAL TDAE APPLICATION: SYNTHESIS OF SUBSTITUTED 4,11-DIMETHOXYANTHRA[2,3-*b*]FURAN-5,10-DIONES VIA INTRAMOLECULAR BUCHWALD REACTION

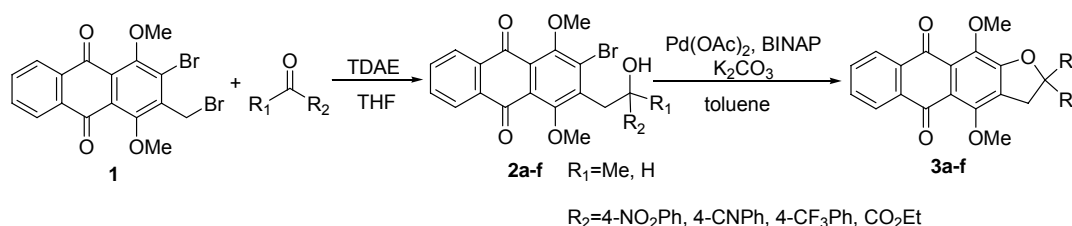
**Omar Khoumeri, Maxime D. Crozet, Thierry Terme, Patrice Vanelle.**

Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Universités d'Aix-Marseille I, II et III - CNRS, UMR 6264, Laboratoire Chimie Provence, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

The efficacy of anthracycline antibiotics such as daunomycin and adriamycin in the treatment of a variety of human malignancies has stimulated a continued interest in the synthesis of this antitumor class agents.<sup>1</sup> Unfortunately, their clinical use is limited by both dose-related cumulative cardiotoxicity and development of drug-resistance. Several syntheses of heterocyclic anthracycline analogs were developed in which the cyclohexane ring of anthracycline is replaced by an heterocycle.<sup>2</sup> On the other hand the compounds possessing a furano or pyrano ring fused to polycyclic, aromatic system such as furanoxanthone, acrycine, and coumarin exhibit interesting antitumor and anti-inflammatory properties.<sup>3</sup>

Tetrakis(dimethyl-amino)ethylene (TDAE) is a reducing agent which reacts with halogenated derivatives to generate an anion, which is able to react with various electrophiles as aromatic aldehydes,  $\alpha$ -ketoester, ketomalonate and  $\alpha$ -keto lactam derivatives.<sup>4</sup> We have recently reported the extension of this reactivity in anthraquinone series with aromatic aldehydes.<sup>5</sup> Moreover, in order to develop pharmacomodulation studies, our team is interested in the palladium-catalyzed reactions such as Suzuki-Miyaura, Heck, Buchwald reactions.<sup>6</sup> Palladium-catalyzed reactions of aryl halides with oxygen nucleophiles have found wide application in the synthesis of complex aromatic ethers.<sup>7</sup>

We report herein original and efficient synthesis of new substituted 2,3-dihydro-4,11-dimethoxy-2,3-dihydroanthra[2,3-*b*]furan-5,10-dione (**3a-f**) by an intramolecular Pd-catalyzed reaction of halides alcohols derivatives (**2a-f**) prepared by TDAE strategy.



## References

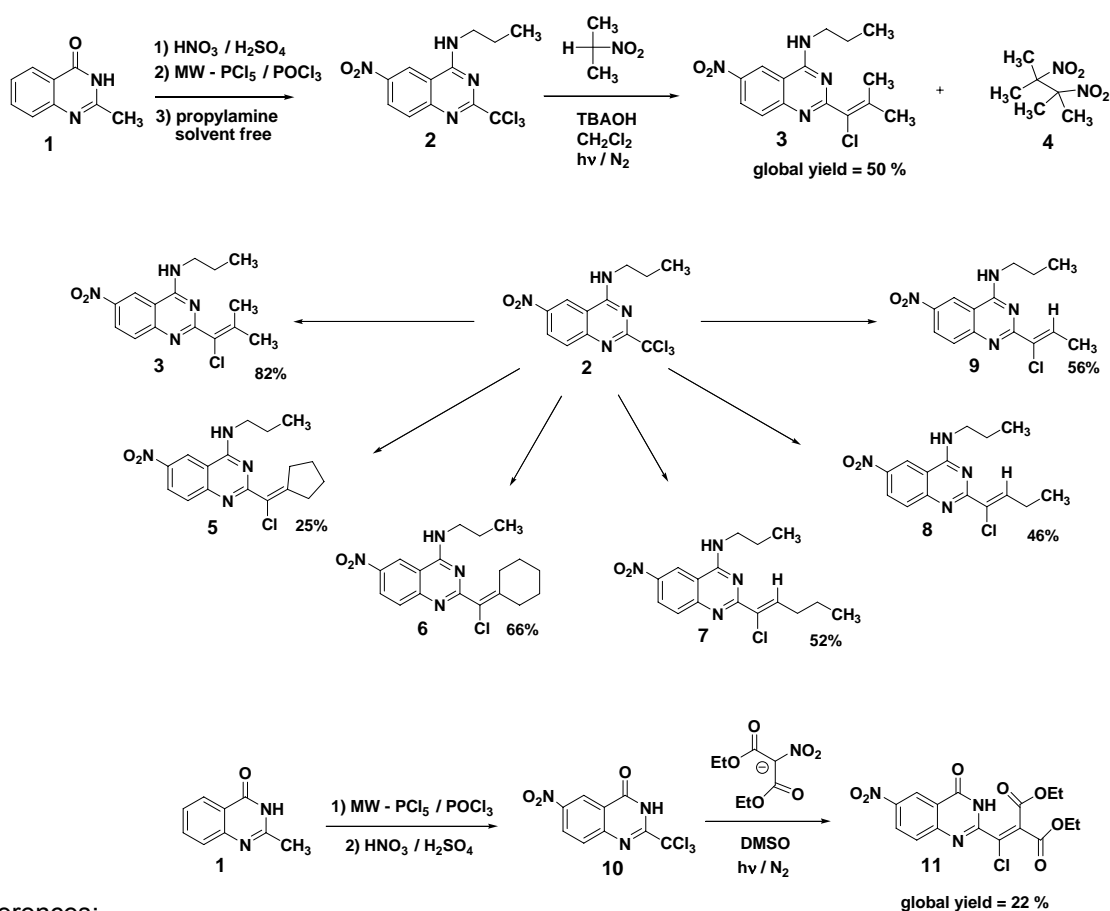
- [1] a) Arcamone, F. *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5995. b) Monneret, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 483.
- [2] Shchekotikhin, A. E.; Dezhenkova, L. G.; Susova, O. Y.; Glazunova, V. A.; Luzikov, Y. N.; Sinkevich, Y. B.; Buyanov, V. N.; Shtil, A. A.; Preobrazhenskaya, M. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2651.
- [3] a) Melliou, E.; Magiatis, P.; Mitaku, S.; Skaltsounis, A. L.; Pierré, A.; Atassi, G.; Renard, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 607. b) Nicolaidis, D. M.; Gautam, Daman, R.; Litinas, K. E.; Hadjipavlou-Litina, D. J.; Fylaktakidou, K. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 323.
- [4] a) Giuglio-Tonolo, G.; Terme, T.; Médebielle, M.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6433. b) Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8373. c) Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6573. d) Juspin, T.; Terme, T.; Vanelle, P. *Synlett* **2009**, 1485.
- [5] Khoumeri, O.; Montana, M.; Terme, T.; Vanelle, P. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11237.
- [6] a) Castera, C.; Crozet, M. D.; Vanelle, P. *Heterocycles* **2005**, *65*, 2979. b) Castera-Ducros, C.; Crozet, M. D.; Vanelle, P. *Synthesis* **2006**, *16*, 2777. c) Crozet, M. D.; Castera-Ducros, C.; Vanelle, P. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 7061. d) Verhaeghe, P.; Azas, N.; Gasquet, M.; Hutter, S.; Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 396.
- [7] Palucki, M.; Wolfe, J. P.; Buchwald, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10333.

# MONOELECTRONIC TRANSFER REACTIONS IN 4-PROPYLAMINO-6-NITROQUINAZOLINE SERIES

Maillard-Boyer M., Verhaeghe P., Castera-Ducros C., Vanelle P. and Rathelot P.  
avec la collaboration technique de F. Sifredi

Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicale, Faculté de Pharmacie, Universités d'Aix-Marseille I, II et III - CNRS, UMR 6264, Laboratoire Chimie Provence, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

In continuation of our research program focusing on the synthesis of quinazolines displaying anti-infectious properties,<sup>1,2,3</sup> we present herein the 4-step-synthesis of new quinazoline derivatives bearing original substituents in the 2, 4 and 6-positions. The preparation of these compounds includes a microwave-assisted chlorination reaction<sup>4,5</sup> and a key-step of consecutive  $S_{RN}1 + E_{RC}1$  reactions, affording an easy access to the vinylic chloride group. Such approach, permitted the preparation of a complete series which is under biological evaluation. This synthetic strategy also allows the functionalization of quinazolines in position 2 by other groups such as malonates (compound **11**).



## References:

- 1) Verhaeghe, P.; Azas, N.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Dumêtre, A.; Gasquet, M.; Reboul, J.P.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4313.
- 2) Verhaeghe, P.; Azas, N.; Gasquet, M.; Hutter, S.; Castera-Ducros, C.; Laget, M.; Rault, S.; Rathelot, P.; Vanelle, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 396
- 3) Kabri, Y.; Gellis, A.; Vanelle, P. *Green Chem.* **2009**, *11*(2), 201
- 4) Kato, T.; Katagiri, N.; Wagai, A. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1069
- 5) Verhaeghe, P.; Rathelot, P.; Gellis, A.; Rault, S.; Vanelle, P. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8173

# SYNTHESIS OF NEW LEISHMANICIDE HYDROXYAMIDINES VIA Mn(III) BASED OXIDATIVE CYCLISATIONS UNDER MICROWAVE IRRADIATION

Ahlem BOUHLEL,<sup>1</sup> Christophe CURTI,<sup>1</sup> Aurélien DUMETRE,<sup>2</sup> Nadine AZAS,<sup>2</sup> Patrice VANELLE<sup>1</sup>

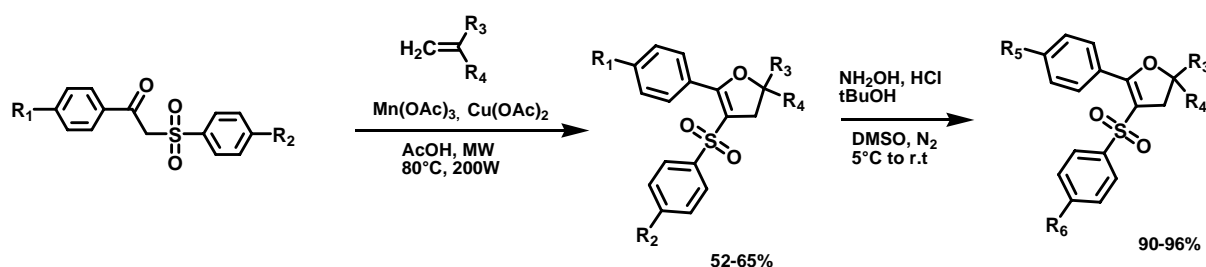
<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Universités d'Aix-Marseille I, II, III – CNRS, UMR 6264 : Laboratoire de Chimie Provence, 27 Boulevard Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie Relation Hôte-parasites, Pharmacologie et Thérapeutique UMR MD 3, Université de la Méditerranée, 27 bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France.

Despite the different treatments, the Leishmaniasis, a parasitic infection, keeps on decimating millions of people all over the world. Indeed, this parasite is becoming resistant against drugs used.<sup>1</sup> So research for molecules that act on new target remains thus necessary.<sup>2</sup>

For this purpose, a series of molecules has previously been prepared. Thanks to Mn(III) acetate based oxidative cyclisation,<sup>3</sup> several dihydrofuran derivatives substituted in position 4 by different sulfonyl groups were obtained under microwave irradiation with good yields. This new technology allow rapid heating, efficient solubilisation of Mn(OAc)<sub>3</sub> and drastically reduce reaction time. So we performed this new microwave assisted synthesis conducted in 45 min.

Then, these nitriles were converted in dihydroxyamidines which were revealed as good candidates against the parasite *Leishmania*.



## References

- 1) Singh N. Indian J. Med. Res., **2006**, 123, 411.
- 2) Cruz A.K., de Toledo J.S., Falade M., Terrão M.C., Kamchonwongpaisan S., Kyle D.E., Uthaipibull C. Curr. Drug Targets, **2009**, 10, 178.
- 3) Curti, C.; Crozet, M.D.; Vanelle, P. Tetrahedron, **2009**, 65, 200.

# AN EFFICIENT AQUEOUS MICROWAVE-ASSISTED SUZUKI-MIYAJIURA CROSS-COUPLED REACTION IN THIAZOLE SERIES

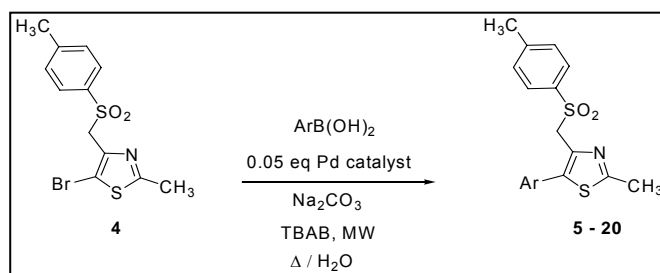
Anita Cohen,<sup>1</sup> Maxime D. Crozet,<sup>1</sup> Nadine Azas,<sup>2</sup> Sébastien Hutter,<sup>2</sup> Michèle Laget,<sup>2</sup> Pascal Rathelot<sup>1</sup> and Patrice Vanelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire, Faculté de Pharmacie, Universités d'Aix-Marseille I, II, III – CNRS, UMR 6264 : Laboratoire de Chimie Provence, 27 Boulevard Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie, Mycologie médicale, Hygiène et Zoologie, UMR MD3, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

Thiazole derivatives are currently the object of a renewed interest in the pharmaceutical field. Indeed, this nucleus can be found in the chemical structure of various compounds exhibiting a wide variety of biological activity, as gastric antisecretory agents (famotidin, nizatidin) or anti-infectious agents (ritonavir, nitazoxanide, tenonitroazole, aminitroazole, ...), while others have found applications as cosmetic sunscreens.[1]

In view of our general interest in the study of the reactivity of nitroheterocyclic sulfones [2] and in order to prepare new potentially bioactive compounds by cleaner chemical process,[3] we developed a green microwave-promoted Suzuki-Miyajura cross-coupling reaction for the preparation of new 2-methyl-4-(tosylmethyl)thiazoles functionalized by a variety of substituents at the 5-position.[4]



The therapeutic potentiality of these new compounds was determined by:

- evaluation of their toxicity on human cells: the IC<sub>50-Human</sub> were determined for two different human cell lines (K562S and HepG2) using doxorubicin as reference of cellular toxicity *in vitro*,
- identification of their antiplasmodial activity: the IC<sub>50-Plasmodium</sub> were determined for a strain of *Plasmodium falciparum* using chloroquine as reference.

The structures of synthesized thiazoles, the methodologies employed and the biological evaluation will be reported and discussed.

## References

- [1] T. Bach, S. Heuser, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 1707.  
[2] M. D. Crozet, V. Remusat, C. Curti, P. Vanelle, *Synth. Commun.*, **2006**, 36, 3639; M. D. Crozet, C. Botta, M. Gasquet, C. Curti, V. Remusat, S. Hutter, O. Chapelle, N. Azas, M. De Meo, P. Vanelle, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 653.  
[3] A. Gellis, N. Boufatah, P. Vanelle, *Green Chem.*, **2006**, 8, 483; Y. Kabri, A. Gellis, P. Vanelle, *Green Chem.*, **2009**, 11, 201; A. G. Giuglio-Tonolo, T. Terme, P. Vanelle, *Green Chem.*, **2009**, 11, 160.  
[4] A. Cohen, M. D. Crozet, P. Rathelot, P. Vanelle, *Green Chem.*, **2009**, 11, 1736.

# REGIOSELECTIVE SYNTHESIS OF 4,7-DIARYLQUINAZOLINES VIA A MICROWAVE IRRADIATED SUZUKI-MIYAUURA CROSS-COUPLING REACTION

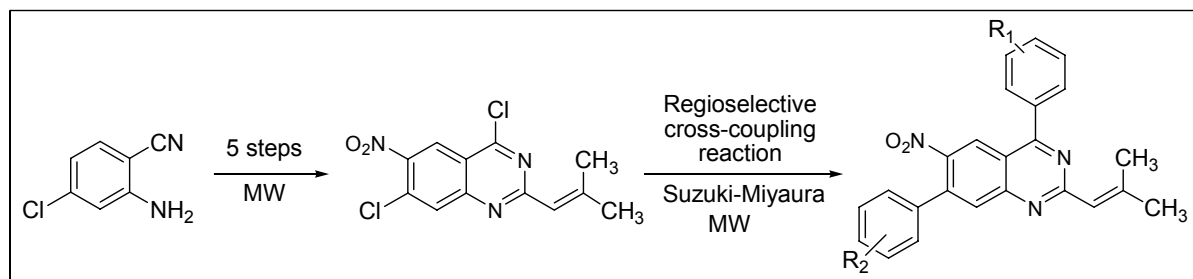
Youssef Kabri, Armand Gellis and Patrice Vanelle

Laboratoire de Pharmaco-Chimie Radicalaire (LPCR), Faculté de Pharmacie, Universités d'Aix-Marseille I, II et III – CNRS, UMR 6264, Laboratoire Chimie Provence, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

The quinazoline ring system along with many alkaloids is a widely recognized moiety in organic syntheses and medicinal applications.<sup>1-5</sup> Quinazolines are an important class of compounds which exhibit anticonvulsant, antibacterial, antidiabetic, and anticancer activities. The chemistry of parent quinazolines and the synthesis of different quinazoline derivatives are well established and a number of methods to prepare quinazolines is known.<sup>6-8</sup>

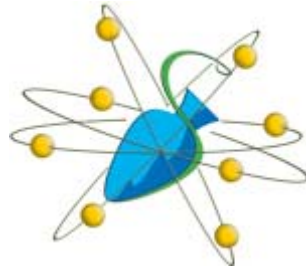
Microwave as a non-conventional energy source has become a very popular and useful technology in organic chemistry.<sup>9</sup> The main attraction of using microwave is to short reaction times in cleaner systems even under solventless conditions. Consequently, microwave irradiation has been vastly applied in organic synthesis including C-C cross-coupling reaction.<sup>10</sup>

In continuation of our work in heterocyclic series,<sup>11</sup> we describe a regioselective Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction of 4,7-dichloro-2-(2-methylprop-1-enyl)-6-nitroquinazoline with various arylboronic acids for the preparation of symmetrical and asymmetrical substituted quinazolines.



## References:

- 1) W. R. Gordan, D. P. Brian, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 918.
- 2) N. Vasdev, P. N. Dorff, *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, 48, 109.
- 3) S. Ommeh, E. Nduati, E. Mberu, G. Kokwaro, K. Marsh, A. Rosowsky, A. Nzila, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, 48, 3711.
- 4) L. Y. Djapa, L. K. Basco, R. Zelikson, A. Rosowsky, J. A. Djaman, J. N. Yonkeu, M. Bolotin-Fukuhara, A. Mazabraud, *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, 156, 89.
- 5) P. Verhaeghe, N. Azas, M. Gasquet, S. Hutter, C. Ducros, M. Laget, S. Rault, P. Rathelot, P. Vanelle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 396.
- 6) S. Schröter, C. Stock, T. Bach, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 2245.
- 7) S. T. Handy, J. J. Sabatini, *Org. Lett.* **2006**, 8, 1537.
- 8) Y. Gong, W. He, *Heterocycles*, **2004**, 62, 851.
- 9) D. Dallinger, C. O. Kappe, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2563.
- 10) N. E. Leadbeater, *Chem. Commun.* **2005**, 2881.
- 11) Y. Kabri, A. Gellis, P. Vanelle, *Green Chem.* **2009**, 11, 201.



**UMR INSERM 911**  
**Université de la Méditerranée**

**Centre de Recherche en Oncologie biologique et  
Oncopharmacologie (CRO2)**

**Olesoxime prevents microtubule-targeting drug neurotoxicity: selective preservation of EB comets in differentiated neuronal cells.**

**Rovini A.<sup>a</sup>, Carré M.<sup>a</sup>, McKay N.<sup>a</sup>, Bordet T.<sup>b</sup>, Pruss R. M.<sup>b</sup> and Braguer.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>INSERM UMR911, Centre de Recherche en Oncologie biologique et Oncopharmacologie ; Aix-Marseille Université, Marseille, France.

<sup>b</sup>Trophos, Parc Scientifique de Luminy, Marseille, France.

**ABSTRACT**

Microtubule-targeting agents (MTAs), anticancer drugs widely used in the clinic, often induce peripheral neuropathy, a main dose-limiting side effect. The mechanism for this neurotoxicity remains poorly understood and there are still no approved therapies for neuropathies triggered by MTAs. Olesoxime (cholest-4-en-3-one, oxime; TRO19622) has shown marked neuroprotective properties in animals treated with paclitaxel and vincristine. The purpose of this study was to investigate its mechanism of neuroprotection against MTA neurotoxicity by using rat and human differentiated neuronal cells. We first showed that olesoxime prevented neurite shrinkage induced by MTAs in differentiated PC-12 and SK-N-SH neuroblastoma cell lines by up to 90%. This neuroprotective effect was correlated with enhanced EB1 accumulation at microtubule plus-ends, increased growth cone microtubule growing rate (20%) and decreased microtubule attenuation duration (54%). The effects of olesoxime on EB comets were specific for differentiated neuronal cells and were not seen either in proliferating neuroblastoma cells, glioblastoma cells or primary endothelial cells. Importantly, olesoxime did not alter MTA cytotoxic properties in a wide range of MTA-sensitive tumor cells, a prerequisite for future clinical application. Finally, olesoxime also counteracted MTA inhibition of microtubule-dependent mitochondria trafficking. These results provide additional insight into the neuroprotective properties of olesoxime, highlighting a role for

microtubule dynamics in preservation of neurite architecture and axoplasmic transport, which are both disturbed by MTAs. The neuron-specific protective properties of olesoxime support its further development to treat MTA-induced neuropathy.



## **Epothilone B inhibits glioma cell migration by disrupting EB1 comets and inducing microtubule catastrophes**

Alessandra Pagano, Stéphane Honoré, Géraldine Gauthier, Pascal Verdier-Pinard and Diane Braguer

INSERM 911, CRO2, Université de la Méditerranée, 27 bd Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05, France.

Glioblastomas (GBM) are very invasive brain tumors, associated with very poor survival. Invasion of glioblastoma cells in the brain involves the loss of cell-cell contacts, activation of cell signaling and induction of cell migration. Cell migration is regulated by the coordinated crosstalk between microtubules (MT), actin filaments and adhesion sites. Such crosstalk involves the transient association of +TIPs proteins such as EB1 to MT + ends. Microtubule targeting agents (MTAs) are useful anticancer drugs due to their antimitotic activity at relatively high concentrations. However, MTAs exert also anti-migratory activity at low non cytotoxic concentrations, by poorly understood mechanisms. We showed that the MTA epothilone B (EPO B) significantly inhibited U87MG cell transmigration, random motility, and radial migration from spheroids at low non-cytotoxic concentrations ( $\leq 1$  nM). Interestingly, these effects were concomitant with a concentration dependent reduction of EB1 comets length at MT + ends. Moreover, other +TIPs proteins such as EB3, CLIP-170 and p150<sup>glued</sup> were also displaced from MT + ends. Specific down-regulation of EB1 using siRNA strongly reduced U87MG cell motility similarly to EPO B. Since EB proteins are known as MT anti-catastrophe factors, we analyzed interphase MT dynamics in living EB1-GFP or tubulin-GFP transfected cells. EPO B induced MT catastrophes in a concentration dependent manner. Analysis of MT targeting to focal adhesions using low concentrations ( $\leq 1$  nM) suggest that most of the MT catastrophes occurred at those sites. Altogether our results suggest that the loss of the anti-catastrophe factor EB1 from MT+ ends by MTAs accounts for the higher MT susceptibility to FA-induced catastrophes, thereby altering the normal MT-adhesion site cross-talk and cell migration.

# Quantification de l'interaction entre la Stathmine et le microtubule par imagerie cellulaire

Roqiya Nouar\*, Gilles Breuzard, François Devred,  
Anne-Marie Monges, Vincent Peyrot

Centre de Recherche en Oncobiologie et Oncopharmacologie (CRO2) Inserm U911  
UFR de Pharmacie – Université Aix-Marseille II  
27 bd Jean Moulin 13385 Marseille cedex 05

Correspondance : [roqiya.nouar@etumel.univmed.fr](mailto:roqiya.nouar@etumel.univmed.fr)

**Contexte :** La Stathmine est une protéine clé dans le désassemblage des microtubules (MT) et sa surexpression dans plusieurs cancers de type bronchique reste mal comprise. De plus, les détails de l'interaction Stathmine/MT restent également difficiles à appréhender, en particulier dans la cellule.

**Matériels et Méthodes :** Pour aborder cette problématique, le transfert d'énergie ou FRET (Förster Resonance Energy Transfer) adapté à notre imagerie confocale est une méthode de choix pour démontrer au-delà d'une simple co-localisation optique, l'interaction Stathmine/MT.

**Résultats :** Dans un modèle cellulaire de carcinome pulmonaire non à petite cellule, nos principales observations dévoilent une distribution ponctiforme de la Stathmine dont certains points se co-localisent avec le MT. Plus intéressant, une quantification de l'interaction Stathmine/MT montre un important transfert d'énergie au niveau des points-chauds situés à l'extrémité (+) des MT. Ces résultats permettent de caractériser une interaction Stathmine/MT plus importante.

**Conclusion :** En conclusion, l'instabilité dynamique des MT est en partie conditionnée par les interactions entre la Stathmine et les MT. Des modifications du niveau d'expression de la Stathmine pourraient avoir pour conséquence un recrutement de la Tubuline moins important ou un changement de la conformation et/ou de la structure de la Tubuline à l'extrémité du MT, défavorable à sa croissance.

## **Microtubule dynamics is involved in the control of angiogenesis by VEGF through EB1 localization at their + ends**

Géraldine GAUTHIER, Stéphane HONORE, Pascal VERDIER-PINARD, Alessandra PAGANO  
and Diane BRAGUER

INSERM 911, Centre de Recherche en Oncologie biologique et Oncopharmacologie, Université de la méditerranée, 27 bd Jean Moulin 13005 Marseille, France

Microtubules (MT) are dynamic cytoskeletal elements that control a wide range of fundamental cellular functions, including cell division, cell migration. We have previously shown that MT-targeting agents (MTAs) produce their anti-angiogenic effects through an inhibition of endothelial cell migration associated with an increase in endothelial interphase microtubule dynamics, a decrease of EB1 comet length at microtubule + ends and a decrease in microtubule pause at adhesion sites. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is a crucial regulator of neo-angiogenesis in cancer, promoting endothelial cell proliferation and migration. We analyzed the effect of VEGF on microtubule and EB1 dynamics in living Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). Autocrine VEGF inhibition using VEGF trap led to an alteration of microtubule-cell cortex targeting and a strong increase in microtubule dynamic instability (+ 43%). In contrast, exogenously added VEGF (10 ng/ml) increased microtubule-cell cortex targeting and suppression of microtubule dynamic instability (- 29%). Interestingly, we found that the suppression of MT dynamics by VEGF occurred through their + end stabilisation at focal adhesion sites. Moreover, we demonstrated that VEGF and the MTA Vinflunine differentially altered the localisation of EB1 at microtubule + end. VEGF increased EB1 comets length by 32 % and 10 nM Vinflunine reduced EB1 comet length by 39%. Interestingly, low anti-angiogenic concentration of Vinflunine completely abolished the effect of VEGF on EB1 comets. Finally, we observed the expression of different isoforms of EB1 by 2D Western blot in endothelial cells. In an effort to decipher the underlying molecular mechanisms, we are currently investigating the potential effect of VEGF and MTAs on this EB1 expression pattern. Altogether, our results suggest that microtubules integrate angiogenic signals from the microenvironment through EB1 protein, which is antagonized by MTAs.

## Quantitative analysis of Tau-microtubule interaction using FRET

Gilles Breuzard, Isabelle L. Di Maio, Pascale Barbier, Diane Allegro, Cédric Brault, Vincent Peyrot\*

INSERM U-911, CR02, Faculté de pharmacie -Université d'Aix-Marseille 27 bd

Jean Moulin, F-13385 Marseille cedex 5 (France)

\*Corresponding author : Fax: (+33)4-91-83-55-06 ; e-mail: [vincent.peyrot@pharmacie.univ-mrs.fr](mailto:vincent.peyrot@pharmacie.univ-mrs.fr)

Although several neurodegenerative and cancer pathologies directly implicate MAPs tau, details of its interaction with microtubules (MTs) remain difficult to investigate, and in particular in living cells. Since a decade, our laboratory has already studied the interaction of tau variant with tubulin or microtubules<sup>[1, 2]</sup> and phosphorylation process on this interaction<sup>[3, 4]</sup>. Förster Resonance Energy Transfer (FRET) assay constituted a powerful tool to achieve binding parameters between tau and tubulin *in vitro*: 1/ with MTs stabilized with a fluorescein-coupled taxoid analogue (Flutax-2) as donor and rhodamine-labelled tau (rho-tau) as acceptor, and 2/ in living cells by confocal laser scanning microscopy (CLSM) with the tau/tubulin- $\alpha$  proteins fused to the donor-to-acceptor GFP/mCherry. *In vitro* results revealed  $47 \pm 3$  % energy transfer efficiency from Flutax-2 to rho-tau and a donor-to-acceptor distance of  $54 \pm 1$  Å. A molecular model is proposed in which Flutax-2 is directly accessible to rho-tau molecules for energy transfer. By titration, the dissociation constant of tau was determined to  $1.0 \pm 0.5$   $\mu$ M. A cleavage procedure of  $\alpha$  and  $\beta$ -tubulin was performed by subtilisin treatment to determine the influence of the C-terminal tails of  $\alpha\beta$ -tubulin on the tau-MT interaction. No difference in distances and binding parameters between undigested and cleaved tubulin was observed. Moreover, CLSM images displayed a heightened concentration of fluorescent tau in patches along MTs in living cells. FRET experiments revealed in particular higher efficiencies between GFP-tau to mCherry-tubulin  $\alpha$  proteins in these locations. Overall, our results suggested no involvement of the hypervariable and highly acidic C-terminal tails of  $\alpha$ -and  $\beta$ tubulin in MT-tau binding. Besides, the modified distribution of fluorescent tau could be implicated in a local modification of mechanical properties of MTs.

[1] Devred F, Barbier P, Douillard S, Monasterio O, Andreu JM, Peyrot V. *Biochemistry* (2004) 43: 1052010531.

[2] Sillen A, Barbier P, Landrieu I, Lefebvre S, Wieruszeski JM, Leroy A, Peyrot V, Lippens G. *Biochemistry* (2007) 46: 3055-3064.

[3] Devred F, Douillard S, Briand C, Peyrot V. *FEBS Lett* (2002) 523: 247-251.

[4] Amniai L, Barbier P, Sillen A, Wieruszeski JM, Peyrot V, Lippens G, Landrieu I. *FASEB J* (2008) in press.

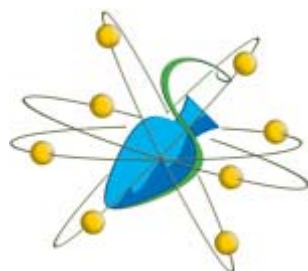
## Métastabilité des peptides C-terminaux de la tubuline ou oxydation ?

D. Calligaris<sup>†</sup>, L. Sellami<sup>†</sup>, C. Villard<sup>†</sup>, L. Terras<sup>§</sup>, P. Verdier-Pinard<sup>†</sup>, D. Braguer<sup>†</sup> et D. Lafitte<sup>†</sup>

<sup>†</sup> *INSERM UMR 911, Centre de Recherche en Oncologie biologique et en Oncopharmacologie; Aix-Marseille Université; MaP site Timone, Faculté de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France*

<sup>§</sup> *Société Synprosis, Hôtel Technologique; BP 100, 13382 Marseille Cedex 13, France*

Les modifications de la partie C-terminale des isotypes  $\alpha$  de tubuline induisent d'importantes répercussions sur la liaison de certaines MAPs (Microtubules Associated Proteins). Il est donc crucial de savoir si une telle modification peut avoir lieu au cours de stress cellulaires majeurs tels que le stress oxydatif. L'analyse par ionisation douce (MALDI ou electrospray) en mode positif de peptides mimant l'extrémité C-terminale de l'isotype k-alpha1 de la tubuline sous sa forme tyrosinée ou non révèle des traces de fragmentation. En augmentant l'énergie Laser (mode MALDI), une augmentation de la fragmentation peptidique observée par ISD (In-Source Decay). Une faible augmentation de l'énergie Laser est nécessaire pour fragmenter ces peptides dont la principale caractéristique est un enchaînement régulier d'acides aminés acides les rendant fortement métastables. En mode PSD ou CID, la séquence complète de ces peptides est obtenue. Cette métastabilité disparaît en mode négatif ou seul le peptide natif est présent et n'est pas fragmenté quel que soit l'augmentation de l'énergie Laser. Notre étude démontre donc que l'analyse en mode MALDI positif ne permet pas de conclure sur la dégradation des peptides C-terminaux en condition de stress oxydatif dans la mesure où les fragments peuvent être apparentés à des ions métastables. Par contre, l'analyse MALDI en mode négatif de peptides k-alpha1 incubés en condition oxydatives révèlent la présence de produits de dégradation ne pouvant être que le résultat d'un stress oxydatif.



**UMR-MD3**  
**Université de la Méditerranée**

**Relations Hôtes Parasites**  
**Pharmacologie et thérapeutique**

## Large genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-1 and its association with quinine and chloroquine susceptibilities

Stéphane Pelleau, Lionel Bertaux, Sébastien Briolant, Michael Ferdig, Véronique Sinou, Bruno Pradines, Ronan Jambou, Daniel Parzy.

UMR-MD3 Relations hôtes-parasites, pharmacologie et thérapeutique

Quinine remains the first-line therapy for severe malaria, and pregnant women. However new data highlight appearance of isolates with less susceptibility to quinine. Mechanisms involved in this resistance are not clearly understood. As for chloroquine and mefloquine, a role for mutations in *Pfcr*t and *Pfmdr*1 genes has been incriminated. However recent studies pointed out the role of the *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (PfNHE-1) in this resistance. Polymorphism in a DNNND coding microsatellite (ms4760) was suggested to be linked to a higher quinine IC<sub>50</sub> phenotype. We analyzed this link for a large set of isolates from different part of the world with both data on quinoline in vitro sensitivity and polymorphism of *Pfcr*t (codon 76) and *Pfmdr*1 (codon 86, 184, 1034, 1042, 1246). For 113 isolates, *Pfcr*t K76T and *Pfmdr*1 N86Y were associated with both high chloroquine and mefloquine IC<sub>50</sub> (p<0.01). *Pfmdr*1 Y184F was associated with higher mefloquine IC<sub>50</sub> (p=0.01). No *Pfcr*t and *Pfmdr*1 polymorphism could be significantly linked to quinine susceptibility. Sequences of the *pfnhe*-1 ms4760 were obtained for 69 additional isolates, totalizing 182 sequences. Out of the 36 profiles detected, 24 were not previously described. This pointed out a large diversity of this gene related to i) variations in the number of repeats in the 6 blocks which constitute the microsatellite, ii) and to various SNPs in these blocks. As previously described our data support the DNNND repeats in block 2 of *Pfnhe* as a marker of quinine-resistance. Isolates carrying two or three DNNND had significantly higher quinine IC<sub>50</sub>, compared to those carrying only one repeat (p<0.01). Moreover, the number of DNNND repeats was also associated with chloroquine IC<sub>50</sub> (p<0.01). Strong associations between block 3 and quinine (p=0.017) or chloroquine (p<0.01) decreased susceptibilities were also found. Isolates without block 3 were more susceptible to drugs than others. Studies are needed to understand the functional role of PfNHE and how the polymorphisms affect its function. Future studies should also take into account the complex links between *Pfcr*t, *Pfcr*t and *Pfnhe* as a coevolution between these genes cannot be excluded.

## **Title: Modeling of longitudinal tumor size data in clinical oncology studies of drugs in combination**

**Authors:** N. Frances (1), L. Claret (2), F. Schaedeli Stark (3), R. Bruno (2), A. Iliadis (1)  
(1) School of Pharmacy, Université de la Méditerranée, Marseille, France (2) Pharsight Corp., Mountain View, USA (3) Hoffman-La Roche, Basel, Switzerland

**Introduction:** The analysis of tumor size measurements, obtained in clinical studies involving combination chemotherapy, remains an open modeling problem. We used retrospective clinical data in metastatic breast cancer in order to investigate whether the contribution to the anti-tumor effect of each compound in a combination setting can be estimated 1) from combination data with or without single agent data, and 2) from datasets with a limited number of patients. **Methods:** Data concerning tumor size measurements and treatments characteristics were available for docetaxel (D, n=223), capecitabine (C, n=168) [1, 2] given as single agents and their combination (D+C, n=222) [3]. The developed model is an extension of already presented disturbed growth models [4, 5] and it is based on the following hypotheses: 1) Tumor growth is exponential or Gompertz; 2) K-PD model describes administration protocols; 3) Resistance is materialized by exponential decline of cell-kill rate; 4) Drugs are combined either in a linear, or Emax, or Weibull model involving a drug interaction term. Population analyses were performed using NONMEM Version 6 within a MATLAB environment. The models were validated using posterior predictive checks. **Results:** In the developed models, over-parameterization was the most frequent problem. KPD models involve only one parameter expressing the dynamics of drug amounts in the cellkill rate formulation. This parameter was obtained for D and C from the single agent studies and was fixed in the analysis using the combination data only. When using the combination data only, the contribution of each drug to the anti-tumor effect was accurately estimated and the estimates were consistent with those obtained using single-agent data. The effect of the 2 drugs was found to be additive with no drug interaction term. Situation #2 is still under investigation. **Conclusion:** Using combination data, the tumor size dynamic model parameters were successfully estimated. Further investigations are in progress for assessing the minimum required extent and type of clinical data for evaluating drug combinations in oncology. This model will be part of a modeling framework to simulate expected clinical response of new compounds and to support end-of-phase II decisions and design of phase III studies [6].

### **References:**

- [1] Blum JL, Jones SE, Buzdar AU, et al: Multicenter Phase II Study of Capecitabine in Paclitaxel-Refractory Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 17: 485-493, 1999.
- [2] Blum JL, Dieras V, Mucci Lo Russo P, et al: Multicenter, phase II study of capecitabine in taxanepretreated metastatic breast carcinoma patients, *Cancer* 92:1759-1768, 2001.
- [3] O'Shaughnessy J, Miles D, Vukelja S et al. Superior survival with capecitabine plus docetaxel combination therapy in anthracycline-pretreated patients with advanced breast cancer: Phase III trial results. *J Clin Oncol* 12: 2812-2823, 2002.
- [4] Iliadis A, Barbolosi D: Optimizing drug regimens in cancer chemotherapy by an efficacy-toxicity mathematical model. *Comput Biomed Res* 33:211-226, 2000.
- [5] Claret L, Girard P, Zuideveld KP, et al: A longitudinal model for tumor size measurements in clinical oncology studies. PAGE 15 (abstract 1004), 2006a [[www.page-meeting.org/?abstract=1004](http://www.page-meeting.org/?abstract=1004)].
- [6] Claret L, Girard P, O'Shaughnessy J et al: Model-based predictions of expected anti-tumor response and survival in phase III studies based on phase II data of an investigational agent. *Proc. Am Soc Clin Oncol*, 24, 307s (abstract 6025), 2006b.



# Dosage par CLHP des alcaloïdes majoritaires d'une plante médicinale cambodgienne *Stephania rotunda* Lour.

Sothavireak Bory<sup>a</sup>, Sok-Siya Bun<sup>a,\*</sup>, Riad Elias<sup>a</sup>, Sun Kaing Cheng<sup>b</sup>, Béatrice Baghdikian<sup>a</sup>, Hot Bun<sup>c</sup>, Evelyne Ollivier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Pharmacognosie et Ethnopharmacologie, UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, F-13385 Marseille cedex 5, France.

<sup>b</sup> Département de Phytochimie, Faculté de Pharmacie, Cambodian University of Health Sciences, 73 Bd Monivong, Phnom Penh, Cambodia.

<sup>c</sup> Laboratoire de Pharmacocinétique et Toxicocinétique, UMR-MD3, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, F-13385 Marseille cedex 5, France.

## Résumé

*Stephania rotunda* Lour., Menispermaceae, est une plante traditionnellement utilisée dans le traitement des fièvres d'origine palustre au Cambodge. Les molécules responsables de l'activité antiplasmodiale sont des alcaloïdes. Dans les tubercules, les alcaloïdes majoritaires sont la cépharanthine, la xylopinine et la tétrahydropalmatine. L'objectif de notre travail a porté sur la mise au point et la validation d'une méthode de dosage par CLHP des alcaloïdes majoritaires du tubercule de *Stephania rotunda*. La méthode développée et validée a été utilisée, par la suite, pour déterminer la teneur en alcaloïdes majoritaires, notamment en cépharanthine dans le tubercule de cette plante. Nous avons réalisé, dans un premier temps, la mise au point d'une méthode de dosage par CLHP des trois alcaloïdes majoritaires. La méthode retenue utilise une colonne Symmetry C<sub>8</sub> et une phase mobile : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25mM ; pH=3,5 avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) - CH<sub>3</sub>CN (80:20 ; v/v) avec une détection UV à 282 nm. La méthode d'extraction des alcaloïdes a été également optimisée. Le protocole est basé sur une lixiviation avec du dichlorométhane en milieu acide. Enfin, la méthode de dosage par étalonnage interne a été validée. La chélidonine a été choisie comme étalon interne. Les critères de validation étudiés : spécificité, linéarité, fidélité, limite de détection (LOD) et limite de quantification

(LOQ) sont satisfaisants. Dans les tubercules étudiés, la teneur en alcaloïdes majoritaires est de **2,87%**, celle de cépharanthine est de **1,29%**.

**Mots Clés :** *Stephania rotunda* Lour., Menispermaceae, Cambodge, Alcaloïdes, Cépharanthine, Xylopinine, Tétrahydropalmitine, Extraction, CLHP.

## **Positive interaction between Lapatinib and Capecitabine in human breast cancer models: *In vitro* study of molecular determinants.**

Mohamed Chefrou<sup>1,2</sup>, Jean-Louis Fischel<sup>1</sup>, Patricia Formento<sup>1</sup>, Sarah Giacometti<sup>2</sup>, Nicole Renee<sup>1</sup>, Cedric Mercier<sup>2</sup>, Gerard Milano<sup>1</sup> and Joseph Ciccolini<sup>2,1</sup>. Centre Antoine Lacassagne, Nice, France; <sup>2</sup>Universite de la Mediterranée, Marseille, France

**Background:** Lapatinib (Tykerb®) is an innovative small molecule with a dual-TKI inhibitory action against both HER1 and HER2. Lapatinib has demonstrated antiproliferative efficacy in various models, including breast tumors, thus heightening the expectations for new breast cancer therapies. The association of Lapatinib with Capecitabine (Xeloda®) has been recently approved, both in the USA and in Europe, in patients with HER2+ metastatic breast cancer, relapsing after trastuzumab treatment. However, little is known on the exact molecular mechanisms underlying the increase in efficacy expected when combining these drugs.

### **Methods:**

In the following preclinical study, we studied the molecular determinants of this new targeted drug / antimetabolite association on a panel of representative human breast cancer cell lines: BT474, MCF-7, MDA-MB-468, SK-BR-3, T47D and ZR-75. Effects of concomitant and sequential drug combinations on proliferation and apoptosis were measured, along with the study of the determinants of response/resistance to Capecitabine (e.g., dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidylate synthase (TS), and thymidine phosphorylase (TP) levels), to Lapatinib, (e.g., members of the HER1/2 signaling pathway), and to proliferation (P21) and apoptosis (Bax, Bcl-2).

### **Results:**

Additive to moderate synergistic effects were demonstrated (Chou & Talalay combination indices, CI) with CI's ranging between 0.55 and 1.03. Further experiments were performed to identify the mechanisms underlying the efficacy of the combination. We observed that Lapatinib down-regulated thymidylate synthase (-30%), thus suggesting a better cytotoxic effect of Capecitabine when tumor cells were preliminary exposed to Lapatinib, but had not effect on DPD activity. Impact on TP levels was model-dependent, but could lead additionally to a better activation towards active metabolites eventually. Besides, adding Capecitabine to Lapatinib strongly down-regulated P-AKT (e.g., from -56 to -100%) and p-P42/44 (-78 to 100%), allowing a deeper inhibition of the HER1 and HER2 downstream signaling pathway. A +150 to +300% increase of the Bax/Bcl2 ratio in cells exposed to both drugs was observed, leading to the enhancement of apoptosis and cell death. Those findings were consistent with the observation that the association of Lapatinib and Capecitabine led to an increase of P21 protein expression and consequently to cell cycle arrest.

### **Conclusion:**

Taken together, these results suggest that the more-than-additive effects observed when associating Lapatinib and Capecitabine is mostly based both on TS modulation and HER1 and HER2 signaling pathways down-regulation, eventually resulting in apoptosis and cell death. *In vivo* experiments are ongoing to fully confirm these data.

# La modélisation mathématique

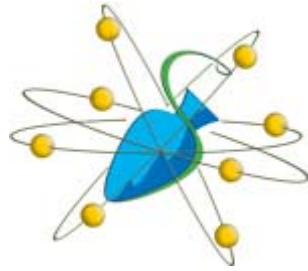
au service des thérapies anticancéreuses.

## Groupe de Modélisation Mathématique en Oncologie Clinique<sup>i</sup>

13. (1) UMR CNRS 6632, Université de Provence, LATP, 39 rue F. Joliot Curie, 13453 Marseille Cedex  
(2) UMR MD3, Université de la Méditerranée, Faculté de Pharmacie, laboratoire de pharmacocinétique, 27, boulevard Jean Moulin 13385 Marseille Cedex 5.  
(3) Oncologie pédiatrique, hôpital pour Enfants la Timone, Marseille.  
(4) Unité d'oncologie médicale, hôpital la Timone, Marseille.

Les médecins disposent actuellement de médicaments puissants (cytotoxiques et cytostatiques) pour lutter contre le cancer, néanmoins la gestion de ces produits pose encore de nombreux problèmes à résoudre afin d'optimiser l'efficacité des traitements et de limiter leurs effets toxiques. Notamment, le choix d'une stratégie thérapeutique optimale est principalement conditionné par une bonne connaissance de l'évolutivité de la maladie, en particulier d'une classification précise de son stade, et par une maîtrise de la variabilité inter-individuelle afin de concevoir des traitements adaptés en fonction de chaque cas. Dans ce contexte, la modélisation mathématique s'avère être un outil très efficace afin de fédérer et d'utiliser au mieux le grand nombre d'informations biologiques et pharmacologiques disponibles. Dans ce sens, un certain nombre de travaux ont été entrepris en partenariat entre l'équipe de pharmacocinétique de la faculté de pharmacie de Marseille (2), l'équipe de mathématiques appliquées du CMI de Marseille (1) et en collaboration avec divers services d'oncologie clinique ((3), (4), Pr Freyer, Lyon-Sud, Dr B. Caillou, Villejuif). Nous présentons une vue d'ensemble de ces projets de recherches, ayant des retombées cliniques concrètes et reposant sur différentes théories mathématiques : densification d'une chimiothérapie à l'aide d'un modèle PK-PD ; études de population ; PK-toxicité-efficacité pour une association d'agents anticancéreux ; gestion d'une chimiothérapie métronomique ; modélisation de l'évolution métastatique et applications : raffinement des classifications existantes (TNM,...), choix du nombre de cycles de chimiothérapie adjuvante, optimisation des antiangiogéniques. Dans le cadre de l'ANR-09-BLAN-0217-01 « Memorex\_PK », les compétences de deux équipes sont mises en œuvre pour valider expérimentalement chez le petit animal les modèles de l'évolution métastatique et de l'efficacité des différents traitements anticancéreux. Nous espérons que cette présentation pourra donner des idées plus précises sur le bénéfice que l'on peut tirer d'une synergie résultant du rapprochement entre médecins, pharmacologues, biologistes et mathématiciens, dans le traitement des cancers.

<sup>i</sup> N. André (3), D. Barbolosi (2), A. Benabdallah (1), S. Benzekry (1), G. Chapuisat (1), J. Ciccolini (2), Y Dermenjian (1), N. Frances (2), C. Faivre (2), J-C Gentet (3), M. Henry (1), F. Hubert (1), A. Iliadis (2), H. Marouani (2), C. Mercier (4), F. Verga (1), C. Woloch (2).



**INRA 1260 / INSERM 476**  
**Université de la Méditerranée**

**Nutriments lipidiques  
& prévention des maladies métaboliques**

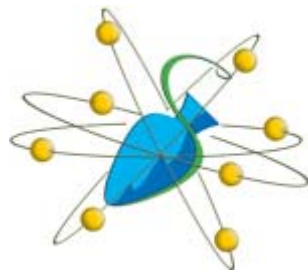
## **EFFET DU RESVERATROL SUR L'AMMELIORATION D'UN DIABETE DE TYPE II**

Mai Anh DAO et al

UMR INRA 1260

Le développement croissant des maladies métaboliques et notamment du diabète est actuellement considéré comme une épidémie mondiale selon l'Organisation Mondiale de la Santé. En Europe une croissance de 16% de la maladie est prévue d'ici à 2025. Les complications cardiaques, vasculaires, rénales et ophtalmologiques, augmentent également le coût humain et économique de la maladie. Il devient urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. D'autre part, il n'existe aucune molécule permettant de prendre en compte de manière globale et durable la complexité du désordre métabolique.

Une alternative est de prévenir l'apparition de la maladie chez les personnes à risque et/ou d'accompagner le traitement du diabète déclaré par la prise de compléments alimentaires. Les approches nutritionnelles et de compléments alimentaires fonctionnels sont ainsi considérées comme " sécuritaires " mais leur efficacité est jusqu'à présent considérée comme faible. De nouvelles molécules naturelles sont actuellement en cours de mise sur le marché et de nombreuses études, suggèrent que le Resvératrol peut correspondre à une approche thérapeutique, pharmacologique et alicamenteuse. Son mécanisme d'action serait basé sur des effets antioxydants et anti-inflammatoires. Par ailleurs, d'autres travaux ont démontrés que le resvératrol est impliqué dans les mécanismes de restriction calorique et dans la restauration d'une sensibilité à l'insuline. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le resveratrol pourrait agir sur l'amélioration du diabète de type 2 par d'autres mécanismes que ceux énoncés plus haut. Nous avons évalué l'effet du resveratrol sur l'expression intestinale d'une glucoincrétine (GLP-1) sur des souris soumises à un régime riche en graisse supplémenté ou pas en resveratrol. Nos résultats démontrent que le resveratrol n'a pas d'effet sur le poids ainsi que sur la prise alimentaire. Par contre, la supplémentation en resveratrol améliore la tolérance au glucose. Nos résultats démontrent que le resveratrol induit l'expression du gène codant GLP-1 dans l'iléon et le colon. Cette induction s'accompagne d'une augmentation du taux de protéine dans le colon, mais aussi dans le sang de la veine porte. La conséquence d'une telle induction est l'augmentation de la synthèse d'insuline et donc de la diminution de la glycémie. L'implication de GLP-1 dans l'amélioration de la tolérance au glucose par le resveratrol a été confirmé par l'utilisation d'animaux KO pour le récepteur au GLP-1. En effet, chez de tels animaux, le resveratrol n'améliore pas la tolérance au glucose et n'induit plus la synthèse d'insuline. Ces résultats confirment donc la possibilité d'utilisation du resveratrol comme complément à une thérapeutique.



**EA 1784**  
**Université de la Méditerranée**

**Biogénotoxicologie et Mutagénèse Environnementale**

# ÉTUDE DES INTERACTIONS Ni<sup>2+</sup>-NUCLÉOTIDES ET Ni<sup>2+</sup>-ADN PAR MICROCALORIMÉTRIE ISOTHERME

D. Bergé-Lefranc, F. Chaspoul et Ph. Gallice

Laboratoire Chimie Générale, Prévention des Risques et Nuisances Technologiques EA  
1784 Biogénétoxicité et Mutagenèse Environnementale FR3098 ECCOREV Aix-  
Marseille 2, Faculté de Pharmacie, Marseille

L'exposition aux sels de nickel a été rapportée comme carcinogène chez l'homme et l'animal. Des études ont montré que Ni<sup>2+</sup> induit des dommages à l'ADN et un stress oxydatif. Toutefois, le mécanisme d'action reste à l'heure actuelle encore peu connu.

L'objectif de ce travail a été dans une première étape d'étudier l'interaction Ni<sup>2+</sup>-nucléotides (AMP, GMP et CMP) et dans une seconde, l'interaction Ni<sup>2+</sup>-ADN. Ces interactions ont été déterminées par microcalorimétrie isotherme à 298K, en milieu tampon MES, NaCl 0,15 M et pH 6,5.

Les résultats obtenus ont permis de mesurer la constante d'affinité K, la stoechiométrie n et les paramètres thermodynamiques des liaisons ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$  et  $\Delta S^\circ$ ).

Ces résultats sont analysés et discutés comparativement aux observations structurales et spectroscopiques rencontrées dans la littérature.

De plus les variations d'affinité en fonction des isotopes du nickel sont étudiés.



Cr(VI) altère la respiration mitochondriale par augmentation du ratio NADH/NAD<sup>+</sup>

F. CHASPOUL, W. LIU, D. BERGE-LEFRANC, P. GALLICE

Laboratoire Chimie Générale/ Prévention des Risques et Nuisances Technologiques  
EA 1784 - FR 3098 ECCOREV - Faculté de Pharmacie - Campus Santé Timone

L'exposition au Cr(VI), souvent associée au cancer pulmonaire, entraîne par ailleurs des ulcérations de la peau et des pathologies respiratoires. Les principaux mécanismes du métabolisme du Cr(VI) sont très complexes. Dans ce domaine nous avons démontré Cr(VI) exerçait un effet délétère au niveau du catabolisme du glucose par altération de la fonction mitochondriale. Dans ce travail, l'effet de Cr(VI) au niveau de la mitochondrie du fibroblaste humain en culture est étudié. Le fonctionnement des différents complexes mitochondriaux, constituants de la chaîne respiratoire, a été étudié par oxymétrie en présence de Cr(VI), à l'aide de différents inhibiteurs spécifiques. La consommation d'oxygène par les fibroblastes a été mesurée en présence de roténone, thenoyltrifluoroacétone, cyanure, et oligomycine, inhibiteurs respectifs des complexes I, II, III et IV. Les résultats obtenus ne montrent pas de variation significative de la consommation d'oxygène en présence et absence de Cr(VI) ( 5 et 20  $\mu$ M). Cr(VI) ne semble donc pas altérer les différents complexes. Un dosage de la nicotinamide adénine dinucléotide (NADH), substrat du complexe I, a alors été réalisé dans les fibroblastes. Il apparaît une augmentation de 50% du rapport NADH/NAD en présence de Cr(VI). Ce résultat peut être relié à une augmentation des espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) associée à une diminution de la respiration comme rapporté antérieurement. Ainsi le mécanisme d'action de Cr(VI) pourrait s'expliquer par la production des ERO au niveau mitochondrial.

