



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ECOLE DOCTORALE *BIOSE*

(Biologie Sante Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lorraine

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé

par **Effrosyni GIKIPOULOU**

**Voies de signalisation cobalamine-dépendantes
de l'expression du gène *MDR-1*.**

Une cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ?

Le 13 Décembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs :

Pr. Jacques ROBERT Professeur à l'Université Victor Segalen Bordeaux 2, Bordeaux

Dr. Loris BAGGETTO Directeur de recherches au CNRS, Lyon

Examineurs :

Pr. Edward QUADROS Professeur à SUNY-Downstate Medical Center, New York

Pr. Jean-Louis MERLIN Professeur à la Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Pr. Jean-Louis GUEANT Professeur à la Faculté de Médecine, Université de Lorraine
(Directeur de laboratoire)

Dr. Marc MERTEN Maître des conférences (HDR) à la Faculté de Médecine,
Université de Lorraine (Directeur de thèse)

Ιθάκη

Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,
να εύχεται νάναι μακρύς ο δρόμος,
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.

Τους Λαιστρυγόνες και τους Κύκλωπας,
τον θυμωμένο Ποσειδώνα μη φοβάσαι,
τέτοια στον δρόμο σου ποτέ σου δεν θα βρεις,
αν μιν' η σκέψις σου υψηλή, αν εκλεκτή
συγκίνησις το πνεύμα και το σώμα σου αγγίζει.
Τους Λαιστρυγόνες και τους Κύκλωπας,
τον άγριο Ποσειδώνα δεν θα συναντήσεις,
αν δεν τους κουβανείς μες στην ψυχή σου,
αν η ψυχή σου δεν τους στήνει εμπρός σου.

Να εύχεται νάναι μακρύς ο δρόμος.
Πολλά τα καλοκαιρινά πρωϊά να είναι
που με τι ευχαρίστησι, με τι χαρά
θα μπαίνεις σε λιμένας πρωτοειδωμένους,
να σταματήσεις σ' εμπορεία Φοινικικά,
και τες καλές πραγμάτειες ν' αποκτήσεις,
σεντέφια και κοράλλια, κεχριμπάρια κ' έβενους,
και ηδονικά μυρωδικά κάθε λογής,
όσο μπορείς πιο άφθονα ηδονικά μυρωδικά,
σε πόλεις Αιγυπτιακές πολλές να πας,
να μάθεις και να μάθεις απ' τους σπουδασμένους.

Πάντα στον νου σου νάχεις την Ιθάκη.
Το φθάσιμον εκεί ειν' ο προορισμός σου.
Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου.
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,
πλούσιος με όσα κέρδισες στο δρόμο,

Ithaque

Quand tu prendras le chemin d'Ithaque,
souhaite que la route soit longue,
pleine d'aventures, pleine d'enseignements.

Les Lestrygons et les Cyclopes,
ne les crains pas, ni la colère de Poséidon,
jamais tu ne trouveras rien de tel sur ton chemin,
si ta pensée reste élevée, si une émotion rare
étreint ton esprit et ton corps.
Les Lestrygons et les Cyclopes,
tu ne les rencontreras pas, ni l'irascible Poséidon,
si tu ne les transportes pas dans ton âme,
si ton âme ne les fait surgir devant toi.

Souhaite que la route soit longue.
Que nombreux soient les matins d'été
où – avec quel plaisir et quelle joie ! –
tu découvriras des ports que tu n'as jamais vus ;
arrête-toi dans les comptoirs phéniciens
pour te procurer des précieuses marchandises,
ambre, corail, ébène, nacre,
et capiteux parfums de toutes sortes,
le plus que tu pourras de capiteux parfums ;
visite aussi beaucoup de villes égyptiennes,
et n'aie de cesse de t'instruire auprès de ceux qui savent.

Garde toujours Ithaque présente à ton esprit.
Y parvenir est ta destination finale.
Mais ne te hâte surtout pas dans ton voyage.
Mieux vaut le prolonger pendant des années ;
et n'aborder dans l'île que dans ta vieillesse,
riche de ce que tu auras gagné en chemin,

μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.

sans attendre d'Ithaque aucun autre bienfait.

Η Ιθάκη σ'έδωσε τ' ωραίο ταξίδι.

Ithaque t'a offert le beau voyage.

Χωρίς αυτήν δεν θάβγαίνες στον δρόμο.

Sans elle, tu n'aurais pas pris la route.

Άλλα δεν έχει να σε δώσει πια.

Elle n'a plus rien d'autre à te donner.

Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δε σε γέλασε.

Et même si tu la trouves pauvre, Ithaque ne t'a pas trompé.

Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,

Sage comme tu l'es, avec une expérience pareille,

ήδη θα το κατάλαβες οι Ιθάκες τι σημαίνουν.

Tu as sûrement déjà compris ce que les Ithakes signifient.

Κωνσταντίνος Π. Καβάφης, 1911

Konstantinos P. Kavafis, 1911

Ithaki

When you set out on your journey to Ithaki,
pray that the road is long,
full of adventure, full of knowledge.

and sensual perfumes of all kinds,
as many sensual perfumes as you can;
visit many Egyptian cities,
to learn and learn from scholars.

The Lestrygonians and the Cyclops,
the angry Poseidon -- do not fear them:
You will never find such as these on your path,
if your thoughts remain lofty, if a fine
emotion touches your spirit and your body.
The Lestrygonians and the Cyclops,
the fierce Poseidon you will never encounter,
if you do not carry them within your soul,
if your soul does not set them up before you.

Always keep Ithaki in your mind.
To arrive there is your destination.
But do not hurry the voyage at all.
It is better to let it last for many years;
and to anchor at the island when you are old,
rich with all you have gained on the way,
not expecting that Ithaki will offer you riches.

Pray that the road is long.
That the summer mornings are many, when,
with such pleasure, with such joy
you will enter ports seen for the first time;
stop at Phoenician markets,
and purchase fine merchandise,
mother-of-pearl and coral, amber and ebony,

Ithaki has given you the beautiful voyage.
Without her you would have never set out on the road.
She has nothing more to give you.

And if you find her poor, Ithaki has not deceived you.
Wise as you have become, with so much experience,
you must already have understood what Ithakas mean.

Konstantinos P. Kavafis, 1911

Remerciements

Je tiens à remercier...

*Monsieur le Professeur **Jacques Robert**. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en tant que rapporteur. Je vous remercie de votre gentillesse, de vos remarques pertinentes et du bon sens avec lequel vous avez accompli votre mission.*

*Monsieur le Docteur **Loris Baggetto**. Je suis honorée que vous ayez accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse. Je vous remercie de votre disponibilité, du travail efficace et de vos encouragements très importants à quelques jours de la soutenance.*

*Monsieur le Professeur **Jean-Louis Merlin**. J'ai suivi votre travail depuis plusieurs années et je suis très contente et honorée de vous avoir en tant que juge de mon travail de thèse. Je vous remercie de m'accorder de votre temps précieux.*

*Professor **Edward Quadros**. I would like to present you my deepest gratitude, to thank you for having accepted to judge my thesis work and to have accomplished this role in a friendly and kind way. I would also like to thank you for having travelled from New York to be present the moment of the thesis defense and given this way a lot of your time.*

*Monsieur le Professeur **Jean-Louis Guéant**. Je vous remercie tout d'abord de m'avoir acceptée dans le laboratoire que vous dirigez, pour effectuer mon stage de Master 1, il y a sept ans de cela. A partir de ce moment, ma formation a pris le chemin de la recherche. Je vous remercie de m'avoir encouragé à continuer par un Master 2 et bien sur de m'avoir offert l'occasion de poursuivre en thèse. Nous avons parcouru du chemin ensemble, tant au niveau scientifique qu'au niveau humain. Je vous admire pour l'énergie que vous fournissez à votre travail et j'en prends exemple. Je vous remercie également de m'avoir donné l'occasion de m'ouvrir à un monde scientifique international, de m'avoir enseigné comment y présenter mon travail et de me pousser toujours vers l'amélioration. Je vous remercie de m'avoir épaulé et soutenue en tant que directeur du laboratoire, les moments où j'en ai eu le plus besoin. Merci pour tout...*

*Monsieur le Docteur **Marc Merten**. Je vous remercie, Marc, de tout l'accompagnement que vous avez effectué en tant que directeur de cette thèse. Je vous remercie de votre patience. Je vous remercie aussi du temps que vous m'avez accordé pour les innombrables discussions très formatrices, scientifiques ou autres. Je vous remercie de votre confiance, qui m'a rendu très autonome dans plusieurs niveaux du travail, même si j'ai encore beaucoup à apprendre... Je vous remercie de votre gentillesse et de votre façon de considérer un étudiant, même sans expérience. J'espère avoir acquis*

un peu de votre capacité d'appréhender un sujet. En tout cas je vous remercie de m'avoir appris à regarder la pomme sur plusieurs angles...car tout est une question d'optique...

La **Ligue Contre Le Cancer**, Nationale et Départementale, et plus particulièrement Monsieur Kessler et Monsieur Pilon. La LCC m'a permis financièrement de réaliser cette thèse en m'accordant une bourse de trois ans. Je vous remercie de l'aide concrète, mais aussi de l'honneur que ceci représente. J'espère avoir apporté une petite pierre au mur contre la maladie.

Le conseil scientifique de l'UHP pour le **Prix Wittner** 2005.

Toute l'équipe de **l'IUT Nancy-Brabois**, département Génie Biologique Agro-alimentaire. Je remercie plus particulièrement **François Lucas** pour m'avoir confié le poste de Moniteur et le poste d'A.T.E.R. par la suite. Je te remercie, François, de ta confiance et de ta patience et de m'avoir conseillé et répondu à toutes mes questions concernant l'enseignement. Tu m'as appris comment être un professeur... **Fatima Jeddi**, qui a été une aide plus que précieuse, au bon déroulement des TP. Merci Fatima pour cette merveilleuse collaboration ! Les collègues **Benjamin Albert-Fournier**, **Sandrine Giulberti** et **Nicolas Gripon**, pour l'excellente collaboration et pour leurs conseils. Merci Sandrine de m'avoir initié aux expériences de physiologie animale. **Catherine Corbier**, la directrice du département, pour son accueil. **Nathalie Petot**, qui m'a vraiment touché par sa gentillesse et sa disponibilité. Je te remercie, Nathalie, de toute ton aide concrète au niveau administratif. Je remercie également **Catherine Colson**, **André Marchand** et toute l'équipe pour la bonne ambiance et leur accueil chaleureux.

Toute l'équipe du **laboratoire N.G.E.R.E. / Inserm U954** ou j'ai effectué l'ensemble des travaux de cette thèse.... Ce laboratoire a été pour moi une seconde maison pendant toutes ces années. J'ai beaucoup apprécié le véritable esprit d'équipe, mais aussi son caractère multiculturel. J'y ai eu l'occasion de rencontrer des personnes venues des pays très lointains....

Dans cette équipe j'aimerais remercier plus particulièrement...

Nos très chères secrétaires **Dominique Guillaume** et **Catherine Tavera** pour leur gentillesse, leur patience, leur disponibilité et leur sourire si rassurant !

Mr Mrabet pour sa sympathie et ses très chaleureux encouragements tout au long de ces années. **Mr Fares Namour**, **Mr Daval** et **Mr Beck** pour leur gentillesse, leur conseils et pour avoir apporté un regard critique sur mon travail...

Brigitte Leninger-Muller pour son collaboration, ses conseils et ses encouragements...

Celine Chery pour être tout à bord la valeur sûre du laboratoire. Ta présence est rassurante et indispensable ! Je te remercie Céline pour ton amitié, tes conseils et réponses à mes questions,

toutes nos discussions, ta gentillesse et de m'avoir permis de découvrir ta beauté en tant que personne. Merci du fond du cœur...

Jean-Marc Alberto pour être l'autre pilier du laboratoire. Je te remercie pour toute l'aide excrément précieuse que tu m'as apporté au niveau scientifique et pour ta disponibilité à tout moment pour répondre à mes innombrables questions et galères... Merci d'avoir suivi mes travaux et de m'avoir tant conseillé...Merci aussi pour ton amitié, ton sourire, ton humour et les super moments que nous avons passés aussi en dehors du laboratoire...Merci pour tout...

Je voudrais aussi faire un clin d'œil aux collègues et amis qui sont partis quelques années auparavant...mais qui certains reviennent...**Sandra Audonnet** pour ses conseils surtout en culture cellulaire, **Romain Rivet** pour m'avoir appris la qPCR (il nous a torturé MDR-1 !!!) et **Nassila Akchiche** aussi pour ses conseils. Je vous remercie tous les trois pour la super ambiance, qui a quand même largement dépassé les murs du laboratoire...

Je voudrais remercier mes très chers collègues **Maatem Fofou-Caillerez**, **Hélène Pellanda**, **Soufiane Bouazzi** (avec qui nous avons essayé de répondre à des nombreuses « qiiistions d'ipiginitique ») et **Nicolas Martin**. Nous avons soutenus les uns les autres de façon très touchante, presque comme des frères et sœurs. Ce voyage de la thèse a été finalement beaucoup plus amusant et intéressant grâce à vous. Je vous remercie de votre soutien, de tout ce que nous avons partagé au laboratoire mais aussi en dehors et de votre amitié...

Je souhaite également faire un clin d'œil à Shyue-Fang Battaglia-Hsu, Rosa-Maria Rodriguez-Guéant, Philippe Gérard (merci pour toutes les discussions concernant l'actualité), Thierry Fontaine (merci pour l'aide concrète concernant le matériel du laboratoire), Mme Mazetti, Fereshteh, Shabnam, Cyril, Rania, Rose, Sophie, Sarah, Min, Racha, Justine, Pierre, Deborah (merci de l'aide concernant le matériel de WB), Patrice, Rafaela et Maïra et les remercier d'avoir contribué à la bonne ambiance au laboratoire. Je les remercie de leur collaboration, leur gentillesse et leur sourire...

Je souhaite remercier mes très chères amies **Marine Hanse** et **Émilie Keppers** d'avoir été à mes côtés depuis une bonne dizaine d'années maintenant. Votre véritable amitié, votre sourire, votre amour et votre soutien, ont été catalytiques, afin de pouvoir rendre toutes ces années mémorables ! Nous avons passé ensemble une des meilleurs périodes de notre vie ! Sans vous, elle n'aurait pas été la même...Merci pour tout...et n'oubliez pas...ceci n'est qu'un au revoir...

Tout au long de cette thèse, la vie n'a pas cessé d'avoir du parfum grec grâce à la **Maison Franco-Hellénique de Lorraine**. Nous avons dansé, dansé, dansé, fêté des événements petits et grands, discuté et analysé comme les grecs savent si bien faire... Je souhaite remercier de tout mon cœur...*Ορθοδοξία* et Bernard Salomon pour m'avoir ouvert les portes de leur maison et de leur quotidien. Je vous admire pour l'aide inconditionnelle que vous apportez aux personnes qui en ont besoin...*Μerci pour tout...* Notre présidente et professeur de danse exceptionnelle, *Κατερίνα Καραγιαννη-Καέλ*, pour son amitié, son sourire, son soutien et l'énergie qu'elle apporte à la communauté !!! Mes amis *Μαρία, Γεωργία, Μαρία, Αλεξάνδρα, Άννα, Μαρία, Κατερίνα, Δημήτρη, Αάζαρο, Αλέξανδρο, Βασίλη*, pour tous les moments que nous avons partagés, leur soutien à tous les moments difficiles et pour l'ambiance extraordinaire que nous avons ensemble créée...*τιμήσαμε τον στίχο "των ελλήνων οι κοινότητες φτιάχνουν άλλους γαλαζίες"...*! Toutes les personnes membres de la MFHL qui m'ont épaulé et encouragé pendant ces années de thèse. Notamment *Θάνος Μπενετος* et *Luisa Fombuena*, mais aussi la nouvelle génération, *Ιωάννα* et *Μαρίνα*. Je vous remercie tous de votre soutien et de votre sympathie...

Il est beau de savoir que malgré la distance il y a des personnes qui restent des véritables amis. Je remercie pour cela mes **amis en Grèce**, qui ont été à mes côtés peu importe les kilomètres et les années qui passent. *Ξανθούλα*, dédicace spéciale pour toi (*ειδικη αφιερωση για σενα...*), *Κάτια, Μαριλένα, Νίκο, Πάνο, Νίκο, Στάθη, Πάρη, Ελεάνα, Μαργαρίτα, Ανατολή...* Je vous remercie tous... *Σας ευχαριστώ όλους...* Je dédie ce travail à mon ami *Κώστα Βεϊτη*, qui nous a quitté si tôt... *Αφιερώνω αυτή την δουλειά στον Κώστα Βεϊτη που μας άφησε νωρίς...*

Je voudrais remercier ma **belle famille Αιάκου** pour leur gentillesse, leur amour et leur soutien. *Κύρια Κονδυλια, Κύριε Γιάννη*, σας ευχαριστώ για την αγάπη και την υποστήριξη σας. *Θοδωρή, Καίτη* σας εύχομαι καλό κουράγιο για την συνέχεια...

Je tiens à remercier la **famille Δεληβελιωτη** pour avoir été à mes côtés comme ma propre famille... *Σας ευχαριστώ που ήσασταν δίπλα μου σαν οικογένεια μου...Ευχαριστώ την γιαγιά Αλίκη για το καυστικό της χιούμορ και τις λιχουδιές που μας εφιάχνε τα καλοκαίρια στο Ασπρονέρι, για την υποστήριξη και την αγάπη της.... Τον Κώστα που μου έδωσε το έναυσμα για να γνωρίσω τον κόσμο εκτός Ελλάδος. Σ'ευχαριστώ για την απεριόριστη βοήθεια και υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Εύχομαι το "βαπτιστήρι" σου να σε κάνει λίγο περήφανο... Την Τζούλη για την γλυκύτητα της και την υποστήριξη της και εύχομαι το καλύτερο για το νέο μέλος της οικογένειας που καταυθάνει! Τον Θαναση που έχει υπάρξει πραγματικός θεός και που πάντα επιβλέπει... Την Κυρατσω για τις συμβουλές της και το χαμόγελο της... Πολλά φιλιά στην Αλίκη και στον Χρήστο που μεγαλώνουν με ταχύτατους ρυθμούς...Την Κάλλη για την κόκκινη βαλίτσα και ότι έβαλε μέσα από συναισθήματα, που με συντρόφευσαν όλα τα χρόνια... Τον Θαναση για το απεριόριστο χιούμορ του και την υποστήριξη του. Φιλώ το Νεφελάκι μου και τον Χάρη και τους εύχομαι να περνάνε πάντα τόσο όμορφα όσο έχουμε*

περάσει μαζί... Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον **Κώστα Γιατρά** για την βοήθεια που μου προσέφερε όταν οι γνώσεις μου στα γαλλικά περιορίζονταν ακόμη στο ...Bonjour...

Rien de tout ce que j'ai pu accomplir au domaine professionnel n'aurait été possible si **ma famille** n'avait pas suivi chacun de mes pas en me soutenant, en m'aidant, en me motivant et surtout en m'aimant... Τίποτα απ'όλα όσα έχω κατορθώσει σε επαγγελματικό επίπεδο δεν θα ήταν δυνατά εάν η οικογένεια μου δεν είχε ακολουθήσει κάθε ένα από τα βήματα μου, υποστηρίζοντας με, βοηθώντας με, παρακινώντας με και κυρίως αγαπώντας με...

Je remercie du fond du cœur mes grands-parents **Μαρία, Φρόσω, Αχιλλέα** et **Γιώργο**, qui m'ont entouré de leur amour et qui m'ont suivi au bout du monde même si j'étais la seule à voyager physiquement...Je souhaite également dédié cette thèse à mon grand-père **Γιώργο**, qui j'espère me regarde de quelque part là-haut... Ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου, τις γιαγιάδες μου **Μαρία** και **Φρόσω** και τους παππούδες μου **Αχιλλέα** και **Γιώργο** που με περιέβαλλαν με την αγάπη τους και που με ακολούθησαν στην άκρη του κόσμου, ακόμη και αν η μόνη που ταξιδεύε φυσικά ήμουν εγώ...Θα ήθελα, επίσης, να αφιερώσω αυτήν την διατριβή στον παππού μου **Γιώργο** , που ελπίζω να με καμαρώνει από κάπου εκεί ψηλά...

Je remercie mes tantes **Ρένα** et **Νασυ** pour leur amour, pour leur soutien continu et inconditionnel. Je remercie mon oncle **Γιώργο**, de m'avoir soutenu et de m'avoir appris à réfléchir comme un mathématicien... Ma tante **Γιάννα**, pour m'avoir motivé et mon oncle **Παναγιώτη**, pour toujours penser à moi... Je souhaite la meilleure réussite à ma cousine **Γεωργία** et aux cousins **Βασίλη** et **Αχιλλέα**. Ευχαριστώ τις θείες μου **Ρένα** και **Νασυ** για την αγάπη τους και για τη συνεχή και άνευ όρων υποστήριξή τους. Ευχαριστώ τον θείο **Γιώργο** , για την υποστήριξη του και γιατί με έμαθε να σκέφτονται σαν μαθηματικός ... Την θεία **Γιάννα** για την συμπαράσταση και υποστήριξη της και τον θείο **Παναγιώτη** γιατί πάντα με σκέφτεται και είναι δίπλα μου... Εύχομαι κάθε επιτυχία στην ξαδέρφη μου **Γεωργία** και στα ξαδερφάκια μου **Βασίλη** και **Αχιλλέα**.

Je sais que vous vous couchez et vous vous réveillez en ayant toujours une pensée pour moi... malgré votre angoisse vous m'avez encouragé de quitter le nid parental pour que je puisse voler de mes propres ailes...Vous avez été loin que physiquement... vous m'avez soutenu de toutes vos forces à chacune des étapes de ma vie et ensemble nous avons réussi à surmonter bien des épreuves... **Μαμά, Μπαμπά**, je vous remercie de votre amour... Je vous dédie tous les diplômes que nous avons finalement obtenus ensemble !!! Je tiens à vous dire que je suis très fière de vous et que je vous aime beaucoup...Ξέρω ότι κοιμάστε και ζυπνάτε έχοντας αγωνία για εμένα...παρόλ'αυτά αφήσατε την αγωνία σας στην άκρη και με σπρωξατε μακριά από την οικογενειακή φωλιά ώστε να μπορέσω να πετάξω με τα δικά μου φτερά... Ποτέ όμως δεν ήσασταν μακριά συναισθηματικά...με έχετε στηρίξει με όλες σας τις

δυνάμεις σε κάθε προσπάθεια μου και μαζί έχουμε καταφέρει να ξεπεράσουμε πολλές δυσκολίες...
Μαμά, Μπαμπά, σας ευχαριστώ για την αγάπη σας και σας αφιερώνω όλα τα πτυχία που καταφέραμε να
πάρουμε μαζί!!! Θέλω να σας πω ότι είμαι πολύ περήφανη για εσάς και ότι σας αγαπώ πολύ...

*Je souhaite remercier très particulièrement mon compagnon et partenaire à la vie pour son soutien indéfectible, sa patience et son soutien continu et illimité pendant toutes ces années... Je te remercie **Μπάμπη μου**, pour ta compréhension et ton aide, même si plusieurs kilomètres nous ont longtemps séparé...Je te remercie de ton amour...Ce chapitre se termine...maintenant nous pouvons ensemble commencer un nouveau...Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον σύντροφο και συνοδοιπόρο μου για την αμέριστη συμπαράσταση του, για την απεριόριστη υπομονή του και για την συνεχή υποστήριξη του όλ' αυτά τα χρόνια. Σ' ευχαριστώ Μπάμπη μου για την κατανόηση σου και την βοήθεια σου ακόμη κι αν μας χώριζαν πολλά χιλιόμετρα... Σ' ευχαριστώ για την αγάπη σου... Αυτό το κεφάλαιο κλείνει... τώρα μπορούμε μαζί να αρχίσουμε ένα καινούργιο...*

Voies de signalisation cobalamine-dépendantes de l'expression du gène *MDR-1*. Une cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ?

Contexte : La résistance aux agents anti-cancéreux souvent observée en chimiothérapie s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes tels que *MDR-1*, gérée en partie par des réactions de méthylation cellulaire (dépendantes du métabolisme de la méthionine). Malheureusement, la physiologie des réactions de méthylation régulant l'expression de *MDR-1* est insuffisamment connue. La méthionine synthase est l'enzyme clé du cycle métabolique de la méthionine et possède comme cofacteur la cobalamine (vitamine B12), suggérant un rôle crucial du couple cobalamine / méthionine synthase dans les cellules cancéreuses et dans la survenue de la chimio-résistance par l'intermédiaire de la méthylation. Nous avons trouvé que l'ajout de cobalamine à des cellules d'adénocarcinome hépatique conduisait à une répression du gène *MDR-1* qui ne passe pas par la méthylation du promoteur.

Objectif : Notre objectif est d'explorer et d'étudier les voies métaboliques situées entre le cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1*.

Méthodes : Des techniques chromatographiques, électrophorétiques, de culture cellulaire, des techniques de pharmaco-toxicologie et d'expression génique sont utilisées sur la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2.

Résultats : La répression cobalamine-dépendante du gène *MDR-1* est associée à une activation de la PLD, une diminution du facteur de signalisation Akt ainsi qu'à une inhibition de Cox2. Les voies semblent être impliquées de manière complexe. Le ciblage pharmacologique de ces voies semble potentialiser l'effet d'agents utilisés en chimiothérapie.

Conclusion/Perspectives : Cette étude devrait permettre 1) de mieux comprendre des mécanismes expliquant comment certains médicaments anticancéreux deviennent inactifs (Chimiorésistance) 2) de déterminer des paramètres d'optimisation de l'utilisation de ces anticancéreux en relation avec l'expression de *MDR-1* elle-même en relation avec le statut vitaminique B 3) de déterminer les impacts de facteurs nutritionnels (cobalamine) dans l'expression de *MDR-1* et 4) peut être d'orienter la recherche en chimiothérapie vers de nouvelles voies thérapeutiques.

Mots clés en français : Multi-drogue résistance, vitamine B12, phospholipase D, Akt, cyclooxygénase 2

Repression cobalamin-dependent signaling pathways of *MDR-1* gene: A new pharmacological target for chemotherapy?

Background: A key factor of chemioresistance is an increased expression of *MDR-1* gene, partly controlled by cellular methylation reactions. Until now, the physiology of these reactions is not clearly known. The main intracellular metabolic pathway, generating methyl donors, is the methionine cycle, the activity of which is strongly depending on B-group vitamins (B12, B9). Thus, *MDR-1* gene expression may be controlled by the activity of the methionine cycle and consequently presence of these vitamins.

Aim: The aim of this study is to determine if, and to elucidate how, the methionine cycle influences the *MDR-1* gene expression.

Methods: Chromatography, pharmacotoxicology, cell culture techniques, gene and protein expression studies have been used on the human hepatocarcinoma cell line HepG2.

Results: We showed that cobalamin-induced *MDR-1* gene repression was associated with phospholipase D activation, Akt phosphorylation, and *Cox-2* co-repression in a complex and intricate manner. We may suggest that targeting these pathways could potentiate chemotherapy.

Discussion/Conclusion : This work should allow 1) a better understanding of mechanisms explaining why some anticancer agents may become inactive, 2) to optimize utilisation of these agents in relationship with *MDR-1* gene expression and the B vitamin status, 3) to evaluate impacts of nutritional factors (cobalamin) in *MDR-1* gene expression and 4) probably develop possible ways to improve chemotherapy.

Key words in English: Multidrug resistance, vitamin B12, phospholipase D, Akt, cyclooxygenase 2

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures et tableaux	5
Avant propos	11
Revue Bibliographique	13
1. Le cancer et l'acteur <i>multi-drug resistance 1 (MDR-1)</i>	15
1.1. Le cancer	15
1.1.1. Problématique et thérapeutique	15
1.1.2. Le traitement de la chimiothérapie	16
1.1.3. Le phénomène de la chimiorésistance	19
1.2. L'acteur <i>multi-drug resistance 1 (MDR-1)</i>	21
1.2.1. Le gène <i>MDR-1</i>	21
1.2.2. Les protéines ABC	22
1.2.3. La P-glycoprotéine	23
2. Métabolisme de la méthionine	29
2.1. Le cycle de la méthionine	29
2.1.1. Les enzymes impliquées	32
2.1.2. Les métabolites	35
2.1.3. La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl)	38
2.1.4. La régulation du cycle de la méthionine	44
2.2. Implication du cycle de la méthionine dans le cancer	48
3. La voie des phospholipides	50
3.1. Les phospholipides	50
3.1.1. Le catabolisme de la phosphatidylcholine	55
3.2. Implication de la voie des phospholipides dans vie cellulaire et le cancer	57

4. La voie de la protéine kinase B/Akt	60
4.1. La protéine Akt	60
4.1.1. Les voies de régulation de la protéine Akt	61
4.2. La voie Akt, acteur de différentes voies de régulation	67
5. La voie de la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2)	70
5.1. Description de la voie COX	70
5.2. La voie Cox-2 au centre de différentes voies de régulation	72
Objectif de l'étude	77
Matériel et Méthodes	83
Résultats et Discussion	97
1. L'implication de la phospholipase D dans la diminution de l'expression du gène <i>MDR-1</i> par la cobalamine	100
1.1. Diminution de l'expression du gène <i>MDR-1</i> par la cobalamine	101
1.2. Implication de la cobalamine dans la production des métabolites du cycle de la méthionine, SAM et SAH	102
1.3. Implication de la SAM dans l'expression du gène <i>MDR-1</i>	107
1.4. Implication de la cobalamine dans la production des phospholipides PE et PC	108
1.5. Implication du bézafibrate dans l'expression du gène <i>MDR-1</i>	110
1.6. Influence de la cobalamine sur l'activité de la phospholipase D	111
1.7. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression du gène <i>MDR-1</i>	114
1.8. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression de la protéine P-gp	117
1.9. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur cytotoxicité de la vinblastine	118

2. Implication d'AKT dans la diminution de l'expression du gène

***MDR-1* induite par la cobalamine. 125**

2.1. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression de la protéine Akt 125

2.2. Effet de l'activité du cycle de la méthionine sur l'expression de la protéine Akt 127

2.3. Effet de la voie PP2A sur la régulation de *MDR-1* 130

2.4. Effet de la voie MEK sur la régulation de *MDR-1* 138

2.5. Effet de la voie PI3K sur la régulation de *MDR-1* 141

3. L'implication de Cox-2 dans la voie, PLD/AKT-dépendante, de diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine 149

3.1. Diminution de l'expression du gène *Cox-2* par la cobalamine 149

3.2. Effet de l'activité du cycle de la méthionine sur l'expression du gène *Cox-2* 150

3.3. Effet de la voie PP2A sur la régulation de *Cox-2* 153

3.4. Effet de la voie MEK sur la régulation de *Cox-2* 157

3.5. Effet de la voie PI3K sur la régulation de *Cox-2* 160

3.6. Comment le gène *Cox-2* est influencé par l'acteur PLD 162

3.7. Influence des inhibiteurs de *Cox-2* sur l'expression du gène *MDR-1* 165

3.8. Influence de la PGE2, produit de *Cox-2*, sur l'expression du gène *MDR-1* 170

Perspectives et Conclusion 177

Références Bibliographiques 191

Annexes 209

Annexe I : Fiches techniques 211

Annexe II : Publications 247

Liste des abréviations

4E-BP1	eIF-4E binding protein
ABC	ATP-Binding Cassette
ADA	Adénosine désaminase
ADK	Adénosine kinase
Akt	Protein Kinase B
ASA	Acid acetyl salicylic
BCA	Bicinchoninic Acid
BCRP	Breast cancer resistance protein
Bet	Bétaine
Beza	Bézafibrate
BHMT	Betaine-Homocysteine Methyltransferase
B-PC	Bodipy-Phosphatidylcholine
B-LysoPBut	Bodipy-LysoPhosphatidylbutanol
B-LysoPC	Bodipy-LysoPhosphatidylcholine
B-DAG	Bodipy-Diacylglycerol
B-MAG	Bodipy-Monoacylglycerol
Cbl	Cobalamine
CBS	Cystathionine synthase
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cox	Cyclooxygénase
CPSII	Carbamoyl Phosphate Synthetase II
DAG	Diacylglycerol
DHF	Dihydrofolate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMG	Dimethylglycine
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNMT	DNA methyltransferase
dTMP	Désoxythymidine monophosphate
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
Erk	Extracellular signal-regulated kinase

Liste des abréviations

FCS	Fetal Calf Serum
FI	Facteur intrinsèque
FLIP	c-FLICE-inhibitory protein
Gapdh	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GNMT	Glycine N-méthyltransférase
GSH	Glutathion
HAT	Histone acétyltransférase
HCC	Hepatocellular carcinoma
HDAC	Histone-déacétylases
Hcy	Homocysteine
IKK	I κ B Kinase
IL-6	Interleukine-6
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LPA	Acide lysophosphatidique
LysoPBut	LysoPhosphatidylbutanol
LysoPC	LysoPhosphatidylcholine
LRP	Lung resistance-related protein
MAG	Monoacylglycerol
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT	Methionine Adenosyl Transferase
MDM2	Murine Double Minute 2
MDR	Multidrug Resistance
MDR-1	Multidrug Resistance-1 gene
MEK	Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
Me-PP2A	Methyl-protein phosphatase 2
MeTHF	Methyltetrahydrofolate
MéthylèneTHF	Méthylènetetrahydrofolate
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1
MS	Methionine Synthase
MSR	Méthionine synthase réductase
MT	Methyl transferases
MTA	Méthylthioadénosine
MTHFR	Méthylènetetrahydrofolate reductase

mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide
n-But	n-Butanol
NBF	Nucleotide Binding Fold
NFκB	Nuclear Factor-κB
Nime	Nimesulide
OA	Acide okadaïque
Ole	Acide oléique
PA	Acide phosphatidique
Palm	Acide palmitique
PBut	Phosphatidylbutanol
PC	Phosphatidylcholine
PC-PAF	PC-Platelet Activating Factor
PDK	Phosphatidyl inositol dependent kinases
PDPK1	Phosphoinositide DePendent Kinase 1
PE	Phosphatidylethanolamine
PEMT	Phosphatidylethanolamine-methyltransferase
PGE2	Prostaglandine E2
P-gp	Permeability-glycoprotéine
PH domain	Pleckstrin Homology domain
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(3,4)P₂	PhosphatidylInositol (3,4)-biPhosphate
PIKK	PIKinase-related kinase
PIP₃	PhosphatidylInositol (3,4,5)-triPhosphate
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein kinase B
PKC	Protein kinase C
PLD	Phospholipase D
POL2	RNA Polymerase II
PP2A	Protein phosphatase 2
PPMT	Protein phosphatase methyl transferase
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RIPA buffer	Radio Immuno Precipitation Assay Buffer

Liste des abréviations

Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
SAH	S-adénosyl-homocysteine
SAHH	S-adénosyl-homocysteine-hydrolase
SAM	S-adenosyl-methionine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TBST	Tris-Buffered Saline/Tween 20
t-But	tert-Butanol
TCII	Transcobalamine II
TCN1	Transcobalamine 1
THF	Tetrahydrofolate
TLC	Thin Layer Chromatography
TMD	Trans Membran Domain
TNFα	Tumor necrosis factor α
TYMS	Thymidine synthase
Wort	Wortmannin(e)

Liste des figures et tableaux

Revue Bibliographique

Figure 1.1 : Nombre des décès par an selon le type de cancer.	15
Figure 1.2 : Le gène ABCB1, sur le chromosome 7q21.12.	21
Figure 1.3 : Les différents domaines structuraux de la P-glycoprotéine.	24
Figure 1.4 : Les changements de conformation de la P-glycoprotéine.	24
Figure 1.5 : Localisation de la P-glycoprotéine dans les différents tissus.	25
Figure 1.6 : Transport actif des xénobiotiques, par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine.	26
Figure 1.7 : Métabolisme hépatique de la méthionine et des folates.	30
Figure 1.8 : La S-adénosyl-méthionine (SAM).	36
Figure 1.9 : La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl).	38
Figure 1.10 : Absorption et transport de la vitamine B12 ou cobalamine (Cbl).	41
Figure 1.11 : Voie d'internalisation cellulaire de la cobalamine (Cbl).	42
Figure 1.12 : La cobalamine (Cbl), cofacteur de deux réactions indépendantes.	43
Figure 1.13 : Régulation du cycle de la méthionine par la méthionine et la SAM.	44
Figure 1.14 : Le cycle de la méthionine en liaison avec la phospholipase D (PLD).	50
Figure 1.15 : La structure d'un phospholipide (phosphoglycéride).	51
Figure 1.16 : Les phospholipides dans la bicouche membranaire.	52
Figure 1.17 : Les voies de biosynthèse de la phosphatidylcholine.	54
Figure 1.18 : Points de clivage d'un phospholipide par les différentes phospholipases.	56
Figure 1.19 : Réaction d'hydrolyse de la phosphatidylcholine.	57
Figure 1.20 : Les voies de régulation de la protéine Akt.	61

Figure 1.21 : Inhibition d'Akt par la protéine PP2A.	63
Figure 1.22 : Activation d'Akt par la voie PI3K.	64
Figure 1.23 : Activation d'Akt par la voie des MAP kinases.	66
Figure 1.24 : Les produits de l'action des enzymes COX sur l'acide arachidonique.	71

Objectif de l'étude

Figure 2.1 : Liaison des réactions de méthylation, générées par le cycle de la méthionine, dans les différentes voies de régulation cellulaire.	79
Figure 2.2 : Objectif de l'étude	81

Matériel et Méthodes

Figure 3.1 : La lignée cellulaire HepG2, observée au microscope optique, à confluence 65%.	85
Figure 3.2 : Plan expérimental de l'étude	96

Résultats et Discussion

Figure 4.1 : L'action de la Cbl sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	102
Figure 4.2 : Production de la SAM en présence de Cbl ou/et de bézafibrate.	103
Figure 4.3 : Production de la SAH en présence de Cbl ou/et de bézafibrate.	105
Figure 4.4 : Action de la SAM sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	107

Figure 4.5 : Influence de la Cbl et du bézafibrate sur la production des phospholipides PE et PC.	108
Figure 4.6 : L'action de bézafibrate sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	110
Figure 4.7 : Réaction de transphosphatidylation.	111
Figure 4.8 : Activité de la phospholipase D.	113
Figure 4.9 : Action des effecteurs de la PLD sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	115
Figure 4.10 : Action des effecteurs de la PLD sur l'expression de la protéine P-gp.	117
Figure 4.11 : Action des effecteurs de la PLD sur la sensibilité cellulaire à la vinblastine.	119
Figure 4.12 : La phospholipase D, un lien entre le cycle de la méthionine et le gène <i>MDR-1</i> .	123
Figure 4.13 : Implication des effecteurs de la phospholipase D sur expression de la protéine phospho-Akt.	126
Figure 4.14 : Implication de la SAM et de Bézafibrate sur expression de la protéine phospho-Akt.	128
Figure 4.15 : Action de la Cbl et de la SAM sur la PLD, la P-Akt et le <i>MDR-1</i> .	130
Figure 4.16 : Implication des effecteurs de la PP2A sur expression de la protéine phospho-Akt.	132
Figure 4.17 : Influence de la cobalamine sur l'expression de la Me-PP2A.	133
Figure 4.18 : L'action de l'acide okadaïque, inhibiteur de la PP2A, sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	134
Figure 4.19 : Action de l'acide palmitique, activateur de la PP2A, sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	135
Figure 4.20 : Lien entre la cobalamine, Me-PP2A, Akt et <i>MDR-1</i> .	137
Figure 4.21 : Implication des effecteurs de la voie MEK sur expression de la protéine phospho-Akt.	139
Figure 4.22 : Action d'U0126, inhibiteur de MEK, sur l'expression	

du gène <i>MDR-1</i> .	140
Figure 4.23 : Action de PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	141
Figure 4.24 : Action de LY294002, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	142
Figure 4.25 : Action de la wortmannine, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	143
Figure 4.26 : Action des inhibiteurs de PI3K, sur l'expression la protéine P-gp.	144
Figure 4.27 : Action de l'inhibition d'Akt sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	147
Figure 4.28 : Influence de la cobalamine sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	150
Figure 4.29 : Influence de la SAM sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	151
Figure 4.30 : Influence du bézafibrate sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	152
Figure 4.31 : Action du cycle de la méthionine sur les gènes <i>Cox-2</i> et <i>MDR-1</i> .	153
Figure 4.32 : Action de l'acide okadaïque, inhibiteur de la PP2A, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	154
Figure 4.33 : Action de l'acide palmitique, activateur de la PP2A, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	156
Figure 4.34 : Action de la cobalamine et de la voie PP2A sur les gènes <i>Cox-2</i> et <i>MDR-1</i> .	157
Figure 4.35 : Action d'U0126, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	158
Figure 4.36 : Action de PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	159
Figure 4.37 : Action de LY294002, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	160
Figure 4.38 : Action de la wortmannine, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	161

Figure 4.39: Action de l'acide oléique, activateur de la PLD, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	163
Figure 4.40 : Action du n-Butanol, inhibiteur de la PLD, sur l'expression du gène <i>Cox-2</i> .	164
Figure 4.41 : Influence de l'expression de <i>Cox-2</i> par la cobalamine PLD-dépendante.	165
Figure 4.42 : Action du nimésulide, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>Cox-2</i> .	166
Figure 4.43 : Action de l'ASA, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>Cox-2</i> .	167
Figure 4.44 : Action du carprofen, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>Cox-2</i> .	167
Figure 4.45 : Action du nimésulide, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>MDR-1</i> .	168
Figure 4.46 : Action de l'ASA, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>MDR-1</i> .	169
Figure 4.47 : Action du carprofen, inhibiteur de <i>Cox-2</i> , sur l'expression PLD-dépendante du gène <i>MDR-1</i> .	169
Figure 4.48 : Action de PGE2, produit de <i>Cox-2</i> , sur l'expression du gène <i>MDR-1</i> .	171
Figure 4.49 : Augmentation de l'expression du gène <i>MDR-1</i> provoquée par le produit de <i>Cox-2</i> , la PGE2.	172
Figure 4.50 : Influence de l'expression du gène <i>MDR-1</i> par une voie <i>Cox-2</i> dépendante.	175

Perspectives et Conclusion

Figure 5.1 : Schéma récapitulatif général des résultats de l'étude. 180

Tableaux

Tableau 1 : Agents thérapeutiques, substrats ou inhibiteurs de la P-gp. 27

Tableau 2 : Rôle physiologique des différentes prostaglandines. 72

Avant propos

Le cancer est l'une des causes majeures de décès et affecte énormément l'entourage des personnes atteintes. Il constitue de ce fait, constitue un véritable problème à la fois médical mais aussi sociétal et psychosocial. Les causes du cancer sont nombreuses. L'environnement et notre façon de vivre en sont deux déterminants essentiels. Confronté à ce problème, l'homme tente de trouver des solutions. Depuis l'antiquité, la confection de médicaments contre cette maladie, qui encore n'était pas baptisée, était habituelle. Depuis, la science a évidemment beaucoup progressé. Nos connaissances sur ce sujet se sont énormément enrichies. L'industrie pharmaceutique a utilisé ces connaissances pour concevoir et fabriquer des médicaments adaptés. La société a pris en charge l'impact psychologique et les besoins financiers de la maladie.

Sauf.....sauf que nos connaissances, sur le fonctionnement de l'organisme, le déclenchement de la maladie et surtout sa guérison, sont loin d'être complètes. Les méthodes de guérison utilisées, tels que la chimiothérapie, présentent des lacunes particulièrement concernant son efficacité. Le principal responsable de l'inefficacité de la chimiothérapie est le phénomène de chimiorésistance, dont l'acteur primaire est la P-glycoprotéine, codée par le gène *MDR-1*. Une meilleure connaissance de la cellule et des voies de régulation de ce gène sont nécessaires, afin de pouvoir améliorer les stratégies thérapeutiques.

La cellule est une usine constituée de plusieurs départements, où chacun a son importance. Les voies biochimiques cellulaires sont primordiales pour la survie de la cellule et de l'organisme. Une de ces voies est le cycle de la méthionine, qui est responsable de toutes les réactions de méthylation cellulaire. Par l'intermédiaire de la méthylation, la cellule régule le fonctionnement de nombre de ses constituants et de ses voies métaboliques.

Une liaison entre l'activité du cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1* a été établie par notre équipe. Une diminution de l'expression du gène *MDR-1* a été constatée en présence de cobalamine dans le milieu de culture cellulaire. La cobalamine, est le cofacteur d'une enzyme importante du cycle de la méthionine, la méthionine synthase. Ceci était accompagné par une augmentation de la toxicité cellulaire vis-à-vis de la vinblastine, quand les cellules étaient en présence de cobalamine.

Avant propos

Les connaissances sur les voies métaboliques reliant la cobalamine et le gène *MDR-1* étaient très incomplètes, voire inexplorées. L'observation princeps me semblait intéressante et importante, autant dans son impact scientifique potentiel, que dans ses applications possibles du point de vue médical. Il m'a semblé évident et essentiel de l'éclaircir.

Nous avons choisi d'explorer et d'étudier trois acteurs quant à leur implication possible, la phospholipase D, la protéine Akt et le gène *Cox-2*.

Dans un premier temps, des éléments de bibliographie, concernant ces acteurs, vont être exposés, afin de soutenir la compréhension des résultats. Les expériences réalisées et leurs résultats vont être analysés par la suite.

Ce travail fournit des éléments, qui explorent et clarifient le lien entre le cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1*. Il offre aussi des perspectives nouvelles d'amélioration de la chimiothérapie.

Revue Bibliographique

Revue Bibliographique

1. Le cancer et l'acteur *multi-drug resistance 1* (MDR-1)

1.1. Le cancer

1.1.1. Problématique et thérapeutique

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, à l'origine de 7,6 millions de décès en 2008, soit près de 13% de la mortalité mondiale, selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Les types de cancer le plus souvent diagnostiqués dans le monde sont : le cancer du poumon (12.7%), cancer du sein (10.9%) et cancer colorectal (9.7%) (Ferlay *et al.*, 2010). Les cancers causant le plus grand nombre de décès par an sont présentés dans la figure 1.1.

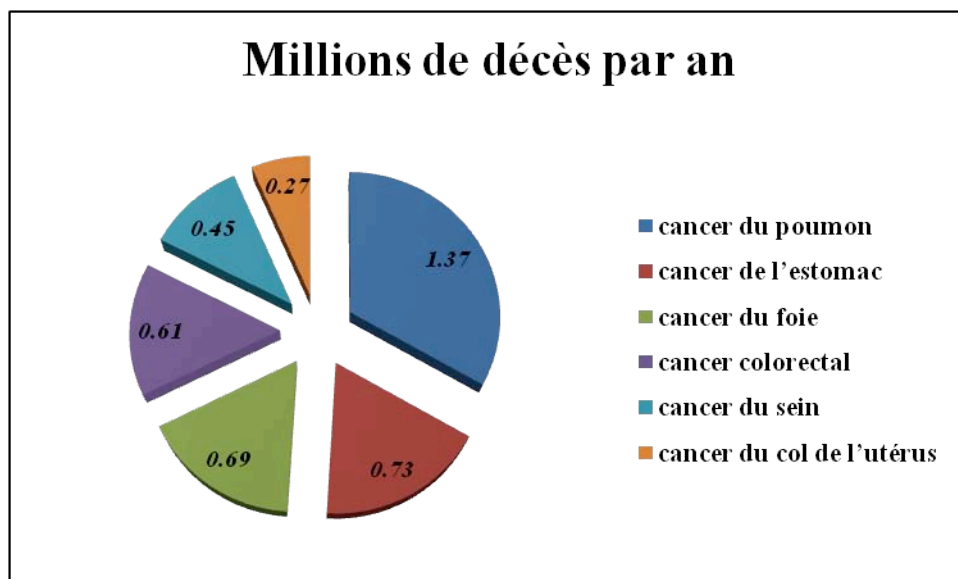


Figure 1.1 : Nombre des décès par an selon le type de cancer.

Selon l'étude GLOBOCAN, le cancer du foie se trouve à la troisième place des cancers les plus meurtriers et il est le 5^{ième} type de cancer le plus fréquemment constaté chez les hommes (7.9%) et le 7^{ième} chez la femme (6.5%), à l'exception certains pays, *p.ex.* pays de l'est de l'Europe, ou près de 80% de cas sont observés chez les hommes !

Il a été constaté que, le mode de vie, (*c.à.d.* le type de nutrition, l'exercice, le tabagisme, l'alcool), les traits culturels, mais aussi le contexte socio-économique du pays de résidence et bien sûr le sexe, sont des acteurs très importants. Les causes, la prévention, le diagnostic et la prise en charge, ne sont évidemment pas comparables d'un endroit à l'autre. Pourtant, aucun pays sur le globe n'est épargné.

Pour réduire le risque de cancer il est nécessaire d'adopter un mode de vie adéquat (réduire le tabagisme, prendre en charge les personnes obèses, améliorer son alimentation, éviter la sédentarité et la consommation d'alcool, éviter la pollution de l'environnement), une stratégie de prévention (vaccination, se protéger des risques professionnels) et effectuer du dépistage, qui permet un diagnostic précoce et une réduction de la mortalité, enfin, si nécessaire, opter pour un traitement adapté.

Le traitement du cancer suppose la sélection soigneuse d'une ou de plusieurs interventions, chirurgie, radiothérapie ou chimiothérapie. L'objectif est de guérir la maladie ou de prolonger considérablement la vie du patient, tout en améliorant sa qualité de vie. L'appui psychologique vient compléter le diagnostic et le traitement du cancer. Enfin, les soins palliatifs consistent à soulager plutôt qu'à guérir les symptômes provoqués par le cancer.

1.1.2. Le traitement par chimiothérapie

La chimiothérapie massive est utilisée, afin de tuer un grand nombre de cellules cancéreuses. Une forte dose de médicament est utilisée dans ce cas. Ceci a aussi comme résultat la mort de certaines cellules saines conduisant par exemple à l'alopécie. De telles chimiothérapies massives sont parfois utilisées comme traitement de clôture de certaines tumeurs solides (lymphomes agressifs, tumeur testiculaire, etc.). La chimiothérapie intensive peut être quasiment stérilisante pour les cellules souches hématopoïétiques du patient, ce qui nécessitera

de lui réinjecter ses propres cellules souches une fois la quasi disparition des anti-mitotiques du sang. Ce type de traitement nécessite une surveillance pharmacologique très serrée.

Les cures successives de chimiothérapie constituent un moyen de traitement alternatif.

La plupart du temps, 4 à 6 cures de chimiothérapie, à doses moyennement fortes, sont effectuées, entraînant une aplasie très modérée, ne nécessitant pas la prescription d'antibiotiques ou de transfusion plaquettaire. Ce type de chimiothérapie est basé sur les capacités différentes de récupération des cellules souches normales et tumorales. En effectuant des cures successives, on permet aux cellules souches normales (et malheureusement aussi aux cellules cancéreuses) de "récupérer". En général, les cellules normales récupèrent plus vite que les cellules cancéreuses. Le rythme des cures dépend de ce temps de récupération (en général plus long pour les personnes âgées), et/ou de la rapidité de la multiplication tumorale (plus court pour les tumeurs embryonnaires ou les sarcomes osseux).

Le manque d'irrigation de la tumeur, mais aussi l'accès à la cellule tumorale par les médicaments, sont importants pour obtenir un effet tumoricide. Par exemple, la barrière hémato-encéphalique rend les tumeurs cérébrales et les métastases cérébrales souvent très résistantes à la chimiothérapie par absence de pénétration au niveau de la tumeur. La plupart des médicaments anti-cancéreux sont de grosses molécules très complexes et peu solubles. Seules les petites molécules liposolubles peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (mais elles sont parfois difficiles à transporter au niveau plasmatique !).

Quand le cancer est à un stade de dissémination métastatique, les traitements, comme la chimiothérapie, ont comme but d'enrayer ou de ralentir l'évolution de la prolifération des cellules tumorales.

Les médicaments utilisés en chimiothérapie appartiennent aux catégories suivantes :

1) Les agents alkylants

Ils ont la capacité d'ajouter un groupe alkyle à un grand nombre de groupes électronégatifs dans des conditions, présentes dans la cellule cancéreuse. Ils bloquent la croissance de la tumeur en liant les nucléotides guanines de l'ADN entre eux, provoquant ainsi des cassures, des mutations et des liaisons anormales entre les brins de la double hélice. Ainsi, la réplication de l'ADN n'est plus possible. En général, ces agents n'agissent pas de façon

spécifique et ils nécessitent une conversion *in vivo* en substances actives. Les principaux agents alkylants sont *p.ex.* le Cyclophosphamide, le Melphalan, le Chloraminophène, le Busulfan.

2) Les anti-métabolites

-Antipyrimidines, comme par exemple le 5-fluoro-uracile, qui inhibe la thymidylate synthase.

-Antipurines, comme la fludarabine, qui inhibe l'ADN polymérase, la primase et la ligase I et qui est active uniquement lors de la phase S.

-Antifolates, comme le méthotrexate qui inhibent la dihydrofolate réductase, enzyme essentielle à la synthèse des purines et des pyrimidines (Jansen *et al.*, 1998).

3) Les alcaloïdes végétaux

Ils bloquent la division cellulaire en empêchant la synthèse des microtubules et ainsi la formation du fuseau mitotique. Ils comportent les catégories suivantes :

-Les vinca-alcaloïdes, tels que la vincristine, la **vinblastine** (utilisée dans ce travail) ou la vinorelbine. Ils se lient à des sites spécifiques de la tubuline et inhibent l'assemblage des tubulines en microtubules. (Wendell *et al.*, 1993)

-Les taxanes, tels que le paclitaxel et son dérivé synthétique le docétaxel. Ils stimulent la polymérisation des tubulines, améliorant, ainsi, la formation et la stabilité des microtubules. Ceux-ci ne peuvent plus se dégrader et les chromosomes ne peuvent plus migrer vers les pôles du noyau, lors de la division cellulaire.

-Les épothilones, qui sont des produits d'une myxobactérie, ont le même mécanisme d'action que les taxanes et semblent avoir une activité anticancéreuse similaire.

4) Inhibiteurs de la topoisomérase

Les topoisomérases sont des enzymes, qui maintiennent la conformation de l'ADN. Leur inhibition perturbe la transcription et la réplication de l'ADN en altérant son superenroulement. Exemples : dérivés de la camptothécine, l'amsacrine, les anthracyclines et les dérivés de l'épipodophyllotoxine.

5) Antibiotiques antitumoraux

Ils empêchent la division cellulaire en se liant sur l'ADN et en s'intercalant entre deux bases des nucléotides adjacents, empêchant ainsi leur séparation. Ils peuvent, également, inhiber l'ARN en bloquant la synthèse des enzymes. Enfin, ils perturbent la réplication cellulaire. Ils sont produits par diverses souches de la bactérie *Streptomyces*.

La chimiothérapie peut être combinée à la chirurgie et à la radiothérapie. Souvent, l'utilisation d'un seul médicament anticancéreux n'est pas suffisante pour obtenir une guérison ou même une réponse clinique de longue durée. L'apparition rapide de résistances entraîne un échec du traitement. L'utilisation de plusieurs médicaments repose sur la recherche d'un meilleur index thérapeutique basé :

- sur l'utilisation de molécules ayant des mécanismes d'action différents,
- parfois une réelle synergie entre deux familles thérapeutiques,
- en outre, des toxicités différentes permettant d'augmenter l'intensité du traitement anticancéreux sans augmenter les effets toxiques.

1.1. 3. Le phénomène de la chimiorésistance

Pourquoi la chimiothérapie se révèle efficace pour certains patients, alors que pour d'autres, elle est peu ou pas efficace, ou alors ne l'est que d'une façon transitoire ou incomplète ? Parce que l'efficacité de la chimiothérapie est limitée par le phénomène de résistance. Les cellules cancéreuses possèdent ou acquièrent la capacité de contourner les mécanismes d'action des médicaments utilisés en chimiothérapie.

En premier lieu, l'absorption du médicament et la pénétration peuvent être insuffisantes à cause de l'architecture tumorale anormale. Ainsi, une mauvaise vascularisation, une résistance accrue au flux sanguin et l'approvisionnement insuffisant en sang représentent un premier obstacle à la délivrance de médicaments anti-tumoraux (Beyer *et al.*, 2012 ; Curnis *et al.*, 2002). De plus, une matrice extracellulaire anormale offre une résistance accrue à la pénétration du médicament. L'architecture tumorale anormale modifie également la biologie des cellules tumorales, ce qui contribue à la résistance aux médicaments par le biais de plusieurs mécanismes différents.

Certains médicaments ont besoin d'un transporteur pour pénétrer dans la cellule. La perte d'activité du transporteur entraîne une résistance vis à vis de l'activité anti-tumorale. En plus, des

protéines telles que la P-glycoprotéine ou la MRP et la LRP, présentes dans le cas de l'hépatocarcinome (Li *et al.*, 2007), sont responsables de l'expulsion du médicament en dehors de la cellule. Souvent aussi, le médicament arrivé dans la cellule doit être transformé pour devenir actif. Une altération de l'activité enzymatique responsable de cette transformation, peut constituer un frein pour l'efficacité du médicament. La modification de la cible du médicament, ainsi que la réparation des altérations génétiques, des modifications épigénétiques et de l'environnement de la tumeur, semblent participer à cette chimiorésistance (Gottesman *et al.*, 2002).

Ils existent deux types de résistance face aux médicaments anticancéreux.

Certains types de cancers sont naturellement résistants à tous les médicaments. Les cellules se détoxifient alors aisément des agents dangereux. Elles possèdent une chimiorésistance intrinsèque. Elle est souvent observée dans le cas du cancer du rein, du colon ou du foie (Fojo *et al.*, 1987).

D'autres sont d'abord sensibles mais développent des capacités de résistance en cours de traitement. Ceux-ci deviennent moins efficaces au fil des cures. Les cellules sanguines par exemple (Marie, 1995), acquièrent cette chimiorésistance. Il s'agit d'une chimiorésistance acquise.

Les cellules cancéreuses ont été étudiées *in vitro* en présence d'agents cytotoxiques. Elles peuvent devenir résistantes à un seul médicament ou à une classe des médicaments d'un mode d'action similaire, en altérant la cible cellulaire du médicament ou en augmentant les mécanismes de réparation de l'ADN. Les cellules cancéreuses peuvent également développer une résistance croisée face à des médicaments de structure et de mécanisme d'action très différents. Ce phénomène est connu comme la « Multidrug Resistance » ou résistance multiple aux drogues. Les cellules peuvent montrer une résistance à des agents, ayant une structure moléculaire et un mode d'action, très différents les uns des autres (Riordan *et al.*, 1985 ; Pastan *et al.*, 1987). Ceci peut expliquer la raison pour laquelle, même les thérapies comportant plusieurs médicaments peuvent se révéler inefficaces.

Le gène *MDR-1*, codant pour la protéine P-gp, semble jouer un rôle capital dans le phénomène de chimiorésistance. La chimiorésistance est proportionnelle au niveau d'expression de *MDR-1* dans des modèles *in vitro* de cancer du sein (Kars *et al.*, 2006). En plus, une résistance à des agents cytotoxiques est constaté dans les cas des modèles cellulaires leucémiques ou ce gène est surexprimé (Mahon *et al.*, 2003). Dans le cas du sarcome humain métastatique (Abolhoda *et al.*, 1999), le gène *MDR-1* est surexprimé *in vivo*, après utilisation

d'un agent chimiothérapique, la doxorubicine. Ceci impliquerait le phénomène de chimiorésistance dans les tissus métastatiques. D'ailleurs, il a été suggéré, comme *p.ex.* dans une étude clinique concernant le cancer du sein, que la P-glycoprotéine jouait un rôle important, surtout dans la progression de la tumeur (Linn *et al.*, 1997).

1.2. L'acteur *multi-drug resistance 1* (*MDR-1*)

1.2.1. Le gène *MDR-1*

Le gène *MDR-1*, qui code pour la P-glycoprotéine (1280 résidus), se trouve sur le chromosome 7q21.12 (Fig.1.2). La taille de l'ARNm est de 4,8kb (Bodor *et al.*, 2005). Le promoteur du gène *MDR-1* ne possède pas de boîte TATA, mais présente d'autres éléments de réponse comme les boîtes GC (de -56 à -43 et de -110 à -103) ou encore la séquence consensus CCAAT (de -82 à -73) et une séquence initiatrice de -6 à +11 (Cornwell *et al.*, 1990) . Une régulation en trans de *MDR-1* s'effectue via des facteurs de transcription (parmi lesquels on retrouve Sp-1 et NF-Y) qui participent à la formation d'un « MDR enhanceosome », complexe comprenant l'histone acétylase PCAF et conduisant à une augmentation de l'expression de *MDR-1* (Hu *et al.*, 2000).

La transcription de *MDR-1* dépend également du statut de méthylation du promoteur (Tada *et al.*, 2000). En effet, le promoteur comporte un certain nombre d'îlots CpG. Une hyperméthylation du promoteur conduit à une baisse de la transcription alors qu'une hypométhylation entraîne une surexpression du gène. Le remodelage de la chromatine influence également l'expression de *MDR-1*. Ainsi une activité histone acétyltransférase (HAT) engendre une surexpression de ce gène alors que les histone-déacétylases (HDAC) répriment cette expression (Scotto *et al.*, 2001).

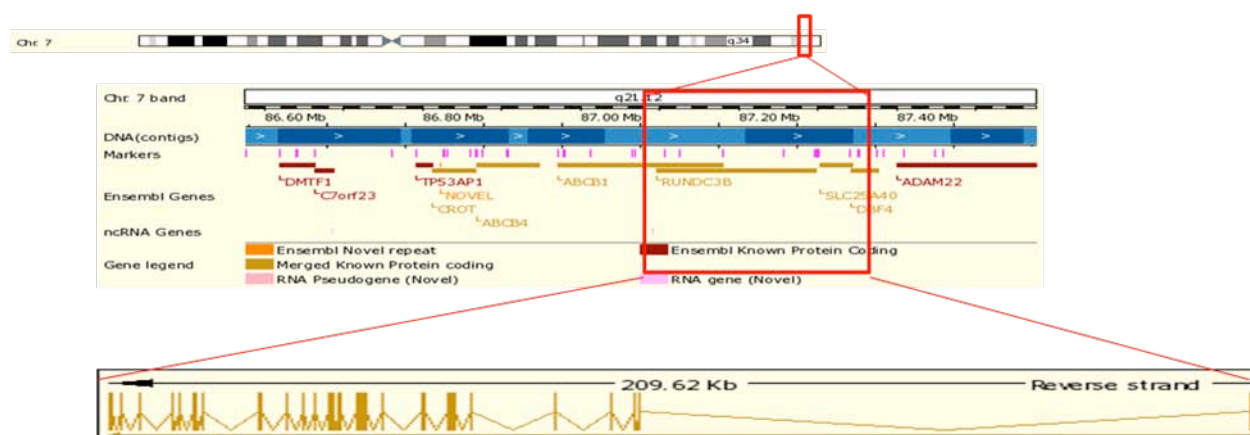


Figure 1.2 : Le gène ABCB1 sur le chromosome 7q21.12 (tiré de Ensembl Genome Browser).

La régulation du gène *MDR-1* peut également s'effectuer par P53 (Chin *et al.*, 1992), ou encore par la voie Ras/Raf/MAPk (Miltenberger *et al.*, 1995 ; Kim *et al.*, 1996). Des chocs thermiques, le TNF α , ou encore l'IL-6 (dans les cellules d'hépatome humain ; Lee *et al.*, 2001), des agents chimiothérapeutiques tels que le vérapamil (Muller *et al.*, 1995), les UV, les Rayons X, des hormones et la méthylation (Shi *et al.*, 2011 ; Hill *et al.*, 1996 ; Silverman *et al.*, 1997) sont aussi connus pour réguler l'expression de ce gène.

Le gène *MDR-1* est très polymorphe. Ses polymorphismes (*p.ex.* C1236T, G2677T/A, C3435T) peuvent influencer la fonction de la protéine codante. En plus, ils dépendent de l'ethnicité, comme des études de populations l'ont révélé (Ozawa *et al.*, 2004 ; Fung *et al.*, 2009).

1.2.2. Les protéines ABC

La résistance aux médicaments naturels hydrophobes, considérée comme la multidrug resistance classique, est le résultat de l'expression et de l'action de certaines protéines appartenant à la famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC).

Environ 50 gènes ABC ont été identifiés chez l'homme et ils sont subdivisés en 7 sous-familles (ABCA-ABCG), selon leur homologie de séquence et l'organisation des différents domaines (Dean *et al.*, 2001). Ces protéines sont responsables du transport des différents substrats à travers les membranes et ce, contre leur gradient de concentration. Elles sont approvisionnées en énergie en hydrolysant l'ATP. L'ATP se lie sur les domaines NBF (nucleotide binding fold), qui permettent l'identification et la classification des membres de la

famille des transporteurs ABC. Une protéine fonctionnelle est composée de deux domaines NBF et de deux domaines transmembranaires.

La sous-famille ABCA comprend 12 transporteurs. C'est la sous famille de gènes ABC la plus importante. Les membres les mieux étudiés de cette sous-famille sont les protéines ABCA1 et ABCA4. La première est impliquée dans les problèmes de transport du cholestérol. Le second est le transporteur des dérivés de la vitamine A.

La sous-famille ABCB comprend 1) ABCB1 qui inclut *MDR-1*, qui se trouve à la barrière hémato-céphalique ainsi qu'au niveau du foie et il sera discuté plus loin. 2) ABCB4 et B11, qui sont localisés aussi au niveau du foie et sont impliqués dans la sécrétion des acides biliaires. Les groupes ABCB2 et ABCB3 transportent des peptides dans le réticulum endoplasmique, peptides présentés comme antigènes par les molécules HLA I. 3) ABCB9 est localisé au niveau des lysosomes, alors que 4) ABCB6, B7, B8 et B10 se trouvent au niveau de la mitochondrie et jouent un rôle important dans le métabolisme du fer.

La sous-famille ABCC contient 12 transporteurs avec des rôles divers, tels que le transport d'ions, le rôle de récepteur membranaire et la sécrétion des toxines. Le plus connu des transporteurs ABCC est le canal ionique CFTR. Les mutations de son gène provoquent la fibrose kystique du pancréas, appelée aussi mucoviscidose. Les gènes MRP font aussi partie de cette famille.

La sous-famille ABCD inclut des gènes impliqués dans l'oxydation et le transport des très longues chaînes lipidiques. Ils se trouvent au niveau du péroxysome. Les sous-familles ABCE et ABCF semblent jouer un rôle dans la réponse à l'infection virale. La sous-famille ABCG est impliquée dans la régulation du transport des stérols.

1.2.3. La P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine (ABCB1 ; 1280 résidus), codée par le gène *MDR-1*, est le transporteur ABC le mieux connu. Elle est un acteur du phénomène de la chimiorésistance acquise. Il s'agit d'un transporteur membranaire. Elle est composée de deux domaines homologues, qui contiennent six domaines transmembranaires chacun et sont séparés par un polypeptide flexible. Elle réalise un transport unidirectionnel et actif. L'hydrolyse de l'ATP

(Fig.1.4) est nécessaire pour son fonctionnement (Sauna *et al.*, 2000 ; Sharom *et al.*, 1995). Les changements de conformation de la P-glycoprotéine, pendant l'hydrolyse d'ATP, sont substrat-dépendants (Loo *et al.*, 2003). La P-glycoprotéine, de taille de 130 à 170kDa (Ambudkar *et al.* 1999) peut subir des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et la glycosylation (Fig.1.6) en N-ter (Endicott *et al.*, 1989). La protéine fonctionnelle, illustrée dans la figure 1.3, est constituée de 2 TMD (Trans Membran Domain) de 6 à 12 hélices α , qui lient le substrat et de 2 NBF (Nucleotide Binding Fold) (Chen *et al.*, 1986).

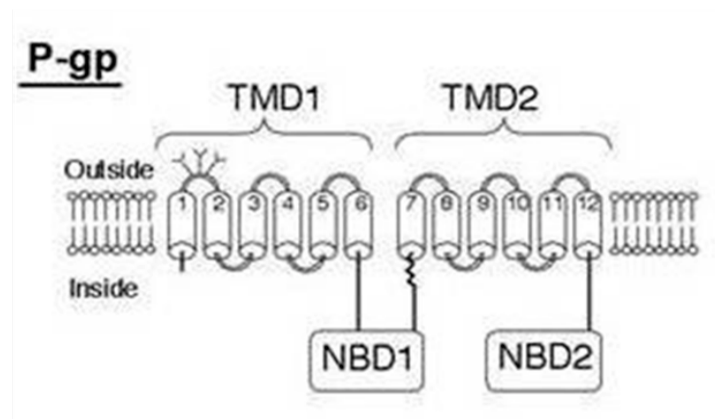


Figure 1.3 : Les différents domaines structuraux de la P-glycoprotéine. (TMD: Trans Membran Domain ; NBF: Nucleotide Binding Fold) (Loo *et al.*, 2004)

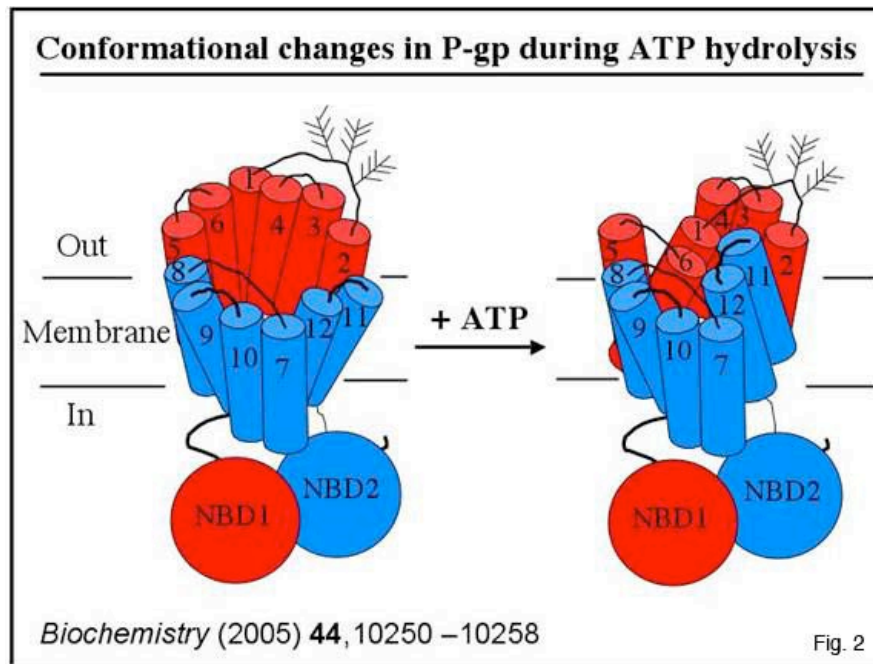


Figure 1.4 : Les changements de conformation de la P-glycoprotéine. (Loo et al., 2005)

La P-gp est présente dans les tissus normaux (Thiebaut *et al.*, 1987) et elle serait impliquée dans leur protection face à la toxicité engendrée par l'accumulation des xénobiotiques. La P-gp est fortement exprimée (Fig. 1.5) dans le cancer du rein, du foie et du colon (Goldstein *et al.*, 1989).

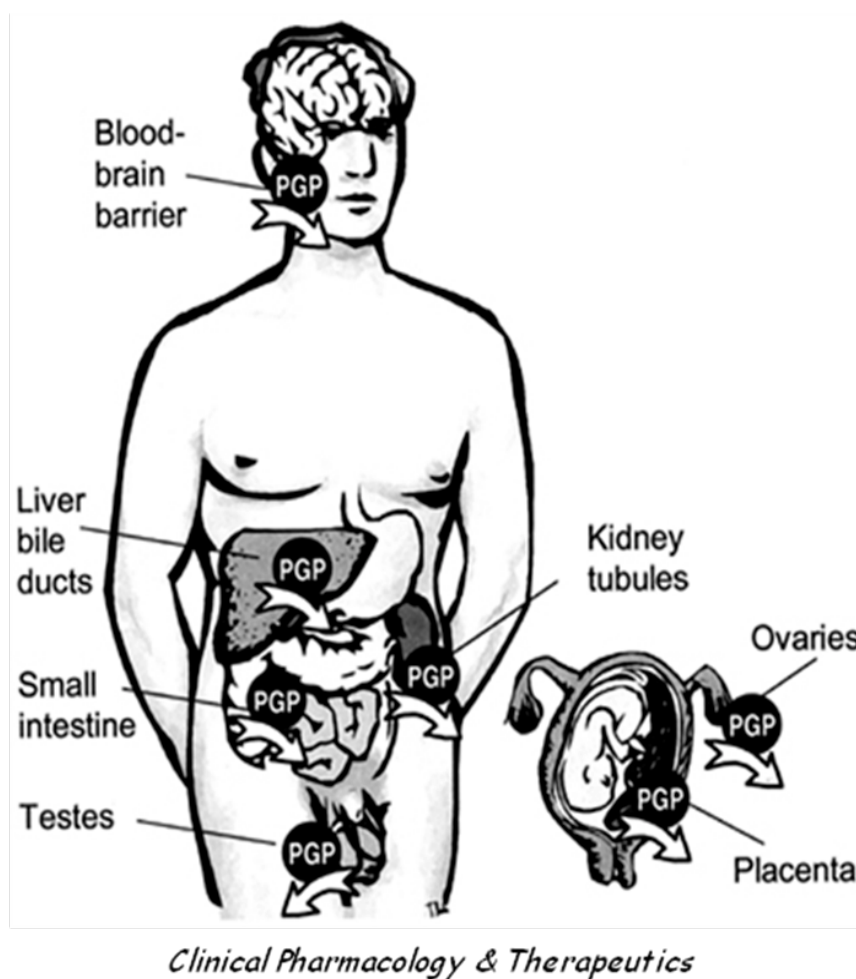


Figure 1.5 : Localisation de la P-glycoprotéine dans les différents tissus. La P-glycoprotéine est présente dans la barrière hémato-encéphalique, dans la voie biliaire du foie, au niveau de l'intestin grêle, dans les membranes des testicules et des ovaires et à la surface du placenta. (Marzolini et al., 2004)

La protéine P-gp est responsable de la translocation, à travers les membranes intra- et extra-cellulaires, des substances de natures diverses. Ses substrats sont d'habitude des molécules hydrophobes, polyaromatiques, neutres ou chargées positivement au pH physiologique et de poids moléculaire entre 200 et 1800 Da. (Linardi & Natalini, 2006). Ces agents possèdent des structures chimiques et des fonctions très différentes (Tableau 1), *p.ex.* phospholipides, cholestérol, inhibiteurs de canaux calciques, immunosuppresseurs, peptides, stéroïdes, xénobiotiques, antibiotiques, fluorophores (Rho), vinca-alcaloïdes (vinblastine). Les modulateurs de la protéine peuvent aussi être assez diversifiés, *p.ex.* Inhibiteurs calciques (vérapamil), hormones, antihypertenseurs.

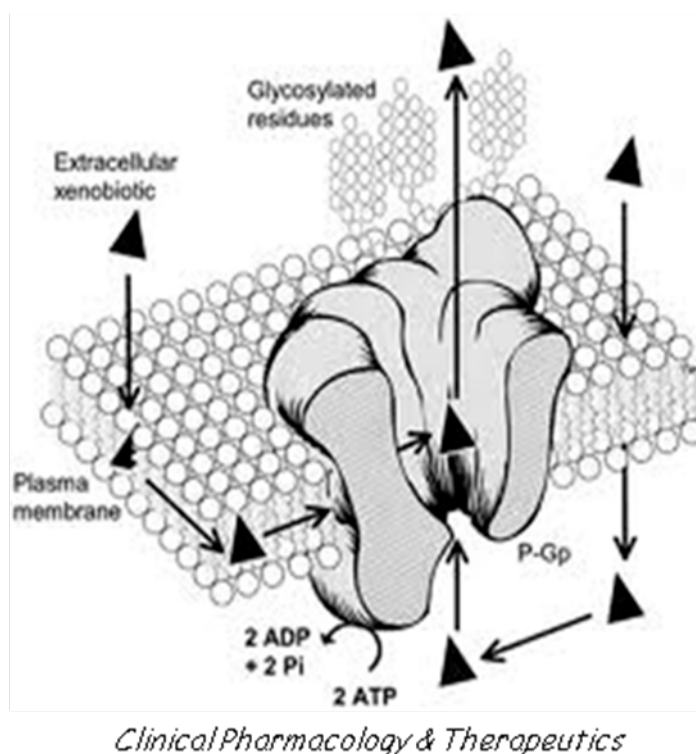


Figure 1.6 : Transport actif des xénobiotiques, par l'intermédiaire de la P-glycoprotéine.
(Marzolini et al., 2004)

Plusieurs études ont comparés les inhibiteurs de la P-gp. Ainsi, l'imatinib mesilate, qui est un substrat de la P-gp et aussi un modulateur de son expression, est légèrement moins efficace que la cyclosporin A. Pourtant son effet inhibiteur est plus fort que celui du vérapamil ou d'autres agonistes calciques (Hamada *et al.*, 2003).

Puisque la P-gp expulse de la cellule tout agent qui mettrait en péril sa viabilité, il est logique que son inhibition augmente la cytotoxicité d'agents anticancéreux, tels que la doxorubicine (Shiraki *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Agents thérapeutiques, substrats ou inhibiteurs de la P-gp (Linardi & Natalini, 2006).

Substrates	Inhibitors

Antiacids Cimetidine Ranitidine	β-Adrenoceptor antagonists Bunitrolol Carvedilol Celiprolol Talinolol Reserpine	Immunosuppressants Cyclosporine A Sirolimus Tacrolimus	Diverse Inhibitors Agents Verapamil Quinidine Valspodar (PSC) Cyclosporine Ketoconazole
Antibiotics Erythromycin Tetracycline Rifampin Levofloxacin	Ca++ Chanel Blockers Ditiazem Mibefradil	Opioids Loperamide Domperidone Morphine Pentazocine Methadone Asimadoline Fentanyl	
Antiemetic Ondanserton	Cardiac drugs/Antiarrhythmics Digotoxin Digoxin	Steroids Dexametasome Methulprednisolone Aldosterone Progesterone Hydrocortisone Cortisol Corticosterone	
Antitumor Agents Paclitaxel Doxorubicin Vinblastine Vincristine Actinomycin D Docetaxel Etoposide Imatinib Teniposide	Histamine H1, receptor antagonists Fexofenadine Tetrafenadine	Others Colchicine Itraconazole Phenothiazines Ivermectin	
	HIV Proteases Inhibitors Amprenavir Indinavir Nelfinavir Saquinavir Ritonavir		

Il a été montré que la P-gp était aussi impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Enokida *et al.*, 2004). A ce niveau, les mécanismes d'action ne sont que peu connus.

Cette fonction de « clairance » par la P-gp a pu être appréciée (Schinkel *et al.*, 1994) en observant une augmentation de 100 fois de la pénétration d'un médicament antiparasitaire, l'ivermectine, dans le cerveau des souris génétiquement modifiées et dépourvues de P-gp.

Des animaux naturellement déficients en ABCB1 ont également présenté une toxicité neurologique et fœtale importante face à des médicaments, en raison d'une brèche dans les barrières hémato-encéphalique et placentaire dans lequel la P-gp est normalement active (Umbenhauer *et al.*, 1997 ; Barbet *et al.*, 2009) .

Il a été mis en évidence, que la cobalamine régula l'expression du gène *MDR-1*. Elle diminue son expression chez les cellules HepG2, lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain. Cette diminution de l'expression du gène est accompagnée par une potentialisation de la cytotoxicité, vis-à-vis de la vinblastine, médicament anticancéreux (Marguerite *et al.*, 2007).

Cette dernière observation a été le point de départ de ce travail. Étant donné que la cobalamine est un cofacteur important du cycle de la méthionine, nous donnerons, par la suite, quelques informations, concernant ce métabolisme.

2. Métabolisme de la méthionine

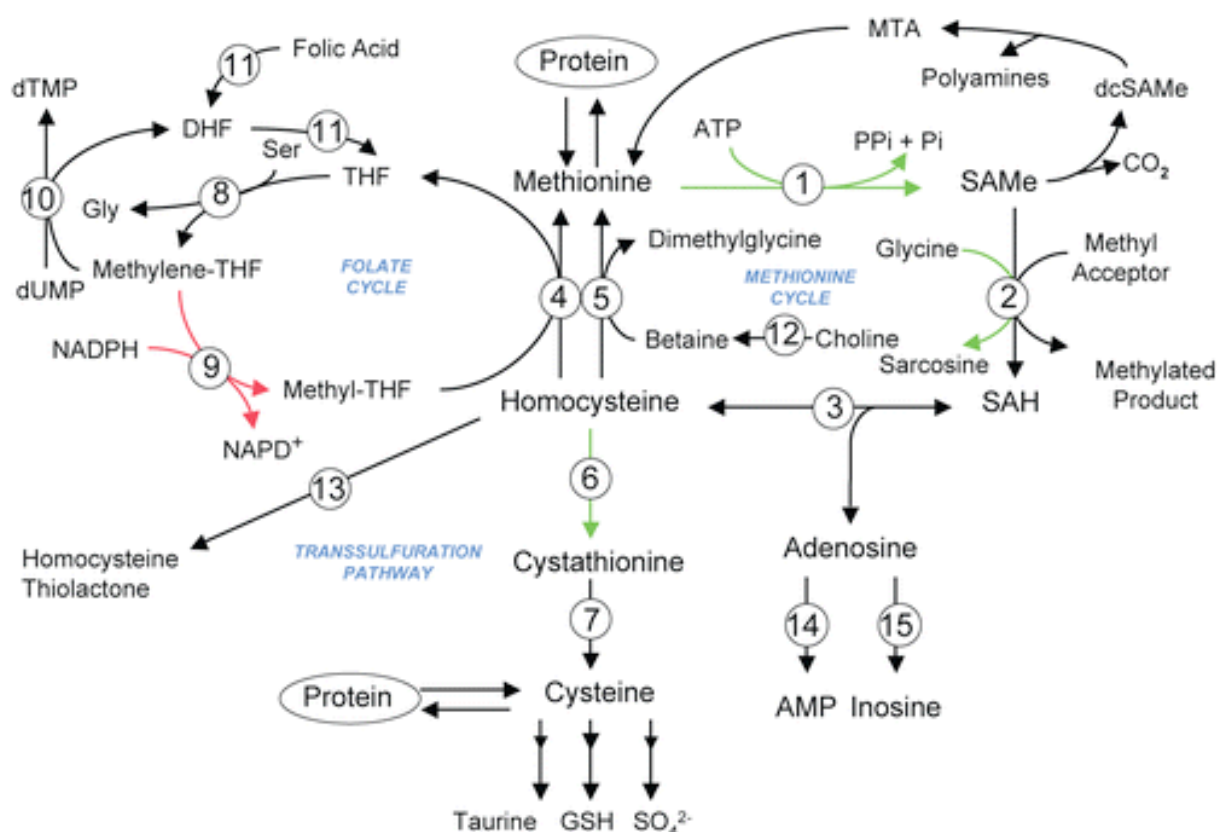
2.1. Le cycle de la méthionine

Le métabolisme de la méthionine au sein de la cellule s'effectue par le cycle de la méthionine, qui est connecté à celui des folates. L'activité de ce cycle influence les réactions de méthylation cellulaire *via* la formation de la S-adenosylméthionine (SAM), donneur ubiquitaire de groupements méthyles (Mato *et al.*, 1997). Dans la figure 1.7 nous décrivons les réactions principales, liées à ce métabolisme.

La transformation de la méthionine en homocystéine constitue le point central de ce cycle métabolique. L'enzyme méthionine synthase est activée grâce à son co-facteur, la cobalamine (ou vitamine B12), que nous avons utilisé tout au long de ce travail. Autour de cette enzyme se développent plusieurs voies. Les principales sont :

- Le **cycle de la méthionine**. Grâce à la SAM, il participe à des réactions de méthylation des différents substrats cellulaires, tels que l'ADN, les lipides et les protéines. Il s'agit de la **voie dite de trans-méthylation**.
- Le **cycle des folates**, qui régénère le tétrahydrofolate en méthyltétrahydrofolate, cosubstrat de la méthionine synthase.
- La **voie dite de trans-sulfuration**, qui amène l'homocystéine vers la voie de synthèse du glutathion.

Le métabolisme de l'homocystéine constitue une voie métabolique cellulaire assez complexe. Nous allons ici, développer brièvement certains des éléments, qui semblent nécessaires pour la compréhension des résultats de ce travail.



AR Mato JM, et al. 2008.
Annu. Rev. Nutr. 28:273–93.

Figure 1.7 : Métabolisme hépatique de la méthionine et des folates (Mato et al., 2008).

La S-adénylméthionine (SAM) est générée à partir de la méthionine et de l'ATP dans une réaction catalysée par la méthionine adényltransférase (MAT, **réaction 1**). La SAM est le principal donneur de méthyle biologique et un précurseur pour la synthèse des polyamines. La Méthylthioadénosine (MTA) est un sous-produit de la synthèse des polyamines et peut être métabolisée pour régénérer la méthionine.

La SAM cède son groupe méthyle à une grande variété de molécules acceptrices dans des réactions catalysées par des méthyltransférases (**réaction 2**), les plus abondantes dans le foie étant la glycine N-méthyltransférase (GNMT), qui convertit la glycine en N-méthyl-glycine (sarcosine) et la Phosphatidyl-éthanolamine méthyl-transférase (PEMT) qui convertit la phosphatidyl-éthanolamine en phosphatidyl-choline.

La S-adénylhomocystéine (SAH) est générée en tant que produit de déméthylation et est hydrolysée pour former l'homocystéine et l'adénosine par une réaction réversible catalysée par la SAH hydrolase (SAHH, **réaction 3**).

L'homocystéine peut être reméthylée pour régénérer la méthionine grâce à deux enzymes: La méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase (MS, **réaction 4**, aussi appelé méthionine synthase), et la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT, **réaction 5**).

Dans le foie, mais pas dans tous les tissus, l'homocystéine peut également subir la voie de trans-sulfuration pour former la cystéine par une réaction enzymatique en deux étapes, catalysée par la cystathionine synthase (CBS, **réaction 6**) et la cystathionase (**réaction 7**). La cystéine est finalement transformée en une variété de molécules soufrées telles que la taurine, le glutathion (GSH), et le sulfate.

Le tétrahydrofolate (THF) est généré en tant que produit de la MS (**réaction 4**) et est convertie en 5,10-méthylène-tétrahydrofolate (méthylène-THF) par l'enzyme méthylène-THF synthase (**réaction 8**) et ensuite en 5-méthyl-tétrahydrofolate (méthyl-THF) par l'enzyme méthyl-THF réductase (MTHFR, **réaction 9**).

En plus, le méthylène-THF peut être utilisé pour la synthèse de désoxythymidine monophosphate (dTMP) par l'enzyme thymidine synthase (TYMS, **réaction 10**). Le dihydrofolate (DHF), qui est généré en tant que produit de synthèse du dTMP, peut être converti en THF (**réaction 11**).

La choline oxydase (**réaction 12**) convertit la choline en bétaine (triméthylglycine).

La thiolactone synthase (**réaction 13**) catalyse la réaction de condensation intramoléculaire entre le thiol et l'acide carboxylique de l'homocystéine.

L'adénosine kinase (ADK, **réaction 14**) catalyse la synthèse de l'adénosine monophosphate (AMP), et l'adénosine désaminase (ADA, **réaction 15**) convertit l'adénosine en inosine.

La SAM, la SAH et le méthyl-THF exercent un contrôle étroit sur le métabolisme hépatique de la méthionine et de l'acide folique. La SAM est un activateur allostérique de la MAT, de la GNMT, et de la CBS (en vert) et est un inhibiteur allostérique de la MTHFR (en rouge). La SAH est un inhibiteur compétitif de nombreuses méthyltransférases SAM-dépendantes, et le méthyl-THF est un inhibiteur allostérique de la GNMT. (dcSAmé : SAM décarboxylée).

2.1.1. Les enzymes impliquées

Les principales enzymes du cycle de la méthionine sont 1) la méthionine adénosyltransférase (MAT), 2) la S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH), 3) la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT), 4) la méthyltétrahydrofolate-homocystéine méthyltransférase ou méthionine synthase (MS) et 5) les méthyl-transférases (MT).

- **La méthionine adénosyltransférase (MAT)**

La méthionine adénosyltransférase (MAT) catalyse la réaction transformant la méthionine en S-adénosylméthionine (SAM). Cette enzyme est produite sous trois isoformes : MATI, MATIII codées par *MAT1A* et MATII codée par *MAT2A*. La *MAT1A* est exprimée exclusivement dans le foie alors que *MAT2A* est présente de manière ubiquitaire (Garcia-Tevijano *et al.*, 2001 ; Avila *et al.*, 2002). Un *knock-out* de *Mat1a* chez la souris, induit une augmentation de la méthionine et une diminution de SAM. (Mato *et al.*, 2002 ; Lu *et al.*, 2001 ; Mato, 2007). L'expression de *MAT1A* est diminuée chez les patients atteints d'hépatocarcinome (Avila *et al.*, 2000).

- **La S-adénosylhomocystéine hydrolase (SAHH)**

La seule source d'homocystéine chez les mammifères provient de la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAHH), une enzyme ubiquitaire qui libère une molécule d'homocystéine et d'adénosine par molécule de SAH hydrolysée

- **La bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT)**

La méthionine est un acide aminé essentiel pour les mammifères. Cependant, elle peut être partiellement régénérée à partir de l'homocystéine par deux réactions différentes impliquant soit la méthionine synthase ou encore la bétaine-homocystéine méthyltransférase (BHMT). La BHMT utilise la bétaine comme donneur de méthyle pour la méthylation de l'homocystéine. Elle représente la voie alternative de la reméthylation de l'Homocystéine. La bétaine est synthétisée à partir de la choline grâce à la choline déshydrogénase et libère de la méthylglycine. Elle est spécifique des cellules hépatiques de tous les mammifères et des reins de primates contrairement à la méthionine synthase qui est présente dans tous les tissus de mammifères (Finkelstein *et al.*, 1982). Cette voie est limitée au foie et au rein et elle est absente dans le cerveau, le pancréas, les muscles squelettiques, le poumon, le placenta et le cœur (Sunden *et al.*, 1997). Elle permet de

maintenir la concentration tissulaire en méthionine à un niveau suffisant pour assurer la synthèse de SAM en cas de carence en folate.

Il a été montré que, bien que la BHMT soit une enzyme hépatique, elle n'est pas exprimée chez les cellules HepG2 d'hépatocarcinome humain et par conséquent la protéine y est absente ou non fonctionnelle (Pellanda *et al.*, 2012).

- **La méthionine synthase (MS)**

La méthionine synthase (MS) est une méthyltransférase qui catalyse le transfert de groupements méthyles du N5-méthylTHF sur le groupement thiol de l'Homocystéine pour former la méthionine. Cette enzyme existe dans tous les organismes cellulaires, mais chez les procaryotes, la MS est cobalamine indépendante. Chez les eucaryotes, en revanche, la MS requiert pour son activité, un cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine (MeCbl), forme active de la vitamine B12. Le zinc est également son cofacteur. Son expression varie selon les tissus (Chen *et al.*, 1997 ; Li *et al.*, 1996). La réaction comporte deux étapes formant un mécanisme séquentiel ordonné. Le groupement méthyle est transféré du N5-méthylTHF à la Cob(I)alamine pour former la méthylcob(III)alamine. Le groupement méthyle est alors transféré à l'Homocystéine pour former la méthionine. Cette réaction est complexe car la Cob(I)alamine peut facilement être oxydée en Cob(II)alamine qui est une forme inactive. Cependant la Cob(II)alamine peut être réduite et méthylée par la SAM en méthylcob(III)alamine grâce à la méthionine synthase réductase (MSR).

Un défaut dans l'activité de la MS peut conduire, selon la gravité, à une anémie mégaloblastique, associée à une hyperhomocystéinémie modérée. La MS joue aussi un rôle dans la tumorigénèse (Chen *et al.*, 1997).

- **Les méthyl-transférases (MT)**

- DNMT (ADN méthyltransférases)

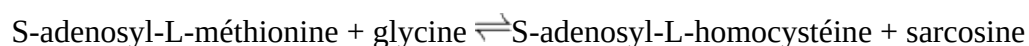
Les **ADN méthyltransférases** sont des enzymes, qui catalysent le transfert des groupements méthyles fournis par la S-adénosylméthionine, vers les molécules d'ADN. La méthylation de l'ADN est un phénomène épigénétique. Ainsi, la SAM méthyle les résidus d'ADN en position 5' du noyau pyrimidique (Worm *et al.*, 2002). Chez les mammifères, Il existe

deux types de méthylation : méthylation de maintenance et méthylation de *novo* réalisées par trois classes générales d'enzymes.

- 1) La **DNMT 1** qui permet la maintenance des profils de méthylation au cours des divisions cellulaires en reproduisant sur le brin néosynthétisé, lors de la réplication de l'ADN, la méthylation lue sur le brin matrice.
- 2) La **DNMT 2** qui a une fonction inconnue, identifiée par homologie de séquence avec DNMT1.
- 3) La **DNMT 3** est responsable de la méthylation de *novo* en ajoutant des groupements méthyles sur les 2 brins d'ADN.
 - o **DNMT 3a** est impliquée dans la méthylation des promoteurs de l'expression des gènes.
 - o **DNMT 3b** est impliquée dans la méthylation des séquences entourant les centromères.

-GNMT (Glycine N-méthyltransférases)

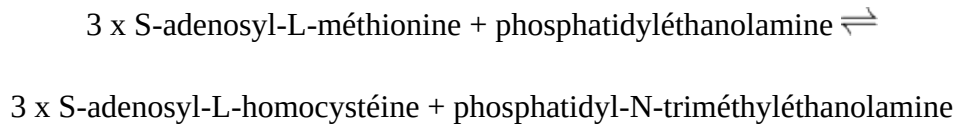
La glycine N-méthyltransférase (GNMT) est une méthyltransférase abondante et compte pour 1 à 3% des protéines solubles hépatiques. Son rôle est de maintenir un ratio SAM/SAH constant (Mato, 2007) en transférant un groupement méthyle de la SAM vers la glycine. La SAM est alors convertie en SAH et la glycine en N-méthylglycine ou sarcosine (intermédiaire du métabolisme de la choline en glycine) (Wagner *et al.*, 1985), comme schématisé dans la réaction suivante :



La sarcosine sera ensuite successivement méthylée pour former la diméthylglycine (DMG) et ensuite la triméthylglycine (ou bétaine). Ces molécules sont des composants importants du métabolisme cellulaire hépatique. La choline, forme réduite de la bétaine, fait également partie des molécules importantes de ce métabolisme cellulaire.

-PEMT (Phosphatidyléthanoline méthyltransférase)

La phosphatidyléthanoline méthyltransférase (PEMT) est une méthyltransférase catalysant la réaction suivante :



Il s'agit d'une enzyme hépatique, ayant deux substrats la SAM (S-adenosyl-L-méthionine) (Mato *et al.*, 1997) et la PE (phosphatidyléthanoline). Les produits de cette réaction sont la SAH (S-adenosyl-L-homocystéine) et la PC (Phosphatidylcholine ou phosphatidyl-N-triméthyléthanoline). L'enzyme PEMT est localisée sur le réticulum endoplasmique et sur des membranes associées à la mitochondrie. Les effets du bézafibrate sur la synthèse PE-dépendante de la phosphatidylcholine ont été étudiés (Nishimaki-Mogami *et al.*, 1996). Dans les hépatocytes de rat en culture, le bezafibrate ajouté au milieu de culture réduit rapidement et sensiblement la conversion de la PE en PC. En outre, la méthylation de la sérine a également été bloquée par le bézafibrate. Ceci s'explique par le fait que la sécrétion de la PC provient soit de la sérine ou de l'éthanoline. Dans notre étude, le bézafibrate va être utilisé en tant qu'inhibiteur de la PEMT.

2.1.2. Les métabolites

- **L'homocystéine (Hcy)**

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré qui n'intervient pas dans la synthèse protéique. Elle est formée dans le compartiment intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. Il n'existe qu'une faible proportion d'homocystéine libre dans le sang. Sa forme réduite (-SH) ne représente que 1-2 % (Mudd *et al.*, 2000) de l'homocystéine totale. D'autres homocystéines circulent sous la forme de ponts disulfures libres Hcy-Hcy (homodimère) ou Hcy-Cys (hétérodimère). 75-80 % de l'homocystéine totale circule sous forme de ponts disulfures avec les résidus cystéine de l'albumine circulante, mais elle peut également être liée à d'autres protéines, telles que l'hémoglobine (Jakubowski, 2006). Elle est considérée comme un thiol toxique pour la cellule. Le voie de reméthylation et la voie de transsulfuration sont nécessaires pour son élimination ou sa transformation.

Le taux normal d'Hcy est :

- taux cellulaire de 1 $\mu\text{mol/L}$
- taux plasmatique de 10 à 15 $\mu\text{mol/L}$

Une hyperhomocystéinémie (Roblin *et al.*, 2007), provoquée par une multitude de facteurs (génétiques ou alimentaires), se présente sous trois formes (Bottiglieri, 2005) :

- modérée (de 15 à 30 $\mu\text{mol/L}$)
- intermédiaire (de 30 à 100 $\mu\text{mol/L}$)
- sévère ou majeure (> 100 $\mu\text{mol/L}$)

L'hyperhomocystéinémie peut être liée à des déficits nutritionnels en folates et/ou en cobalamine ou, de façon moins importante, en vitamine B6 et peut avoir des impacts sur le fonctionnement du système cardiovasculaire (Nygard 1999), mais aussi dans le développement de la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou encore conduire à des défauts de fermeture du tube neural (Spina Bifida) durant la période embryonnaire.

- **La S-adénosyl-méthionine (SAM)**

La SAM (Fig.1.8) est un métabolite, synthétisée dans le cytosol de toutes les cellules, mais le foie joue un rôle central dans sa synthèse et sa dégradation (85% des réactions de méthylation et 50% du métabolisme de la méthionine (Avila *et al.*, 2002)).

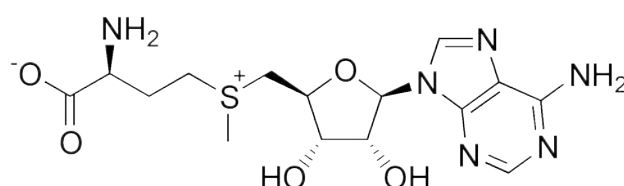


Figure 1.8 : La S-adénosyl-méthionine (SAM)

La SAM a un rôle essentiel dans tous les mécanismes de méthylation. L'ion sulfonium de la SAM permet le transfert du groupement méthyle sur une grande variété d'accepteurs par des réactions de méthylation. La SAM est le deuxième substrat physiologique le plus utilisé après l'ATP (Fontecave *et al.*, 2004). La SAM est utilisée par au moins 39 méthyltransférases

(Brosnan *et al.*, 2004), dont certaines référencées ci-dessus. Ainsi, la SAM joue le rôle de donneur dans la méthylation de l'ADN, en méthylant les résidus cytosines en position 5' du noyau pyrimidique. L'addition covalente d'un groupement méthyle sur les sites CpG du brin d'ADN nouvellement synthétisé est réalisée par l'ADN méthyltransférase I (DNMT1). La S- adénosylméthionine permet aussi la méthylation de certains ARNt, de protéines, et est impliquée dans la biosynthèse de composés comme la créatine (qui est une réserve d'énergie sous forme de créatine-phosphate au niveau musculaire) et de la transformation de la noradrénaline en adrénaline. Elle permet également la transformation de la phosphatidyléthanolamine en phosphatidylcholine par la fixation de trois groupements méthyle sur la fonction amine (Mato *et al.*, 1997). Cette méthylation en phosphatidylcholine augmente la fluidité des membranes.

La SAM est également impliquée dans la synthèse des polyamines. La décarboxylation de la SAM par l'adénosylméthionine décarboxylase 1 permet la synthèse de polyamines, telles que la spermine et la spermidine. Les polyamines sont trouvées de façon ubiquitaire chez les mammifères et sont impliquées dans différents processus biologiques comme la régulation des gènes, la croissance (Thomas *et al.*, 2001) et la différenciation cellulaire.

- **La Méthionine**

La méthionine est un acide aminé essentiel qui provient du catabolisme des protéines. C'est un acide- α -aminé essentiel possédant une fonction thioéther (-SCH₃). La méthionine est capable de transférer le groupement méthyle qui est lié à l'atome de soufre et ce transfert nécessite l'utilisation d'énergie, fournie sous forme d'ATP. L'alimentation constitue la source de méthionine pour l'organisme. Environ 50% des lignées cellulaires, dérivées de tumeurs, montrent une faible capacité à croître dans un milieu dépourvu de méthionine et enrichi en homocystéine et vitamine B12. Il existe des cellules capables de renverser ce processus de «méthionine dépendance», mais elles perdent alors les propriétés associées aux cellules tumorales. Cela suggère que l'auxotrophie pour la méthionine joue un rôle important dans la tumorigenèse.

2.1.3. La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl)

- **Structure**

La cobalamine (Cbl) ou vitamine B12, est une vitamine hydrosoluble. Elle doit son nom à l'atome de cobalt qu'elle contient (Fig.1.9).

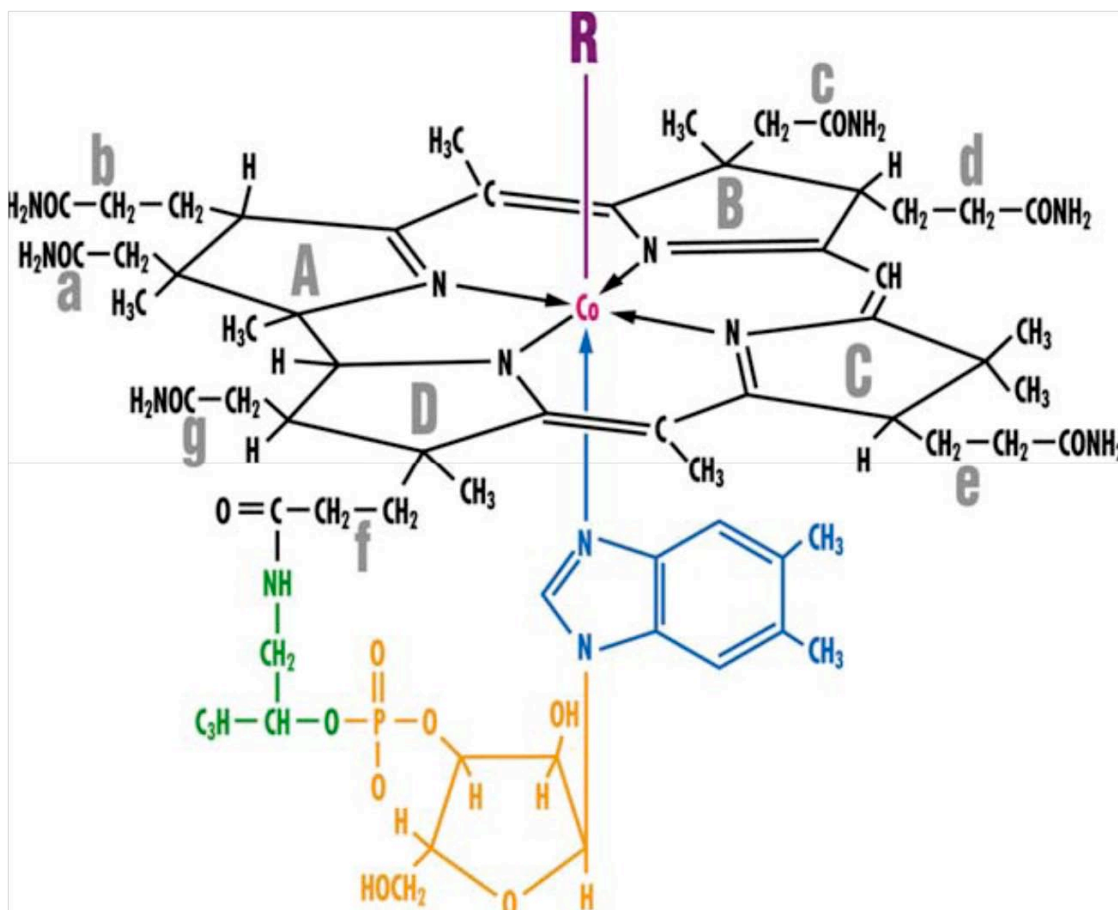


Figure 1.9 : La vitamine B12 ou cobalamine (Cbl). La cobalamine est constituée par un noyau tétrapyrrolique central appelé noyau corrine et deux chaînes axiales, l'une en position α avec un groupement pseudo-nucléotidique diméthylbenzimidazole et l'autre un radical anionique variable R en position β qui détermine le nom du composé vitaminique (modifiée par J.L. Guéant et B. Namour, 2003).

Les Cbl appartiennent à la famille des corrinoïdes. Il existe différentes Cbl en fonction du ligand fixé à l'atome de cobalt qui peut être tri, bi ou monovalent (3 niveaux d'oxydation) : [Cob(I)alamine], [Cob(II)alamine], [Cob(III)alamine].

Les Cbl sont composées d'un noyau corrine (en noir) et un ribonucléotide (en brun) reliés par un pont amino-2 propanol (en vert). Le noyau corrine est formé d'un atome de cobalt avec 4 noyaux pyrroles (A, B, C et D) et un ligand anionique (R). Selon la nature du ligand R il est possible d'obtenir différentes formes de cobalamine :

- CN : cyanocobalamine
- OH : hydroxocobalamine
- CH₃ : méthylcobalamine (forme circulante)
- 5'd Ado : 5'-désoxyadénosylcobalamine.

La cyanocobalamine est la forme commercialement la plus courante de la vitamine B12, car la plus stable à l'air libre et la plus facile à cristalliser, et donc à purifier une fois produite par fermentation bactérienne ou par synthèse *in vitro*. Les bactéries produisent en effet de l'hydroxocobalamine, convertie en cyanocobalamine en passant dans du charbon actif, lequel contient naturellement des ions cyanure CN⁻ ; l'hydroxocobalamine ayant une forte affinité pour les ions cyanure, ceux-ci déplacent l'ion hydroxyde OH⁻ et se fixent sur la cobalamine. Les formes biologiquement actives de la cobalamine sont la méthylcobalamine et l'adénosylcobalamine, qui sont instables à l'air libre. L'hydroxocobalamine est utilisée pour traiter les carences en vitamine B12 ou encore l'intoxication au cyanure en raison de la forte affinité de cette molécule pour les anions cyanure CN⁻ (Dart, 2006).

La cobalamine n'est pas synthétisée par l'organisme. Les sources de vitamine B12 sont d'origine alimentaire et spécifiquement d'origine animale (le foie, la viande, les laitages, les oeufs, les poissons). Les apports nutritionnels recommandés sont de 2 µg/jour chez l'adulte et de 2,8 µg/jour chez la femme enceinte (Guéant *et al.*, 2004). Le taux plasmatique est compris entre 160-800 pg/mL. Les valeurs normales doivent être supérieures à 200 pg/mL (150 pmol/L) chez un sujet sain. Nous utilisons 0,05-0,2 % de la cobalamine corporelle totale par jour.

La majorité des Cbl sont liées à des protéines, principalement sous forme d'ado-Cbl et de méthyl-Cbl. Dans la salive, les haptocorrines (protéines R ou transcobalamine 1/TCN1) prennent en charge les Cbl libres (10-30%) et les Cbl liées sont libérées de leur support protéique par les sécrétions chlorohydropepsiques de l'estomac.

Ses deux accepteurs digestifs sont: les haptocorrines et le facteur intrinsèque (FI). Elles se lient préférentiellement aux protéines R en raison du pH acide du suc gastrique et passe de l'estomac au duodénum sous cette forme (Allen *et al.*, 1978).

Les Cbl sont libérées et se lient au facteur intrinsèque (FI) (Gueant, *et al.*, 1990), glycoprotéine sécrétée par les cellules pariétales de l'estomac et indispensable à l'absorption de la vitamine B12 au niveau de l'iléon (Levine *et al.*, 1980; 1981). Ce transfert est conditionné par 3 facteurs : la dégradation partielle des protéines R, la résistance du FI aux protéases, et l'augmentation de l'affinité des Cbl pour le FI quand le pH passe de 2 à 8 (Allen *et al.*, 1978). Le FI n'est pas dégradé par les protéases endogènes et aurait un rôle de protection des Cbl vis-à-vis de la flore intestinale au niveau du jéjunum.

Le complexe Cbl-FI est internalisé dans le compartiment lysosomal par endocytose au niveau des cellules intestinales de l'iléon distal par l'intermédiaire d'un ou de plusieurs récepteurs localisés sur la bordure en brosse des entérocytes. Le récepteur du FI est formé de la cubiline associée à la protéine amnionless formant un complexe appelé *cubam* (Ahuja *et al.*, 2008). Le FI est dégradé et la vitamine B12 est soit métabolisée en coenzyme B12 soit majoritairement transférée sur la transcobalamine II (TCII) (Quadros *et al.*, 1986) synthétisée par l'entérocyte.

Les complexes Cbl-TCII (Fig .1.10) sont transférés au pôle basal de la cellule intestinale et libérés dans la circulation sanguine. L'internalisation du complexe Cbl-TCII par les cellules de l'organisme s'effectue alors selon un mécanisme d'endocytose (Seetharam and Alpers, 1982), récepteur-dépendant. Le transporteur TCII est une glycoprotéine membranaire détectable dans les tissus tels que le rein, le placenta (Quadros *et al.*, 1994), l'intestin et le foie chez l'homme. Elle est aussi exprimée dans le rein, l'intestin et plus faiblement dans le foie chez le rat (Bose *et al.*, 1995). La TCII peut présenter plusieurs polymorphismes à l'origine de modifications de la concentration plasmatique en homocystéine. La mutation la plus commune correspond à la substitution d'une base cytosine en guanine en position 776 (776 C+G) (Namour *et al.* 1998, 2001). La TCII peut également se lier à un autre récepteur : la mégaline ou protéine gp330 (Moestrup *et al.*, 1996). La TC II favorise la capture de la B12 par le foie et les tissus périphériques grâce à son activité perméasique, la partie protéique est dégradée dans les lysosomes et la Cbl est alors libérée (Youngdhal-Turner *et al.*, 1978).

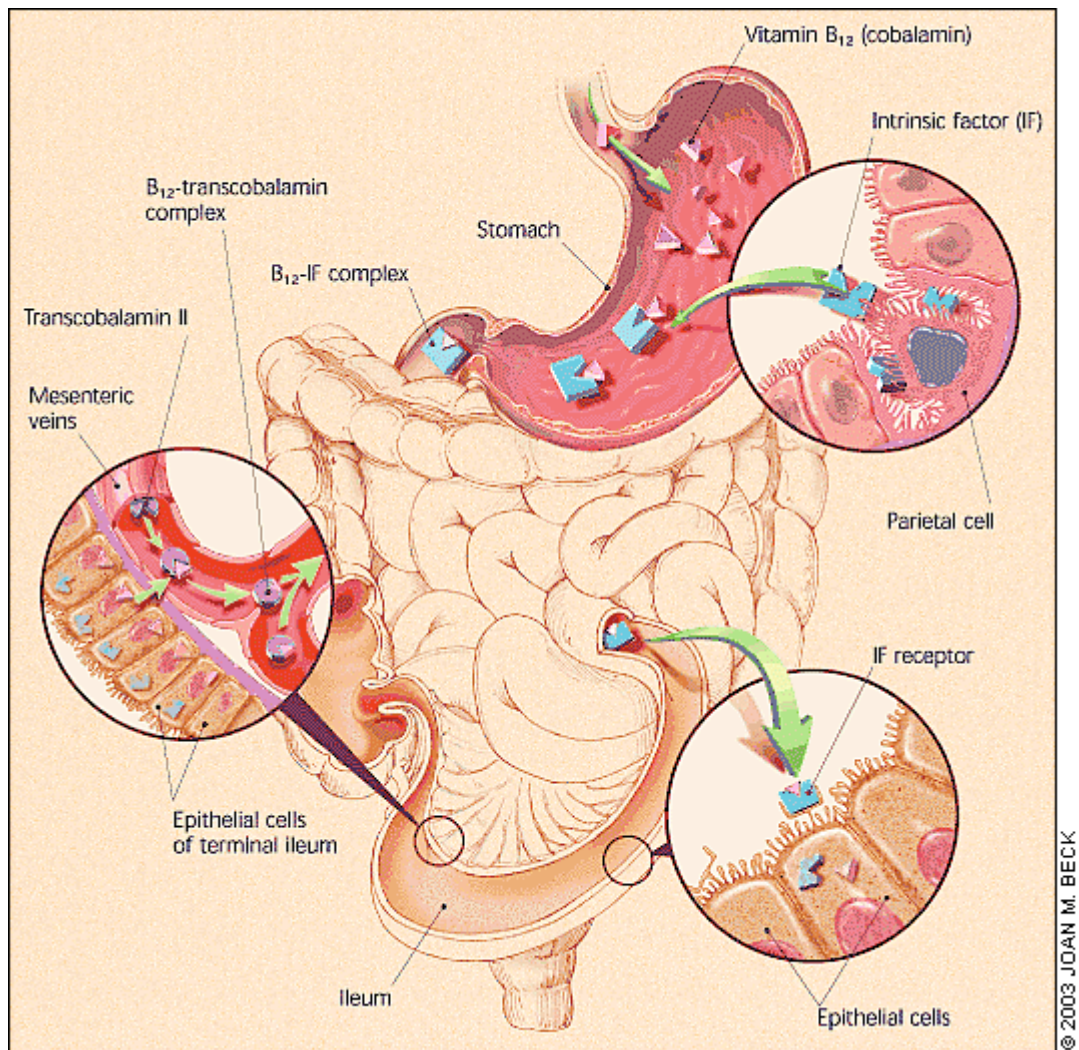


Figure 1.10 : Absorption et transport de la vitamine B12 ou cobalamine (Cbl).

(Oh et al., 2003)

Elle est ensuite transformée en coenzyme active (Leal *et al.*, 2004) après deux réductions successives (Fig.1.11) : en méthyl-Cbl dans le cytoplasme et en Ado-Cbl dans la mitochondrie. La méthyl-Cbl est le coenzyme actif de la méthionine synthase tandis que l'Ado-Cbl est celui de la méthylmalonyl –CoA mutase, une enzyme mitochondriale.

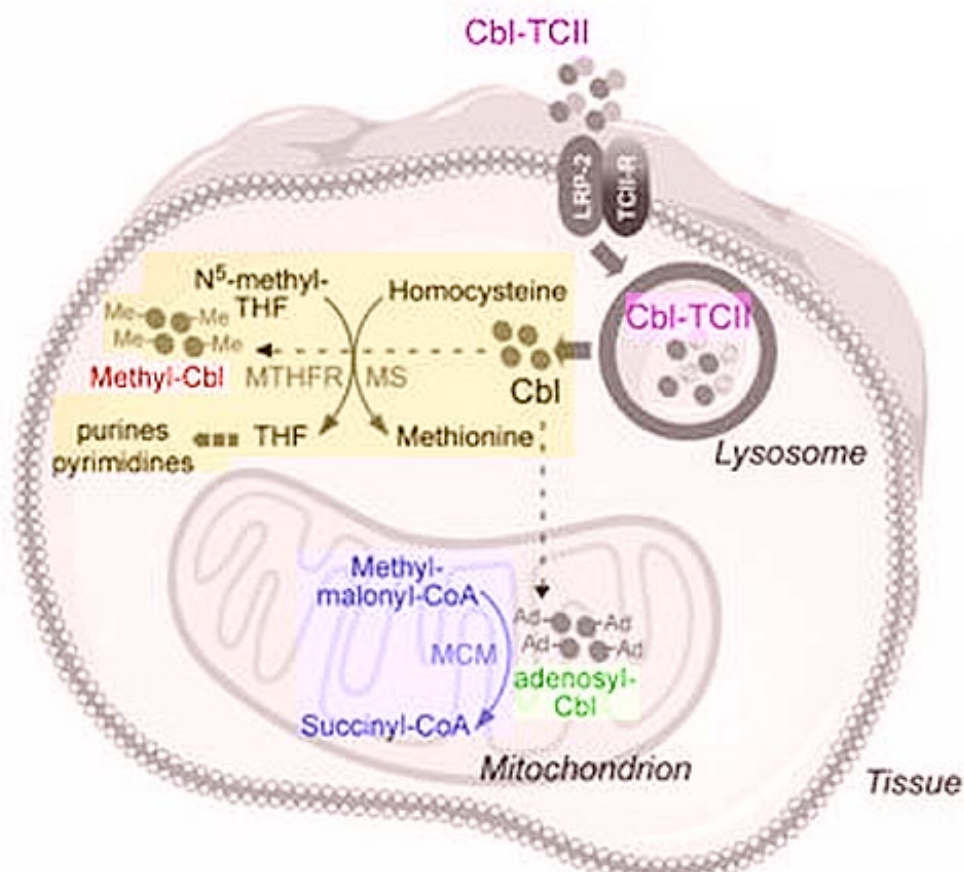


Figure 1.11 : Voies d'internalisation cellulaire de la cobalamine (Cbl). La cobalamine entre dans la cellule grâce au récepteur TCIIR. Elle sera utilisée soit sous forme de méthyl-Cbl dans le cytosol soit sous la forme d'adénosyl-Cbl dans la mitochondrie. (Serraj et al., 2009)

Cette réaction permet la conversion du méthylmalonyl-CoA en succinyl-CoA en présence de la vitamine B12. Le succinyl-CoA peut intégrer alors le cycle de Krebs. Cette réaction se situe dans la matrice mitochondriale et elle intervient dans le catabolisme des aminoacides ramifiés, celui des acides gras saturés et celui du cholestérol (Banerjee et al., 2002). Un dysfonctionnement de la méthylmalonyl-CoA mutase entraîne une acidurie méthylmalonique.

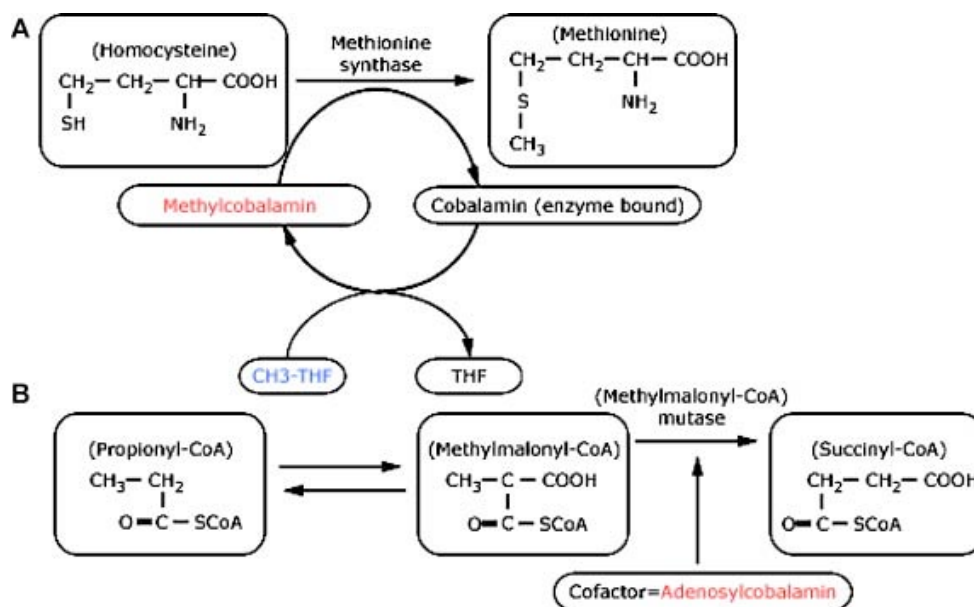


Figure 1.12 : La cobalamine (Cbl) cofacteur de deux réactions indépendantes. A) Dans le cytoplasme, grâce à la méthionine synthase, le groupement méthyle du N5-méthyltetrahydrofolate (CH3-THF) est transféré sur la Cbl pour donner le Tetrahydrofolate (THF). Ensuite, le groupement méthyle de la méthyl-Cbl est transféré sur l'homocystéine pour former la méthionine. B) Dans la mitochondrie, l'acide méthylmalonique, dérivé du malonate, est converti en acide succinique grâce au coenzyme Ado-Cbl et à la méthylmalonyl CoA mutase. (Mazokopakis et al., 2012)

Les besoins en vitamine B12 sont environ de 3 à 4 µg/jour et ils sont couverts par une alimentation normale. Les réserves étant de 3 à 4 mg, une carence en vitamine B12 ne se manifestera qu'après plusieurs années. Les carences d'apport sont plutôt rares chez l'adulte en bonne santé dans les pays industrialisés mais plus fréquentes chez les sujets végétaliens car la vitamine B12 est exclusivement apportée par l'alimentation d'origine animale. Les maladies digestives et la malabsorption peuvent être à l'origine d'une carence en vitamine B12. Les déficits congénitaux du métabolisme de la vitamine B12 sont principalement liés à un déficit en TCII ou en récepteurs du FI (Tanner et al., 2004).

2.1.4. La régulation du cycle de la méthionine

- **Equilibre entre voie de reméthylation et voie de transsulfuration**

Le métabolisme de l'homocystéine est régulé par la voie de reméthylation et par la voie de transsulfuration (Fig.1.12). La disponibilité en méthionine et en SAM oriente ce métabolisme vers l'une ou vers l'autre de ces voies. Une concentration en méthionine basse (apport nutritionnel bas) favorise la voie de reméthylation tandis qu'une concentration de méthionine importante favorise la voie de transsulfuration. Cette régulation a lieu grâce à deux mécanismes : 1) la SAM inhibe la MTHFR et active la CBS, favorisant ainsi la réaction de transsulfuration. Quand la concentration en méthionine augmente, la SAM augmente, la MTHFR est inhibée, la CBS est activée et la voie de transsulfuration est favorisée. 2) Au contraire, si la teneur en méthionine est faible, la voie de reméthylation est favorisée. La voie de reméthylation est donc d'autant plus favorisée que la concentration en SAM est trop basse pour stimuler la CBS (Kutzbach, Stokstad, 1971) .

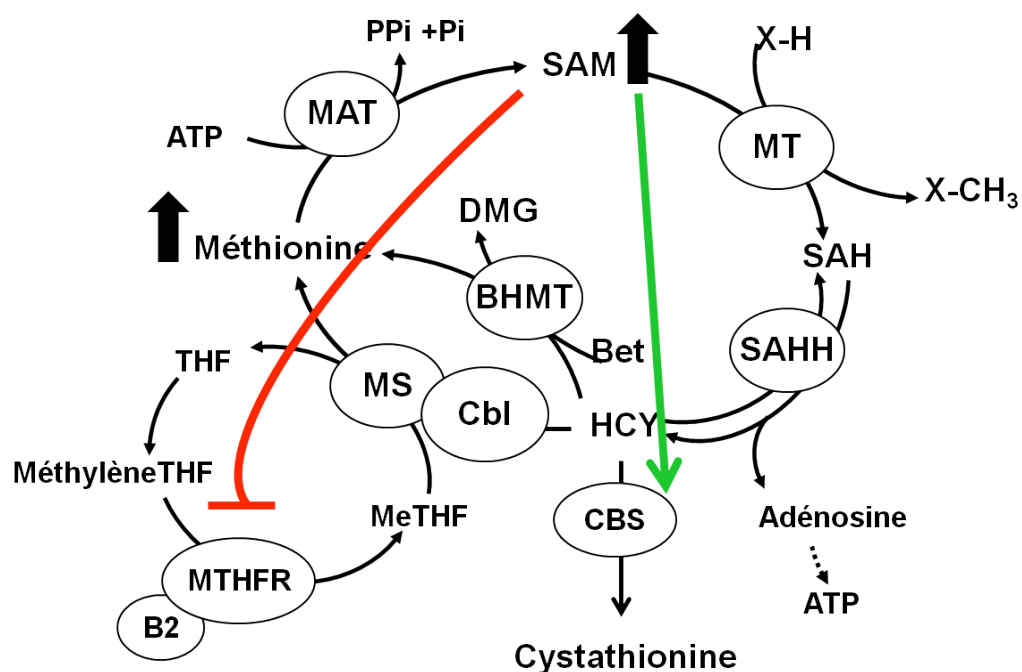


Figure 1.13 : Régulation du cycle de la méthionine par la méthionine et la SAM. Une augmentation de la concentration de la SAM conduit à une augmentation du rapport SAM/SAH, qui de façon allostérique inhibe la MTHFR. Ainsi, la voie de transsulfuration (la SAM étant un

effecteur allostérique de la CBS) est favorisée. (Méthionine adenosyl-transférase (MAT) ; S-adenosylméthionine (SAM) ; Méthyletransférases (MT) ; groupements méthyles (X-H) ; substrat méthylé (X-CH₃) ; S-adénosyl-homocystéine (SAH) ; Homocystéine (Hcy) ; S-adénosyl-homocystéine-hydrolase (SAHH) ; Bétaine-homocystéine methyl-transférase (BHMT) ; Bétaine (Bet) ; Dimethylglycine (DMG) ; Méthionine synthase (MS) ; Cobalamine (Cbl) ; Methyltetrahydrofolate (MeTHF) ; Tetrahydrofolate (THF) ; Méthylènetetrahydrofolate (MethyleneTHF) ; Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) ; cystathionine β synthase (CBS)).

- **Les facteurs génétiques**

Des mutations concernant les gènes codant pour les enzymes du cycle de la méthionine et des folates, peuvent influencer considérablement ce métabolisme. Nous citons les principaux :

Le gène codant pour la ***MTHFR*** présente soixante polymorphismes décrits. Le plus commun est le polymorphisme *MTHFR C677T* sur l'exon 4 dans le domaine catalytique de l'enzyme (Selhub, 1999 ; Martin *et al.*, 2006). Ce polymorphisme a été décrit comme étant un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, des néoplasies colorectales, des défauts de fermeture du tube neural et des complications de grossesse (Meyer *et al.*, 2004). Un second polymorphisme important est *MTHFR A1298C* sur l'exon 7 qui code pour une partie du domaine régulateur de l'enzyme.

Le gène ***MTR*** codant pour la méthionine synthase (MS) peut également subir des mutations. Le polymorphisme *MTR A2756G* entraîne un changement dans une région de la protéine ayant un rôle dans la réduction de la vitamine B12 (Chen *et al.*, 1997).

Le gène ***MTRR*** codant pour la méthionine synthase réductase (MSR) présente le polymorphisme *MTRR A66G* sur l'exon 2. Cette modification touche le site de fixation de la flavine mononucléotide nécessaire à la réduction de la vitamine B12 (Laraqui *et al.*, 2007). Ce polymorphisme est associé à des maladies coronariennes artérielles (Guéant-Rodriguez *et al.*, 2005).

Les polymorphismes de ces trois gènes ont été associés à une hyperhomocystéinémie, à des défauts de fermeture du tube neural et des cancers colorectaux (Meyer *et al.*, 2004).

Les polymorphismes de la ***CBS*** : *CBS T833C*, *CBS G919A*, seraient associés à des problèmes de thrombose (Gaustadnes, 2000) et à une hyperhomocystéinémie (Dawson, 1996).

Le gène ***TCII*** codant pour le transporteur de la transcobalamine présente également des polymorphismes tels que *TCIIC776G* (Namour *et al.*, 1998) et *TCII A67G*. Eux aussi sont associés au problème de *Spina bifida* (Christensen *et al.*, 1999), mais aussi à des avortement spontanés (Zetterberg, 2004).

- **Régulation du cycle de la méthionine par les méthyltransferases et la SAH**

La glycine N-méthyltransférase est très abondante au niveau du cytoplasme des cellules du foie et est capable de convertir la glycine en sarcosine (= méthylglycine) en présence de SAM et en libérant donc la SAH.

Cette enzyme peut être inhibée par le 5-méthyltétrahydrofolate (Wagner *et al.*, 1989) mais pas par la SAM. La glycine N-méthyltransférase permet donc de réguler le ratio AdoMet/AdoHcy.

La SAH est régulée par la SAH hydrolase (Mato *et al.*, 1997). L'accumulation de SAH a un effet inhibiteur sur la plupart des méthyltransférases ayant comme substrat la SAM. Par exemple, les méthyltransférases, méthylant les phospholipides ou l'ADN comme la DNA cytosine-5-méthyltransférase, sont inhibées de façon compétitive par la SAH (Hirata *et al.*, 1980; Kredich *et al.*, 1979; 1977).

Pour ces raisons, la SAH est considérée parfois comme étant un composé bio-régulateur (Finkelstein *et al.*, 1984, Zappia *et al.*, 1969).

- **Régulation du cycle de la méthionine au niveau de la méthionine synthase**

Régulation de la méthionine synthase par les polyamines

Les polyamines trouvées de façon ubiquitaire chez les mammifères sont considérées comme étant des régulateurs cellulaires et joueraient un rôle dans la régulation de la MS. La MS de foie de rat peut être activée *in vitro* par les polyamines. Cette activation semblerait être proportionnelle au nombre de charges positives associées aux polyamines. La spermine, la plus chargée positivement, est la plus activatrice. Cette activation serait due à une stimulation directe de la MS puisque l'hypothèse de l'inactivation d'un inhibiteur naturel de la MS a été écartée en

montrant son existence en présence de la protéine hautement purifiée (Kenyon *et al.*, 1996). La stimulation de la méthionine synthase par les polyamines peut aider à la préparation de la division cellulaire puisque la MS est impliquée indirectement dans la synthèse protéique et des acides nucléiques. La concentration de polyamines dans les cellules cancéreuses est plus forte que dans les cellules normales, ce qui peut stimuler encore plus la méthionine synthase. Cependant, cette stimulation de la méthionine synthase tout comme celle de l'ornithine décarboxylase, la première enzyme de la synthèse des polyamines, pourraient être contrebalancée par la voie de secours de la méthionine (Christopher *et al.*, 2002; Subhi *et al.*, 2003). Il est à noter que la surexpression de l'ornithine décarboxylase est associée à une transformation cellulaire (Megosh *et al.*, 1995). On peut considérer que l'ornithine décarboxylase fait partie de la famille des proto-oncogènes cellulaires (Auvinen *et al.*, 1992).

Régulation de la méthionine synthase par la méthionine et la SAM

De nombreuses études suggèrent qu'il existe un effet inhibiteur de la méthionine sur l'activité méthionine synthase (Grzelakowska-Sztart et Landman-Balinska, 1976). D'autres auteurs montrent une augmentation de l'activité de la méthionine synthase par la substitution de la méthionine par l'homocystéine et la vitamine B12 dans le milieu de culture (Tautt *et al.*, 1981).

La SAM peut donc être considérée comme un facteur de régulation de l'activité de la méthionine synthase puisqu'elle intervient au niveau de la réduction du couple cobalamine/méthionine synthase. La méthionine synthase de rein de porc peut être inhibée par la SAH contrairement à celle de foie de rat (Billings *et al.*, 1981).

Régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle de la méthionine synthase

Le coenzyme B12 stabiliserait la protéine MS et n'induirait pas sa traduction (Yamada *et al.*, 2000). Cela correspond donc à une régulation post-traductionnelle par la vitamine B12 en augmentant la stabilité de l'holoenzyme. Cependant, cette hypothèse est contredite par Brunaud, *et al.*, (2003) qui supposent que l'effet de la vitamine B12 sur l'expression de la méthionine synthase est plutôt un effet post-transcriptionnel comme cela avait été déjà supposé par l'équipe de Banerjee (Gulati *et al.*, 1999). Ces auteurs ont cultivé des lignées cellulaires, dont HepG2, dans du milieu de culture contenant de la méthionine et supplémenté ou non en vitamine B12. Ils

ont observé que le taux d'ARNm de la MS restait constant quand ils supplémentaient ou non en vitamine B12 et que la supplémentation en vitamine B12 augmentait la quantité et l'activité de la méthionine synthase mais avec une proportion d'holoenzyme constante (Gulati, et al., 1999). En fait, l'augmentation de la concentration de MS permet l'augmentation de la concentration intracellulaire de vitamine B12 (Oltean *et al.* 2003). Dans ce cas, cela correspond à une régulation post-transcriptionnelle de la méthionine synthase en augmentant son taux de traduction par stabilisation de son ARNm.

Maladies liées au dysfonctionnement de la méthionine synthase

Différentes pathologies sont associées au dysfonctionnement de la méthionine synthase. Un déficit de la méthionine synthase provoque une hyperhomocystéinémie qui est un facteur de risque dans les maladies cardio-vasculaires et peut aussi causer un défaut dans la fermeture du tube neural de l'embryon (Gueant *et al.*, 2003; McCully 1969; Steegers-Theunissen *et al.*, 1991). Les polymorphismes des gènes de la méthionine synthase et de la MTHFR ont aussi été associés à la carcinogenèse (Avila *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1998).

2.2. Implication du cycle de la méthionine dans le cancer

L'inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et l'activation d'oncogène respectivement par hyperméthylation et hypométhylation de l'ADN pourraient constituer une cause de cancer. Ces cassures d'ADN et la méthylation de l'ADN sont directement liées au métabolisme des folates et de la méthionine. Notamment des déficiences en folates et/ou en donneurs de méthyles peuvent entraîner de mauvaises incorporations dans l'ADN ou des modifications de la méthylation dommageables pour la cellule (Brunaud *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans un modèle de rats déficients en folates/donneurs de groupements méthyles, les lésions d'ADN et les altérations de la méthylation d'ADN sont associées à l'hépatocarcinome (James *et al.*, 2003).

D'un autre côté, l'altération cellulaire du métabolisme de la vitamine B12 influence la progression du cycle cellulaire et la différenciation des cellules de neuroblastome à travers les voies de signalisation qui sont liées à l'augmentation de l'expression de PP2A, pro-NGF, et TACE (Battaglia-Hsu *et al.*, 2009).

Depuis l'identification du rôle de l'enzyme MS Cbl-dépendante dans le recyclage de l'acide folique, l'utilisation d'antimétabolites de la Cbl (comme certains inhibiteurs utilisés dans le traitement de la sclérose en plaques) a été suggéré comme une stratégie potentielle pour la thérapie du cancer (Huennekens *et al*, 1976).

Même si de nombreux composés ont été produits, aucun test ne s'est avéré efficace pour inhiber la MS-Cbl ou encore les voies attenantes. Des approches plus récentes ont exploré l'utilisation de dérivés fluorescents de la Cbl pour visualiser les tumeurs, car ces composés se retrouvent préférentiellement dans des cellules tumorales (Hogenkamp *et al.*, 1999). L'épuisement de la Cbl est aussi utilisé comme une stratégie visant à inhiber la prolifération des cellules cancéreuses (McLean *et al.*, 1997).

Des anticorps monoclonaux spécifiques anti-TC et anti-TCblR peuvent bloquer l'absorption de la Cbl ou être utilisés pour délivrer des médicaments conjugués à la Cbl par cette voie (Quadros *et al.*, 1996). L'exigence en Cbl par les cellules cancéreuses hautement prolifératives et la surexpression de TCblR pour répondre à la demande accrue de Cbl, rend la voie TC-TCblR une cible idéale pour cette approche.

Le cycle de la méthionine, et plus particulièrement la SAM (Loenen, 2006), constitue un donneur de méthyle très important pour les méthyltransférases. La méthylation des composants tels que les protéines, l'ADN et les lipides est réalisée grâce à ce cycle. Dans le foie, la méthylation des lipides a une place importante. Par la suite, nous allons citer quelques éléments décrivant cette voie des lipides et plus particulièrement celle des phospholipides.

3. La voie des phospholipides

3.1. Les phospholipides

Le cycle de la méthionine (Fig.1.14) régule la voie des phospholipides grâce au groupement méthyle, utilisé dans la transformation de la phosphatidyléthanolamine (PE), qui est méthylée, en phosphatidylcholine (PC). Cette réaction est catalysée par la même enzyme qui transforme la SAM en SAH, la phosphatidyléthanolamine-méthyl-transférase (PEMT). La phosphatidyl-choline (PC) est hydrolysée au niveau de la liaison diester terminale par l'enzyme phospholipase D (PLD) en acide phosphatidique (PA) et en choline (McDermott *et al.*, 2004). L'acide phosphatidique serait un acteur de voies de signalisation intracellulaires et il agirait comme second messenger sur des protéines kinases, des phospholipases et des protéines tyrosine kinases (Exton, 1997). Dans le phénomène de multidrug resistance (MDR) il a été aussi remarqué une augmentation de la quantité de la Phospholipase D (Fuicci *et al.*, 2000).

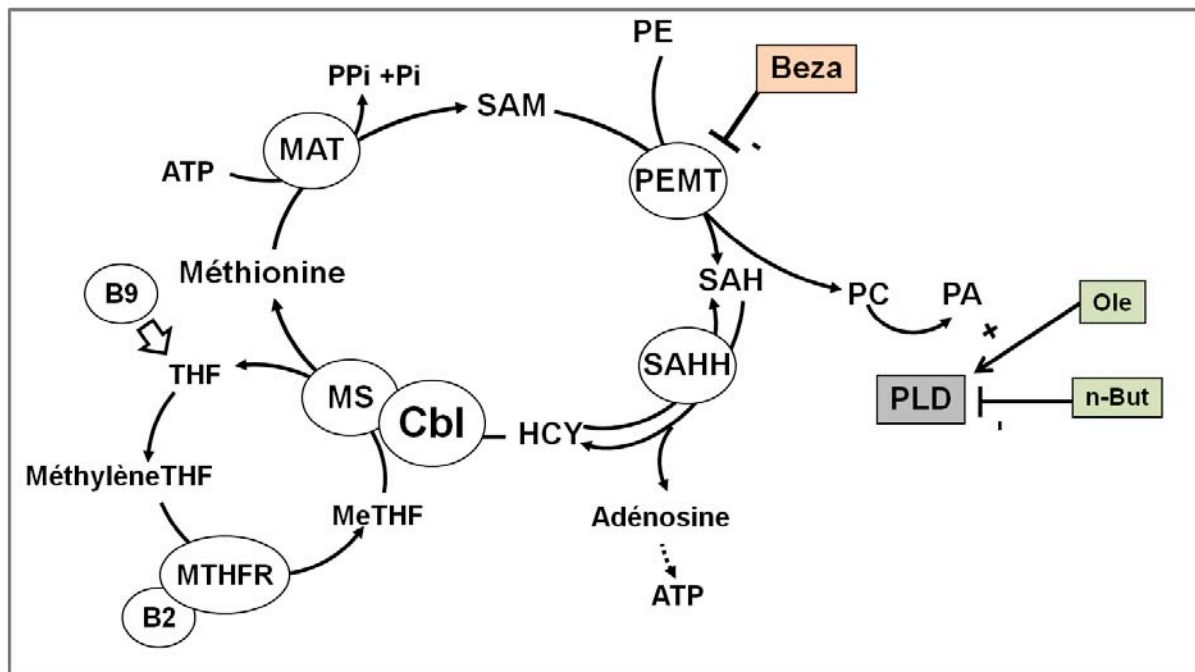


Figure 1.14 : Le cycle de la méthionine en liaison avec la phospholipase D (PLD). Grâce à la PEMT, la PE et la SAM sont transformées en PC et SAH respectivement. Par la suite, la PC est transformée en PA sous l'action de l'enzyme PLD. Le Beza est l'inhibiteur de la PEMT. Ole et n-But sont l'activateur et l'inhibiteur de la PLD. (Méthionine adenosyl-

transférase (MAT) ; S-adenosylméthionine (SAM) ; Phosphatidyléthanolamine-Méthyletransférase (PEMT) ; Phosphatidyléthanolamine (PE) ; Phosphatidylcholine (PC) ; Acide phosphatidique (PA) ; S-adénosyl-homocystéine (SAH) ; Homocystéine (Hcy) ; S-adénosyl-homocystéine-hydrolase (SAHH) ; Bétaine-homocystéine methyl-transférase (BHMT) ; Bétaine (Bet) ; Dimethylglycine (DMG) ; Méthionine synthase (MS) ; Cobalamine (Cbl) ; Methyltetrahydrofolate (MeTHF) ; Tetrahydrofolate (THF) ; Méthylènetetrahydrofolate (MethyleneTHF) ; Méthylènetetrahydrofolate reductase (MTHFR) ; Bézafrate (Beza) ; Acide oléique (Ole) ; n-Butanol (n-But)) .

Un phospholipide est un lipide amphiphile (Fig.1.15), c'est-à-dire constitué d'une «tête» polaire (hydrophile) et de deux « queues » aliphatiques (hydrophobes). La plupart des phospholipides sont les phosphoglycérides, dont la tête s'organise autour d'un résidu glycérol-3-phosphate estérifié par une molécule polaire, et les deux queues sont les chaînes aliphatiques de deux acides gras. Les autres phospholipides sont les sphingomyélines, qui dérivent structurellement de la sphingosine.

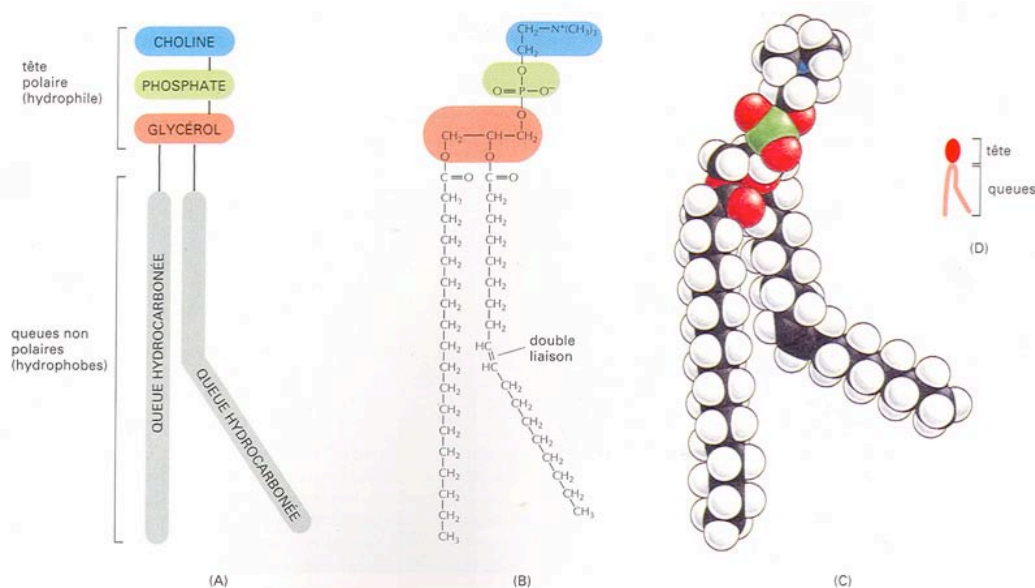


Figure 1.15 : La structure d'un phospholipide (phosphoglycéride). La tête polaire ou hydrophile est constituée par un groupement polaire (ici la choline), un pont phosphate et du glycérol. Les queues aliphatiques sont hydrophobes et constituées d'acides gras.
<http://www.humans.be/pages/biomb.htm>

Les propriétés physicochimiques des phospholipides dépendent à la fois du groupement polaire de la tête hydrophile et des chaînes aliphatiques des queues hydrophobes. En milieu aqueux, de telles molécules amphiphiles tendent à s'organiser de telle sorte que seule leur tête hydrophile soit en contact avec les molécules d'eau, ce qui aboutit typiquement à des structures en micelle, de liposome ou de bicouche lipidique (Fig.1.16).

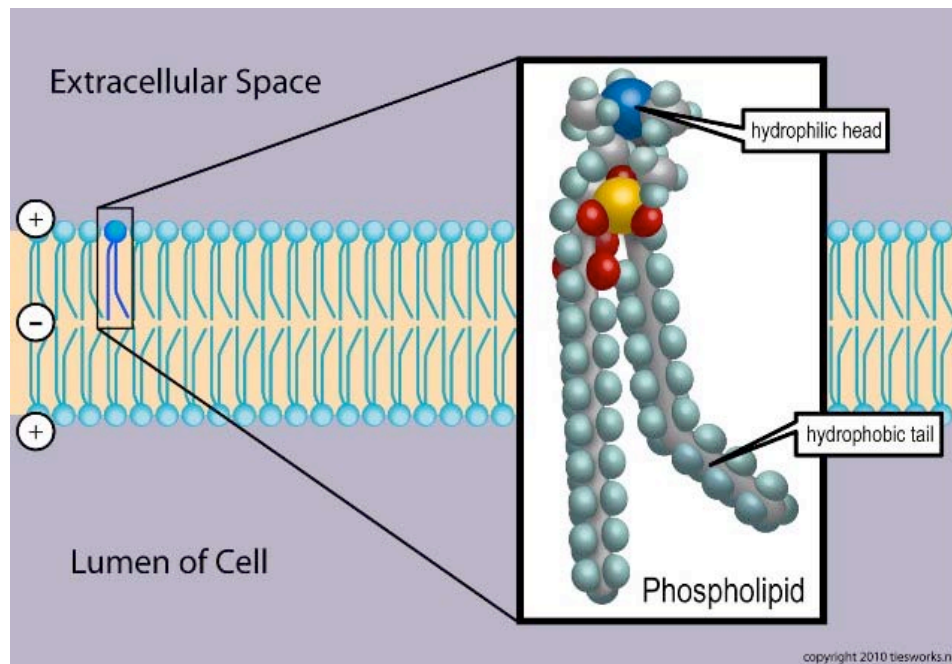


Figure 1.16 : Les phospholipides dans la bicouche membranaire. La bicouche lipidique de la membrane cellulaire est constituée par une bicouche des phospholipides. Les phospholipides sont des molécules amphiphiles. Les phospholipides possèdent une tête hydrophile, qui est située soit vers l'espace extracellulaire soit vers le cytosol. Ils sont aussi constitués par deux queues hydrophobes, dirigées vers l'intérieur de la bicouche lipidique.
http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Phospholipid_TvanBrussel.jpg

- **La phosphatidylcholine**

Il s'agit d'un lipide formé à partir d'une choline, d'un phosphate, d'un glycérol et de deux acides gras, qui peuvent varier (Fig.1.15). La phosphatidylcholine est naturellement produite par le foie. Elle est un important constituant de la bile dont le rôle est d'émulsionner

les graisses présentes dans le duodénum. Elle est aussi nécessaire, en plus des sels biliaires, pour empêcher que les gouttelettes lipidiques ne se ré-agglutinent.

En tant que phospholipide, elle fait partie de la constitution des membranes cellulaires et sert à préserver leur viscoélasticité. Elle est un composant essentiel du système nerveux et constitue près de 30 % du poids sec du cerveau et 15 % des nerfs.

- **Voies de synthèse de la phosphatidylcholine**

La phosphatidylcholine peut être synthétisée selon deux voies distinctes. 1) La voie de la PEMT et 2) la voie Kennedy.

1) La voie PEMT

La conversion de la PE en PC par trois méthylations séquentielles a d'abord été rapportée chez le rat. La réaction est catalysée par une ou plusieurs PEMTs (Fig.1.17) et la S-adénosylméthionine est utilisée comme donneur de méthyles (Daum *et al.*, 1998 ; Brosnan *et al.*, 2004). Chez les mammifères, une seule PEMT catalyse les trois réactions de méthylation et est exprimée principalement dans le foie, où elle produit environ 30% de la PC hépatique.

L'importance de la méthylation de PE en physiologie animale a été étudiée en invalidant le gène *PEMT* chez la souris (Vance *et al.*, 2007 ; 2009). Même si toute activité PEMT éliminée, les souris *PEMT*-nulles n'affichaient aucun phénotype anormal et présentaient des niveaux normaux de PE et de PC dans le foie. Toutefois, lorsque les animaux ont été nourris avec un régime alimentaire déficient en choline, ils ont vite développé une insuffisance hépatique en phase terminale, avec une quantité de PC hépatique de 50% inférieur à celle des animaux témoins nourris avec un régime alimentaire normal. La raison de cette perte dramatique de PC est la sécrétion par le foie de PC contenant des molécules telles que les lipoprotéines et la bile. Il a été calculé que chaque jour le foie de souris sécrétait une quantité de bile équivalente à la totalité de ses réserves en PC. Avec un manque simultané d'activité de la PEMT et de choline alimentaire, la synthèse de PC n'est plus en mesure de maintenir son utilisation.

En outre, l'activité de la PEMT semble être nécessaire pour la sécrétion des lipoprotéines de très faible densité et pour la régulation de la concentration en homocystéine plasmatique. L'hyperhomocystéinémie est un facteur de risque pour le développement de

maladies cardio-vasculaires, la maladie d'Alzheimer maladie, la démence, et fractures d'os (Vance *et al.*, 2007).

2) La voie Kennedy

En utilisant le foie de rat comme source d'enzyme, une autre voie de biosynthèse *de novo* de la PC (Kennedy, Weiss, 1956) a pu être décrite. Cette voie, dite « voie Kennedy» décrit la formation d'une molécule intermédiaire de haute énergie : la CDP-choline. En conséquence, la voie de Kennedy est souvent désignée comme la voie CDP-choline.

La voie CDP-choline se compose de trois étapes enzymatiques (Fig.1.17). Initialement, la choline kinase (CK) catalyse la phosphorylation de la choline pour donner de la phosphocholine et l'ADP. Dans la deuxième étape, qui est considérée comme l'étape limitante de la voie de Kennedy, la cytidylyltransférase utilise la phosphocholine pour former le donneur de haute énergie CDP-choline avec la libération de pyrophosphate. Enfin, la cholinephosphotransférase catalyse la réaction finale de la voie, en utilisant la CDP-choline et le diacylglycérol (DAG) pour former la phosphatidylcholine.

Le voie de Kennedy est SAM-indépendante et elle constitue 70% de la synthèse hépatique de la phosphatidylcholine (Reo *et al.*, 2002).

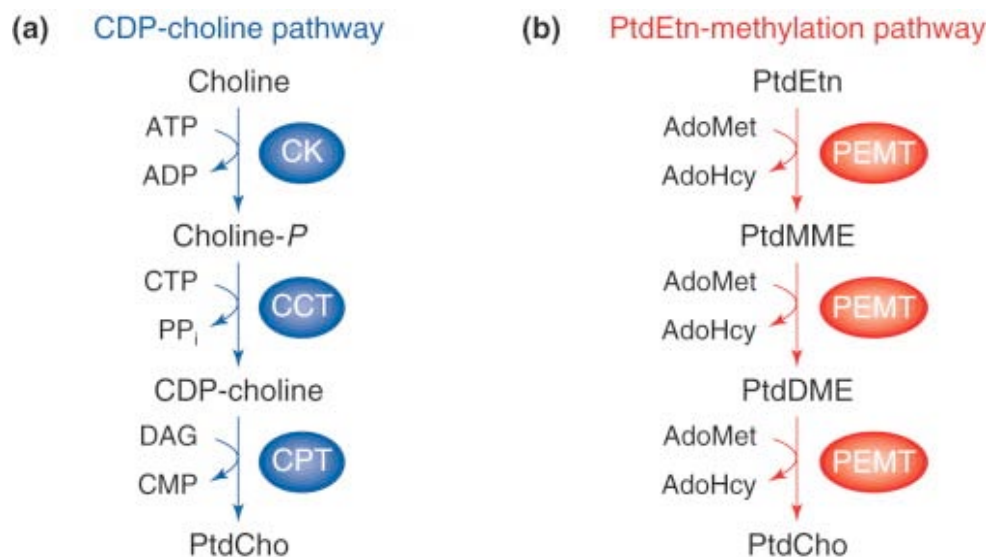


Figure 1.17 : Les voies de biosynthèse de la phosphatidylcholine. a) La voie Kennedy : Synthèse de la phosphatidylcholine (PtdCho) à partir de la choline. Les trois enzymes impliquées dans cette voie sont la CK : Choline Kinase ; la CCT : Cytidylyltransférase ; et la

CPT : Cholinephosphotransferase ; Choline-P : phosphocholine; CDP-choline : cytidine-diphosphocholine; DAG : diacylglycerol ; b) La voie de la PEMT : Elle permet la méthylation de la phosphatidyléthanolamine (PtdEth) par la phosphatidyléthanolamine-méthyltransférase (PEMT) en trois étapes, pour former la phosphatidylcholine. (Kent et al., 1999)

3.1.1. Le catabolisme de la phosphatidylcholine

La phosphatidylcholine est une molécule très importante pour la cellule. Via son catabolisme, elle donne naissance à des molécules caractérisées comme des seconds messagers, telles que l'acide arachidonique, l'acide phosphatidique et le diacylglycérol (Eyster, 2007).

La phosphatidylcholine est métabolisée par les phospholipases. Plusieurs catégories de phospholipases ont été identifiées (Fig.1.18):

La phospholipase A : Elle existe sous deux formes, A1 et A2.

-La phospholipase A1 (PLA1) coupe les phospholipides de façon à enlever un acyle en position 1 et ainsi former des acides gras.

-La phospholipase A2 (PLA2) hydrolyse la liaison acyle des phospholipides, qui se trouve en position 2, afin d'engendrer un acide gras libre (principalement l'acide arachidonique (A.A.)) et un lysophospholipide (tel que la lysophosphatidylcholine). Il existe des PLA2 sécrétées/extracellulaires et des PLA2 cytosoliques/intracellulaires. Elles sont impliquées dans les voies de signalisation de la réponse immunitaire (Pecker *et al.*, 1998). L'acide arachidonique intervient dans les voies Cox et Lox (Eyster, 2007), ce qui pourrait constituer une liaison entre ces voies de signalisation et le métabolisme des phospholipides. Son produit, la lysophosphatidylcholine, peut être métabolisé par une lysophospholipase qui produit l'acide lysophosphatidique (LPA). Elle aurait un rôle important dans la prolifération cellulaire.

L'enzyme qui possède les caractéristiques des PLA1 et PLA2 est appelé Phospholipase B.

La phospholipase C : C'est une enzyme importante dans le métabolisme du phosphatidyl-inositol (PIP2) et dans les voies de signalisation des céramides. Elle génère par hydrolyse des

phospholipides, deux seconds messagers, l'inositoltriphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG).

La phospholipase D : Elle transforme la phosphatidylcholine en acide phosphatidique (PA) et en choline. L'acide phosphatidique est très instable et il peut rapidement se transformer en diacylglycérol (DAG).

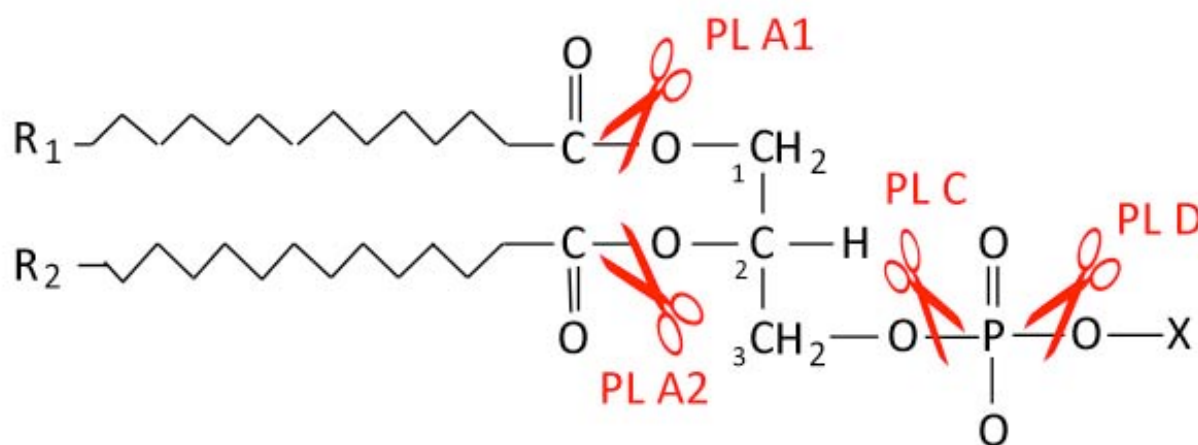


Figure 1.18 : Points de clivage d'un phospholipide par les différentes phospholipases (PL). Selon le type de phospholipase, les produits de l'hydrolyse du phospholipide sont les suivants : PLA1 : Acide gras + Lysophospholipide ; PLA2 : Acide gras (A.A) + Lysophospholipide (LPC) puis (LPA) ; PLB : 2 Acides gras + Glycérolphosphorylalcool ; PLC : Diglycéride + Phosphoalcool (DAG) ; PLD : Acide phosphatidique (PA) + alcool (DAG). <http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Phospholipase.jpg>

- **La phospholipase D**

Chez l'homme, trois isoformes de la phospholipase D ont été identifiées (Lee *et al.*, 2002). La PLD1 (PLD1a, PLD1b), ARF-dépendante. Cette PLD, dont le gène codant se place sur le chromosome 3, a une grande spécificité de substrat et ainsi appelée phosphatidylcholine spécifique. La PLD2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dépendante) est codée par un gène situé sur le chromosome 17. La PLD3 (oléate-dépendante) est elle, codée par le gène homonyme, présent sur le chromosome 19. La PLD est régulée par la

protéine kinase C, par des facteurs de ribosylation de l'ADP et par des protéines tyrosine kinases. Elle interagit aussi avec des petites protéines G de la famille des protéines ρ et son activité peut être stimulée par les ions calcium (Exton, 1999).

L'action du **n-butanol** (alcool primaire) sur l'expression de la PLD a été étudiée et les résultats nous permettent de classer ce produit parmi ses inhibiteurs. Mais il ne s'agit pas d'un inhibiteur direct de la protéine. La PLD catalyse la transphosphatidylolation (l'hydrolyse de la phosphatidylcholine et sa transformation en acide phosphatidique (Fig.1.19)). En présence de n-butanol, la PLD favorisera la réaction entre la phosphatidylcholine et le n-butanol pour produire le phosphatidyl-butanol. A la différence de l'acide phosphatidique, ce composé est relativement stable. Ainsi, l'éventuelle action de l'acide phosphatidique comme second messenger est bloquée, puisque sa production est minimisée (Cadwalander *et al.*, 2004).

Au contraire, **l'acide oléique** serait un activateur (Lee *et al.*, 2002). C'est le plus abondant des acides gras monoinsaturés à chaîne longue (18 carbones) dans notre organisme. Il est également appelé acide cis-9-octadécénoïque ou $\omega 9$ et sa forme saturée est l'acide stéarique.

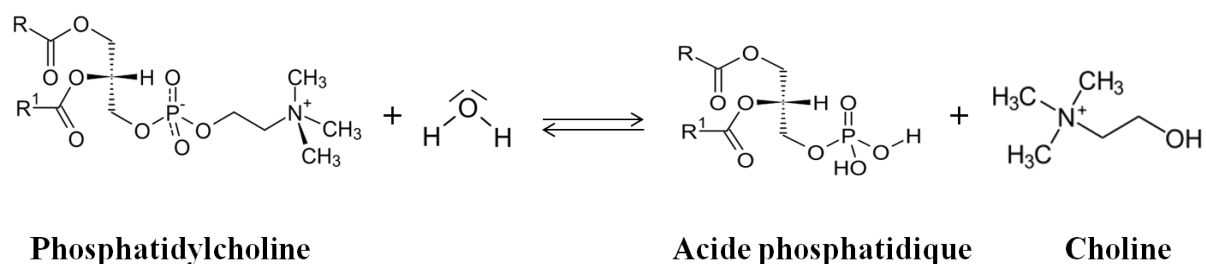


Figure 1.19 : Réaction d'hydrolyse de la phosphatidylcholine. La phospholipase D hydrolyse la phosphatidylcholine pour produire de l'acide phosphatidique et de la choline.

3.2. Implication de la voie des phospholipides dans vie cellulaire et le cancer

Il est important de souligner que la PLD peut, par son action, altérer les propriétés des membranes, puisqu'elles sont constituées, en grande partie, par des phospholipides. En plus, la production d'acide phosphatidique (PA) peut influencer les propriétés des protéines membranaires puisqu'il interagit avec elles. Il ne faut pas oublier aussi que le PA est transformé en DAG. Ce dernier active la PKC dans différents types cellulaires (Ha *et*

al.,1993). Par ailleurs, l'acide phosphatidique lorsque transformé en LPA par la PLA2, constitue un signal extracellulaire important pour des cellules activées (Moolenaar, 1993).

L'implication de la PLD dans le phénomène de la multidrug resistance est mal connue. Une augmentation de l'activité de cette enzyme a été rapportée dans le cas des cellules résistantes (Fiucci *et al.*, 2000 ; Welsh *et al.*, 1994). Par ailleurs, les phospholipides peuvent être des substrats physiologiques de la P-glycoprotéine humaine (Bosch *et al.*, 1997). Ces données suggèrent un lien fonctionnel entre la voie des phospholipides et MDR.

La stimulation de la PC-PLC induite par le TNF α peut entraîner la prolifération des cellules leucémiques myéloïdes. Dans les cellules KG1a, le TNF α peut stimuler parallèlement la PC-PLC et la PLD, dont les lipides produits peuvent activer en retour la MAP kinase et la signalisation de NF-kB, respectivement. En plus, dans les cellules myéloïdes immatures (Plo *et al.*, 2000), la PC-PLC jouerait un rôle dans l'effet prolifératif induit par le TNF α .

L'une des réponses cellulaires à la présence de mitogènes et d'oncogènes serait une augmentation de l'activité de la PLD. Il a été démontré qu'elle peut contribuer à la transformation cellulaire et à la survie. v-Src, avec sa kinase activée, transforme les fibroblastes en culture et augmente l'activité de la PLD (Song *et al.*, 1991).

Les deux isoformes, PLD1 et PLD2, ont été montrées comme pouvant induire la croissance cellulaire en stimulant le cycle cellulaire des fibroblastes de souris (Min *et al.*, 2001). L'activité PLD a également été signalée comme pouvant faire surmonter l'apoptose induite par le H₂O₂ (Nozawa, 2002) et par le glutamate (Kim *et al.*, 2003). Ces données indiquent qu'en plus de l'amélioration de la prolifération cellulaire, la PLD pouvait fournir un signal de survie qui surmonte l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

Une activité élevée de la PLD est aussi capable de supprimer l'expression de p53. Elle stimule également l'apoptose lorsqu'il y a des dommages cellulaires excessifs et elle a été montrée empêcher l'apoptose dans des cellules comportant une haute intensité de signaux Raf (Joseph *et al.*, 2002) dans les cellules MDA-MB-231, cellules cancéreuses du sein (Zhong *et al.*, 2003).

En plus d'agir comme un facteur de progression permettant le passage des points de contrôle du cycle cellulaire, la PLD peut contribuer à la signalisation cellulaire. Le

recrutement de Raf par l'acide phosphatidique généré par la PLD (Rizzo *et al.*, 1999) est probablement important pour l'activation de la MAP kinase. L'activation de la voie des MAP kinases est considérée comme essentielle pour la sortie de G0 ou le passage à travers les points de restriction, pendant la vie cellulaire.

L'activité de la PLD a également été signalée être élevée dans l'estomac (Uchida *et al.*, 1999) et le rein (Zhao *et al.*, 2000) et un polymorphisme du gène *PLD2* a été décrit en association avec la prévalence du cancer colorectal (Yamada *et al.*, 2003).

L'activité PLD élevée dans les cellules MDA-MB-231 conduit aussi à une résistance à la rapamycine (Chen *et al.*, 2002), ce qui indique que mTOR est affectée par l'activité PLD dans ces cellules. En plus, une voie de survie PLD / mTOR peut être différenciée à partir de la voie de PI-3-kinase/Akt dans des lignées cellulaires du cancer du sein. Ainsi, l'acide phosphatidique générée par l'activité de la PLD, active mTOR et peut provoquer un taux de survie PI-3-kinase/Akt-independent ou potentialiser un signal PI-3-kinase/Akt faible.

Les deux voies de survie potentiels, PLD / mTOR et PI-3-kinase/Akt, sont reliées par leur dépendance à l'égard de PIP2 et de PIP3, dont les niveaux sont régulés en partie par la PI-3-kinase et PTEN (Vivanco *et al.*, 2002). Ainsi, le contrôle de ces deux voies de survie peut être coordonné et régulé par le niveau de phosphorylation des phosphoinositides.

Il semblerait que la voie des phospholipides influence celle de la protéine Akt (Jaafar *et al.*, 2011), éventuellement par l'intermédiaire des voies comme la mTOR. La voie Akt peut également être influencée par la modification de la concentration intracellulaire de B12 (Battaglia-Hsu *et al.*, 2009) et elle pourrait agir sur l'expression du gène *MDR-1* (Barancik *et al.*, 2006 ; Hu *et al.*, 2007). Il semble alors intéressant d'introduire cette voie, qui fait aussi l'objet de ce travail de thèse.

4. La voie de la protéine kinase B/Akt

4.1. La protéine Akt

La famille des protéines AKT, dont les membres sont aussi appelés PKB (Protein kinases B) joue un rôle important dans la signalisation cellulaire chez les mammifères. Chez les humains, trois gènes constituent la « famille Akt » : *Akt1*, *Akt2*, *Akt3*. Ces gènes codent pour une famille de serine/thréonine-spécifique protéines kinases, impliquées dans l'inhibition de l'apoptose.

Akt1 (chr.14q32) est impliquée dans les voies de survie cellulaire en inhibant les processus apoptotiques. Elle est aussi capable d'induire les voies de synthèse protéique et elle est la protéine clé de signalisation qui conduit à une hypertrophie des muscles squelettiques et en général la croissance tissulaire. Akt1 est ainsi impliqué dans plusieurs types de cancer. Il a été identifié en tant qu'oncogène dans le rétrovirus transformé AKT8 (Staal *et al*, 1977).

Akt2 est une molécule importante de la voie de signalisation de l'insuline. Akt2 est nécessaire pour l'induction du transport du glucose (Garofalo *et al*, 2003).

Akt3 est moins connu, mais il paraît qu'il est principalement présent dans le cerveau. Les souris dont le gène *Akt3* a été invalidé ont des cerveaux de petite taille (Yang *et al*, 2004).

- **Différents rôles d'Akt**

Akt régule la survie cellulaire et le métabolisme en régulant différents effecteurs, tels que NFκB, Bcl-2 ou MDM2.

Akt module la survie cellulaire, médiée par des facteurs de croissance, de façon directe ou indirecte. BAD est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Akt pourrait phosphoryler BAD au niveau de la serine 136 (Alberts *et al*, 2002), ce qui pourrait conduire BAD à sa dissociation du complexe Bcl-2/Bcl-X et perdre sa fonction pro-apoptotique (Lodish *et al*, 1999).

Akt pourrait également activer NFκB, *via* une régulation de IKK (IκB Kinase), ce qui conduit à la transcription de gènes de pro-survie (Faissner *et al*, 2006).

Akt joue aussi un rôle dans la progression du cycle cellulaire via le suppresseur des tumeurs PTEN (Ramaswamy *et al*, 1999 ; Kandel *et al*, 2002).

De plus, il a été montré que des souris knockout Akt(-/-) avaient des problèmes de maturation des vaisseaux sanguins, une modification de perméabilité de ces vaisseaux et par conséquent, une angiogenèse pathologique (Chen, Somanath *et al*, 2005).

4.1.1. Les voies de régulation de la protéine Akt

Comme nous pouvons le constater dans la figure 1.20, la protéine Akt se situe au centre des mécanismes de régulation de la vie cellulaire. Elle intervient dans des voies responsables du développement et de la survie cellulaire, mais elle est aussi et souvent un acteur majeur de la signalisation nécessaire pour la cellule. La régulation de la protéine Akt est très complexe et elle fait intervenir une multitude de facteurs dont les interactions ne sont pas toujours bien élucidées. Nous allons développer trois entre eux, qui paraissent intervenir dans les mécanismes que nous étudions : La protéine PP2A, la voie PI3K et la voie des MAPK.

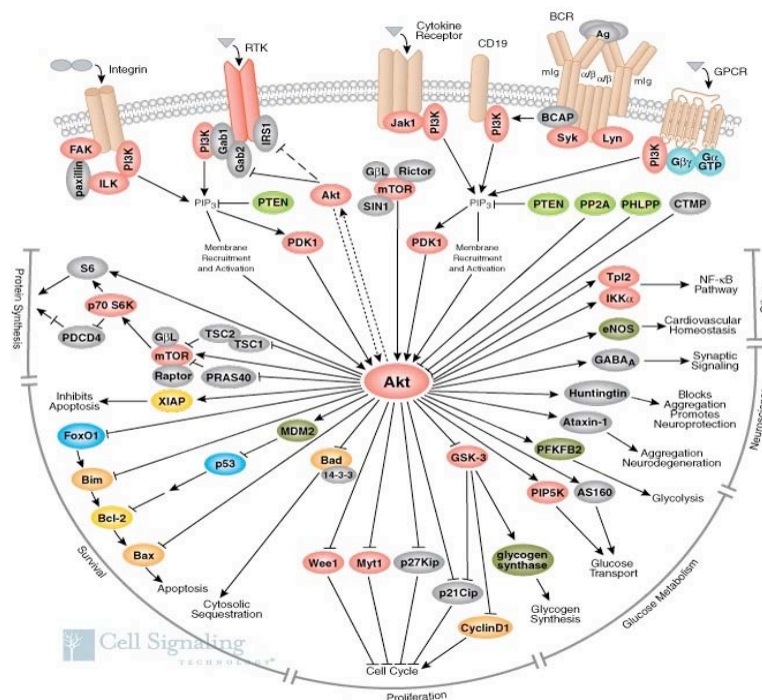


Figure 1.20 : Les voies de régulation de la protéine Akt. La protéine Akt est liée à des voies contrôlant la synthèse d'autres protéines, la survie et la prolifération cellulaire et le métabolisme. Elle constitue un carrefour cellulaire majeur.

http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Akt_PKB.html

- **La protéine PP2A**

Les protéines phosphatases de type 2A (PP2A) sont des Sérine/Thréonine phosphatases. Ces enzymes sont composées de trois sous-unités: 1) une sous-unité structurale (la sous-unité A); 2) une sous-unité catalytique (la sous-unité C); 3) une sous-unité régulatrice (la sous-unité B). Ces enzymes se retrouvent *in vivo* sous la forme d'un dimère (PP2A_D) ou d'un trimère (PP2A_T).

Deux types de modifications peuvent affecter l'activité de PP2A : 1) Des phosphorylations réversibles sur des résidus tyrosines et thréonines 2) Une méthylation carboxy terminale.

Différentes protéines tyrosines kinases peuvent phosphoryler PP2AC *in vitro* (Chen *et al.*, 1992). La présence d'acide okadaïque, un inhibiteur de PP2A, favorise cette réaction suggérant que PP2A pourrait avoir une activité tyrosine phosphatase et se déphosphoryler elle-même. *In vivo*, la phosphorylation induite par des facteurs de croissance sur la tyrosine de la PP2A inactive l'enzyme (Begum *et al.*, 1996;1999). La phosphorylation sur des résidus thréonine affecte non seulement la PP2AC sur des résidus non identifiés, mais aussi les sous unité régulatrices, particulièrement la famille B (Xu *et al.*, 2000).

La méthylation de PP2A a lieu sur sa sous-unité C (De Baere *et al.*, 1999) et se déroule grâce à l'action de l'enzyme protéine phosphatase 2A méthyltransférase, enzyme participant également à la transformation de la SAM en SAH au niveau du cycle de la méthionine.

Il a été confirmé que les cellules pouvaient en partie contrôler la formation et la fonction du complexe PP2A par méthylation et phosphorylation (Wei *et al.*, 2001). La dérégulation de ces modifications a donc de lourdes conséquences pour la cellule et se trouve liée à des pathologies sévères.

Par ailleurs, une activation de PP2A, par l'acide palmitique, conduit à une inhibition de la protéine kinase AMP, participant ainsi à la régulation du métabolisme énergétique cellulaire (Wu *et al.*, 2007).

La protéine PP2A régule les décisions de survie ou de mort *via* la voie Akt, selon le contexte (Andrabi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003). Par ailleurs, la PP2A, non seulement est régulée par méthylation, mais elle régule l'expression d'onco-protéines, telles que Akt et c-

Myc, dans le cas des mélanocytes (Guénin *et al.*, 2008). Pour ce faire, elle empêche la phosphorylation de la protéine Akt (Fig.1.21).

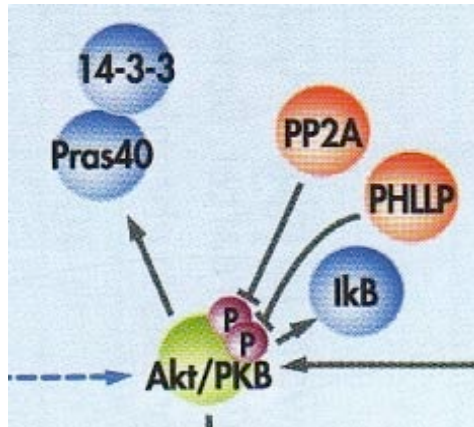


Figure 1.21 : Inhibition d’Akt par la protéine PP2A. La protéine phosphatase 2A (PP2A) empêche la phosphorylation de la protéine Akt et sa transformation en Phospho-Akt, sa forme active. (tirée de figure conçu par Cell Signaling)

La PP2A participe au contrôle des transitions G1/S, G2/M et à la mitose. La progression du cycle cellulaire peut être abolie et les cellules se retrouvent bloquées en phase G1 (Voorhoeve *et al.*, 1999).

Le rôle de la PP2A dans l’initiation de la réplication a été confirmé chez le Xénope. Dans des extraits d’oeufs de Xénope, la réplication de l’ADN est fortement inhibée consécutivement à l’immunodéplétion de PP2A, tandis que les fourches de réplication préalablement établies continuent. Ceci suggère que la PP2A régule spécifiquement l’initialisation de la réplication de l’ADN (Lin *et al.*, 1998).

Elle participe également à la prévention du stress cellulaire au niveau du réticulum endoplasmique via une déphosphorylation de la protéine apoptotique BCL-2 (Lin *et al.*, 2006).

La PP2A pourrait aussi prévenir le développement des cellules leucémiques par inhibition du récepteur de l’interleukine-6 (Mitsubishi *et al.*, 2005).

- **La voie PI3Kinase/AKT**

Les PI3Kinases appartiennent à une famille d'enzymes qui phosphorylent les phosphoinositides des membranes en position 3 du groupe inositol (Wymann *et al.*, 1998). Les PI3Kinases phosphorylent spécifiquement deux substrats : le phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) et le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) générant ainsi du phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (PI3,4-P2) et du phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3) (Franke *et al.*, 1997).

Les phosphatidylinositols PI3,4-P2 et PI3,4,5- P3 sont absents à l'état normal dans les cellules quiescentes. Ils apparaissent suite à un stimulus extracellulaire et sont rapidement dégradés par des phosphatases (Franke *et al.*, 1997), notamment la phosphatase PTEN qui génère du PIP2 à partir du PIP3, et contrebalance ainsi l'activité des PI3Kinases. La PI3Kinase, activée par des facteurs de croissance ou de survie, génère des phosphatidylinositols 3-phosphate qui se fixent au domaine PH de la protéine AKT. La translocation de AKT du cytoplasme vers la membrane plasmique permet son activation. L'activation maximale de AKT se fait par la double phosphorylation des résidus thréonine 308 et sérine 473 par deux kinases différentes appelées PDK (phosphatidyl inositol dependent kinases) (Fig.1.22). AKT sous forme activée phosphoryle de nombreux substrats cytoplasmiques qui ne sont pas encore, à l'heure actuelle, tous identifiés.

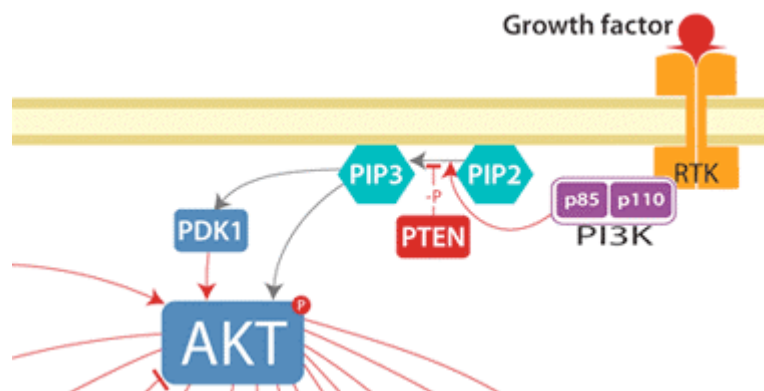


Figure 1.22 : Activation d'Akt par la voie PI3K. La voie PI3K active la phosphorylation de la protéine Akt et sa transformation en Phospho-Akt, sa forme active. <http://fr-fr.invitrogen.com/site/fr/fr/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Analysis/Signaling-Pathways/Akt/Akt-Overview.html>

Une inactivation de PTEN entraîne une phosphorylation constitutive de AKT (Cantley *et al.*, 1999 ; Ramaswamy *et al.*, 1999). Inversement, son activation est bloquée par des inhibiteurs de PI3Kinase comme la wortmannine (IC50 5nM, irréversible) (Yano *et al.*, 1993) et le LY294002 (IC50 1,4µM, réversible) (Vlachos *et al.*, 1994).

L'effet du couple PI3Kinase/AKT peut être remplacé par la voie mTOR/p70 S6Kinase. mTOR (mammalian Target of Rapamycin) appartient à la famille des protéines kinases PIKK (PIKinase-related kinase). mTOR intervient dans une voie de signalisation mitogénique réglant l'initiation de la traduction. mTOR phosphoryle deux substrats majeurs impliqués dans l'initiation de la traduction protéique : 4E-BP1 (eIF-4E binding protein) et p70 S6kinase qui est une sérine/thréonine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la synthèse protéique et la prolifération cellulaire (Chou *et al.*, 1995). Les protéines ainsi synthétisées induisent directement ou indirectement la transition G1/S du cycle cellulaire (Schmelzle *et al.*, 2000).

PI3K semble être impliquée dans la régulation de l'expression du gène *MDR-1* et la résistance des cellules cancéreuses mammaires face à la doxorubicine, médicament anticancéreux cytotoxique (Misra *et al.*, 2005).

Par ailleurs, PTEN contrôle la réponse cellulaire au cetuximab (un anticorps anti-EGFR : epidermal growth factor receptor) *via* la voie PI3K/Akt, dans la lignée cellulaire cancéreuse DC3 de prostate humain (Bouali, Merlin *et al.*, 2009).

- **La voie des MAP Kinases**

Les voies de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) permettent l'engagement rapide d'un programme d'expression génique en réponse à un stimulus. Les voies de signalisation des MAPK, comme celles de p38, de JNK et de ERK 1/2, jouent un rôle important dans le contrôle de la mort cellulaire. L'activation de MAPK/MEK conduit à une activation d'Akt (Fig.1.23) dans divers types cellulaires comme par ex. les cellules du gliome (Robinson *et al.*, 2010). L'inhibition de l'activité MEK peut être établie par deux composants : le U0126 et le PD98059 (IC50 MEK1 4µM, MEK2 50 µM).

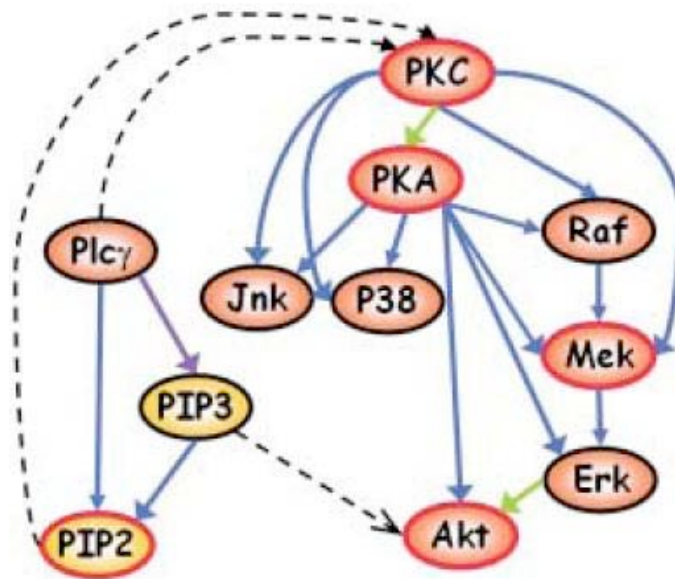


Figure 1.23 : Activation d'Akt par la voie des MAP kinases. La voie MAPK (MEK) active la protéine Akt via Erk. (Sachs *et al.*, 2005)

Les MAPK permettent l'induction de la cycline D1 et l'activation du complexe Cdk4/cycline D1 nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (Lavoie *et al.*, 1996). L'activation de ERK1/2 augmente la synthèse des nucléotides, en régulant l'activité de la CPSII (Carbamoyl Phosphate Synthetase II) (Graves *et al.*, 2000), ainsi que la traduction en activant le facteur de traduction eIF4E (Raught *et al.*, 1999). Enfin, les MAPK augmentent la prolifération cellulaire en activant directement les facteurs de transcription Elk, c-Fos, c-Jun, Ets1/2 et cMyc ou encore le facteur CREB via l'activation de Rsk.

L'activation de la voie des ERK 1/2 induit l'expression de l'ARNm de FLIP (c-FLICE-inhibitory protein ; Kazama *et al.*, 2000). L'induction de FLIP par la voie des ERK 1/2 est liée à l'inhibition de l'apoptose induite par l'activation du récepteur Fas (Yeh *et al.*, 1998) ou par la surexpression de FADD, deux constituants majeurs de la voie des récepteurs de mort cellulaire.

Le rôle anti-apoptotique de la voie des MAPK est associé à l'induction des protéines de survie Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans différents modèles cellulaires et notamment dans les cellules tumorales issues de leucémie (Yu *et al.*, 2002), de mélanome (Zhang *et al.*, 2003) ou de tumeur du pancréas. Ce contrôle des protéines anti-apoptotiques permet d'inhiber la sortie du cytochrome C. Cette induction des protéines Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dépend à la fois de mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels.

L'activation prolongée de la voie des ERK1/2 par des agents génotoxiques induit la protéine proapoptotique p53. Cette induction dépend de la phosphorylation de p53 par les ERK1/2 (Shieh *et al.*, 1997), ce qui a pour effet de stabiliser p53 en empêchant sa liaison à la protéine MDM2 et sa dégradation par le protéasome. L'induction et l'activation de p53 par la voie des ERK1/2 sont associées à la diminution de l'expression de la protéine Bcl-2 (Tang *et al.*, 2002) et avec la répression de son gène (Yeh *et al.*, 2004). Ainsi, l'un des mécanismes d'induction de la mort par la voie des ERK1/2 est de stabiliser p53, ce qui provoque l'activation de la mort mitochondriale par diminution du taux de Bcl-2.

Dans un modèle créé par Andresen *et al.* en 2002, des agonistes qui stimulent la liaison du GTP à Ras et l'activation de la phospholipase D (pour générer de l'acide phosphatidique PA) favorisent la fixation de la cRaf-1-kinase à la membrane, où elle coopère avec Ras, GTP et d'autres composants de voies de régulation. Les complexes Ras-Raf restent liés à la surface des endosomes, où des complexes comportant Ras, cRaf-1, MEK et Erk sont formés. L'activation complète et le couplage de cette cascade nécessiteront ensuite que ce complexe soit endocytosé, un processus qui est également modulé par l'acide phosphatidique.

4.2. La voie Akt, acteur de différentes voies de régulation

Les protéines de la famille AKT sont surexprimées dans des tumeurs de l'ovaire (Yuan *et al.*, 2000), du sein (Sun *et al.*, 2001) ou du pancréas ce qui suggère que les kinases de type AKT pourraient participer à la résistance à l'apoptose fréquemment observée dans les cellules tumorales.

AKT permet également la répression transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques via la phosphorylation de facteurs de transcription séquestrés dans le cytoplasme. AKT est définitivement l'un des plus importants médiateurs de la survie cellulaire. Il peut agir directement sur les effecteurs ou les régulateurs de l'apoptose. De nombreuses données indiquent que l'une des fonctions majeures de AKT est de réguler l'effet de survie des facteurs de croissance et de bloquer l'apoptose (Thornberry *et al.*, 1998).

La partie catalytique C de la protéine PP2A, qui déphosphoryle Akt, est surexprimée dans le cas d'une déficience en cobalamine, affectant ainsi la prolifération des cellules de neuroblastome, telles que NIE115 (Battaglia-Hsu *et al.*, 2009).

Dans le cas du cancer ovarien, une augmentation de la quantité de l'acide lysophosphatidique (LPA) est observée. La carcinogenèse ovarienne est accompagnée par une

surexpression de la cytokine IL-6. Il a été mis en évidence que le LPA engendre une production accrue d'IL-6 *via* la voie de signalisation PI3K/AKT (Chou *et al.*,1995).

Une activation par phosphorylation de la protéine Akt est obtenue grâce à une activation PLD1-dépendante, des complexes mTORC1 et mTORC2 dans le cas des myoblastes en différenciation (Jaafar *et al.*,2011).

PTEN est un suppresseur de tumeur exprimé de manière ubiquitaire et qui joue un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs types de tumeurs solides sporadiques, comme le cancer du sein ou encore les hémopathies malignes. Les phospholipides ont été montrés pour être des composants essentiels dans la transduction du signal et la prolifération cellulaire et PTEN est capable de contrôler leur niveau intracellulaire. Le rôle de PTEN dans la suppression des tumeurs a été liée à la régulation négative de la voie PI3K/Akt par son activité phosphatasique. Alvarez-Breckenridge *et al.*, (2007) ont suggéré une relation possible entre PLD et Akt *via* PTEN.

L'inhibition de la production de l'acide phosphatidique (PA) par l'utilisation de n-Butanol (inhibiteur de la phospholipase D) conduit à une activation de la voie PI3K/Akt, *via* l'activation du métabolite de la sphingomyéline, le sphingosine-1-phosphate (S1P) (Banno *et al.*,2001). Dans une autre étude (Brizuela *et al.*, 2007), cette relation entre les voies PI3K/Akt et MEK/ERK1/2 et la phospholipase D a également été constatée. Cependant, il s'agit ici d'une activation dans le sens contraire. En effet, la phospholipase D est activée par S1P et les deux voies que nous venons de mentionner sont impliquées dans cette activation.

Des lignées de myoblastes C2C12 surexprimant la PLD3 (C2C12/pPLD3) ont été établies et la phosphorylation d'Akt a été étudiée. Les résultats ont montré que le niveau d'Akt phosphorylée (P-Akt) est significativement augmenté dans les cellules C2C12 contrôle lorsque la concentration d'insuline était ajouté aux cellules, alors que le niveau de P-Akt dans les cellules C2C12/pPLD3 n'a pas été modifié par ce traitement. Si le temps de traitement par l'insuline est prolongé, le niveau de P-Akt dans les cellules C2C12/pPLD3 est alors augmenté d'environ 2 fois. Le n-Butanol bloque complètement la phosphorylation d'Akt dans les cellules C2C12, même stimulées par l'insuline. Le niveau de phosphorylation d'Akt dans les cellules C2C12 contrôle est augmenté de façon significative lorsqu'elles sont stimulées par l'acide phosphatidique (PA), alors qu'il n'y a aucun changement dans les cellules C2C12/pPLD3 avec ce même traitement. Lorsque les cellules sont simulées par le PA et l'insuline, le niveau de P-Akt dans les deux lignées, C2C12/pPLD3 et C2C12, a diminué. Ces observations montrent que la surexpression PLD3 peut inhiber la phosphorylation de Akt ou

encore bloquer la transduction du signalisation induite par l'insuline dans les cellules C2C12 (Zhang *et al.*, 2009).

L'implication de la voie Akt dans le phénomène de la résistance multiple a été constatée. L'expression de la protéine P-gp, codée par le gène *MDR-1*, pouvait être modulée grâce à l'inhibition de PI3K, dans le cas de la lignée L1210/VCR de souris, une lignée de cellules leucémiques. Une influence de l'apoptose induite par la vincristine a également été constatée (Barancik *et al.*, 2006).

LAPTM4B (lysosomal protein transmembrane-4-beta) est un gène associé au cancer. Il a en plus été identifié comme étant un inducteur de la MDR dans les cellules cancéreuses *via* une activation de la voie de signalisation PI3K/AKT, par l'interaction du motif PPRP contenu dans l'extrémité N-terminale de LAPTM4B-35 avec la sous-unité de régulation p85 α de PI3K (Li *et al.*, 2010).

Enfin, Lee *et al.*, (2004) suggère aussi une relation entre l'activation de la voie Akt et l'expression du gène *MDR-1*, liaison qui influence le phénomène de chimiorésistance dans le cas des cellules cancéreuses de prostate.

La voie Akt semble jouer un rôle majeur dans la signalisation cellulaire. Parmi les voies qu'elle contrôle est celle de l'acteur de l'inflammation Cox-2. Il a été montré qu'une stimulation d'Akt conduisait à une augmentation de l'expression de Cox-2 (Hsieh *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2005; Sheu *et al.*, 2005). Par ailleurs, la phospholipase D est impliquée dans la diminution de l'expression de Cox-2 (Park *et al.*, 2002) et Cox-2 est souvent associé au cancer (Castle *et al.*, 2001; Naumann *et al.*, 2002). Dans cette dernière partie de la revue bibliographique, seront exposés des éléments de la voie Cox-2 et son interaction avec les acteurs cités ci-dessus.

5. La voie de la cyclo-oxygénase 2 (Cox-2)

5.1. Description de la voie COX

Les cyclo-oxygénases (COX), officiellement connues sous le nom de prostaglandine-endopéroxyde-synthases, sont des enzymes responsables de la formation des médiateurs biologiques importants appelés prostanoïdes, comprenant les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes.

L'inhibition pharmacologique des COX peut procurer un soulagement des symptômes de l'inflammation et de la douleur. Des anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme l'acide acétyl-salicylique (ASA, qui inhibe la production des prostaglandines et des thromboxanes par réaction d'acétylation irréversible des *Cox-2* et *Cox-1*), le nimésulide (qui inhibe *Cox-2* de façon sélective, mais ayant un potentiel hépatotoxique) et le carprofen (qui inhibe la production de *Cox-2*), exercent leurs effets par inhibition de la COX. Une cyclo-oxygénase est constituée d'une isoenzyme COX et d'une peroxydase. Les cyclo-oxygénases existent sous trois formes :

- **Cox-1**: Il s'agit de la forme constitutive, présente dans la plupart des cellules de mammifères. *Cox-1* ne possède pas de boîte TATA (Kraemer *et al.*, 1992). Elle est responsable de la production des thromboxanes, qui sont des hormones vasoconstrictrices. Le gène *Cox-1* est situé sur le chromosome 9 (9q32-9q33.3), il comprend 11 exons et son ARNm est de 2.8 kb (Funk *et al.*, 1991).
- **Cox-2** : Il s'agit de la forme inductible, qui est indétectable dans la plupart des tissus normaux. Elle est induite par des stimuli comme les lipopolysaccharides (Hempel *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 2003), des cytokines (Laporte *et al.*, 2000) et des facteurs de croissance (Fong *et al.*, 2000). *Cox-2* possède sur son promoteur une boîte TATA et plusieurs sites de liaison des facteurs de transcription (SP1, NF-kB, CRE, GATA-1) (Appleby *et al.*, 1994). Elle intervient dans le processus inflammatoire, et est abondante dans les macrophages activés. Il a été montré qu'elle est surexprimée dans divers carcinomes et elle jouerait un rôle central dans la tumorigenèse. Le gène *Cox-2* est situé sur le chromosome 1 (1q25.2-25.3), il comprend 10 exons et son ARNm est de 4.5 kb (Tay *et al.*, 1994).
- **Cox-3** : *Cox-3* est un variant d'épissage de *Cox-1* (Kis *et al.*, 2005).

Les COX sont des protéines d'environ 68 kDa, mais elles peuvent subir des modifications post-traductionnelles, telles que la glycosylation (Otto *et al.*, 1993).

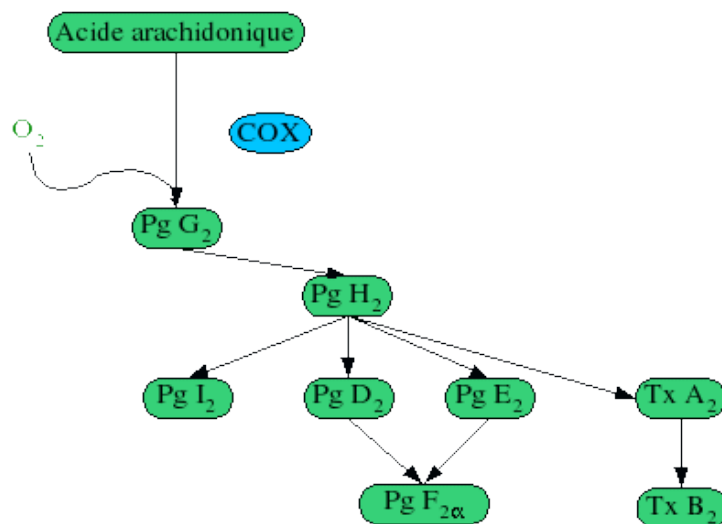


Figure 1.24 : Les produits de l'action des enzymes COX sur l'acide arachidonique. L'acide arachidonique sous l'action des cyclo-oxygénases se transforme en Prostaglandine G2, précurseur des autres prostaglandines, dont PGE2 et des thromboxanes. (Pg : Prostaglandine ; PgI_2 : Prostacycline I_2 Tx : Thromboxanes)
<http://fr.wikipedia.org/wiki/Fichier:Eicosanoides.gif>

COX est l'enzyme qui convertit des acides gras polyinsaturés à 20 carbones issus des phospholipides membranaires, sous l'action de la phospholipase A2, tels que l'acide arachidonique (AA), l'acide γ -linoléïque (GLA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) en prostaglandine G2 (PGG2) (Fig.1.24). Ces acides se transforment en prostaglandine H2 (PGH2), le précurseur des prostanoïdes de la série 2. L'enzyme contient deux sites actifs : un hème, qui a une activité peroxydase, responsable de la réduction de PGG2 à PGH2, et un site de la cyclo-oxygénase, où l'acide arachidonique est transformé en hydroperoxy endopéroxyde prostaglandine G2 (PGG2). La réaction se déroule à travers l'abstraction de l'atome H de l'acide arachidonique par un résidu tyrosine présent dans le site actif de la peroxydase. Deux molécules d'O2 réagissent ensuite avec le radical de l'acide arachidonique, ce qui donne la PGG2. Le rôle de différentes prostaglandines produites par cette voie est résumé dans le tableau 2.

Tableau 2 : Rôle physiologique des différentes prostaglandines.

Prostaglandine	Rôle physiologique
Thromboxane alpha-2 (TxA2)	Vasoconstriction (augmentation de la pression artérielle), agrégation plaquettaire, déclenche coagulation. Antagoniste des prostacyclines.
Prostacycline (Pg I2)	Vasodilatation (diminution de la pression artérielle), inhibition de l'agg. plaquettaire. Antagoniste des thromboxanes.
Prostaglandine D2 (PGD2)	Vasodilatation, inhibition de l'agg. plaquettaire, migration et prolifération lymphocytaire
Prostaglandine E2 (PGE2)	Produite au niveau du rein, de la rate et du cœur. Vasodilatation, inhibition de l'agrégation plaquettaire, migration et prolifération lymphocytaire. Favorise la contraction de l'utérus, inhibe la 5-lipo-oxygénase et diminue la synthèse de leucotriènes. À l'origine de la fièvre.
Prostaglandine F2 (PGF2)	Produite au niveau du rein, de la rate et du cœur. Vasoconstricteur, broncho-constricteur et induit la contraction des muscles lisses (notamment l'utérus)

5.2. La voie Cox-2 au centre de différentes voies de régulation

Plusieurs études indiquent que, bien que la *Cox-2* soit un acteur de l'inflammation, il influence de nombreuses voies métaboliques et de signalisation. Elle constitue, ainsi, un élément de conjonction entre les phénomènes de l'inflammation et le cancer. Certaines études soulignent sa co-régulation avec l'acteur de la chimiorésistance, *MDR-1*. D'autres mettent en évidence une liaison entre *Cox-2* et la voie des phospholipides ou encore la voie Akt. Il a été également constaté qu'une déficience en donneurs de méthyles pourrait être impliquée dans l'inflammation et l'aggravation des colites chez les rats (Chen *et al.*, 2011).

- **Cox-2 impliqué dans la genèse et la progression tumorale**

Dans une étude réalisée par Soslow *et al.* (2000), 90% des tumeurs du poumon (carcinome spinocellulaire et adénocarcinomes), 71% des adénocarcinomes du côlon et 56%

des tumeurs du sein, expriment la *Cox-2* à un niveau modéré ou fort. *Cox-2* est surexprimé dans des cancers thyroïdiens différenciés, des cancers du poumon, du côlon et du sein, alors que la *Cox-1* semble être constitutivement exprimée à de faibles niveaux. Un possible effet paracrine de *Cox-2* a aussi été suggéré par dans l'épithélium non néoplasique adjacent.

De nombreuses études épidémiologiques montrent que le traitement avec des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), inhibiteurs des Cox, réduisent l'incidence et la mortalité de certains types de cancer, notamment dans le cancer gastro-intestinal. Il est maintenant bien établi que la *Cox-2* est surexprimée dans de nombreux cancers, malins et métastatiques, y compris le carcinome hépatocellulaire (HCC). La surexpression de la *Cox-2* chez les patients atteints de HCC est généralement plus élevée dans les HCC bien différenciés. La *Cox-2* est moins exprimée dans les cancers moins différenciés ou dans le foie histologiquement normal, ce qui suggère que la *Cox-2* pourrait être impliquée dans les premières étapes de l'hépatocarcinogenèse (Cervello *et al.*,2006).

La fonction anti-apoptotique de *Cox-2* a été soulignée par plusieurs équipes. Elle régule l'angiogenèse induite par un carcinome du côlon, par deux mécanismes: la *Cox-2* peut moduler la production de facteurs angiogéniques dans les cellules du colon, alors que la *Cox-1* régule l'angiogenèse dans les cellules endothéliales (Tsujii *et al.*,1995). En plus, l'expression de la *Cox-2* inhibe l'apoptose dans les cellules nerveuses PC12 différenciées (McGinty *et al.*,2000). Ceci suggère une implication de la voie Cox dans les phénomènes de mort cellulaire et de prolifération.

Le traitement de souris sauvages 4T1-porteuses de tumeurs, avec l'inhibiteur de *Cox-2*, SC58236, conduit à des ralentissements de la prolifération des tumeurs primaires. De plus, il réduit l'accumulation de MDSC (myeloid-derived suppressor cells). Les auteurs (Sinha *et al.*,2007) montrent en outre que la PGE2 induit MDSC. Ces constats peuvent suggérer une approche thérapeutique possible pour réduire la promotion de cette population de cellules tumorales.

- **Cox-2 impliqué dans le phénomène de la multidrug résistance**

Dans le travail de Patel *et al.* (2002), l'inhibiteur spécifique de *Cox-2*, le NS398, a réussi à bloquer l'augmentation de l'expression et de l'activité de *MDR-1*, induite par la *Cox-2*,

ce qui suggère que les produits de *Cox-2* peuvent être impliqués dans cette réponse. Ces résultats prouvent l'existence d'un lien de causalité entre la *Cox-2* et l'activité P-gp, ce qui aurait des répercussions sur la résistance multiple aux drogues dans les tumeurs où la *Cox-2* est surexprimée.

D'autres études ont aussi examiné les effets du NS-398 sur la prolifération cellulaire et sur l'apoptose dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinome, exprimant ou non *Cox-2*. En outre, l'effet modulateur du NS-398 sur l'expression des gènes de régulation de l'apoptose a aussi été étudié. Le NS-398 inhibe de manière significative la prolifération et induit l'apoptose des cellules HepG2. Les mécanismes impliqués mettent en jeu, mais pas dans toutes les études, une diminution de l'expression de Bcl-2 (Cheng *et al.*,2003 ; Huang *et al.*,2005).

Il a été montré que le transfert du gène *Cox-2* dans les cellules glomérulaires mésangiales de rat conduisait à l'augmentation de l'expression et de l'activité de la protéine *MDR-1*, qui transporte, entre autres, l'adriamycine. La *Cox-2* protège les cellules glomérulaires mésangiales de l'apoptose, médiée par l'adriamycine, en induisant la surexpression du gène *MDR-1* (Miller *et al.*,2006). Cette augmentation serait dose dépendante (Patel *et al.*,2002).

Par ailleurs, le célécoxib, un inhibiteur sélectif de la *Cox-2*, accentue la sensibilité des cellules HepG2 à la doxorubicine, substrat de la P-gp. L'induction de l'expression de *MDR-1* par la PGE2 et sa diminution par le célécoxib, suggère que la sensibilité accrue des cellules HepG2 à la doxorubicine est médiée par la régulation négative de l'expression de *MDR-1*, à travers des mécanismes *Cox-2*-dépendants (Roy *et al.*,2009).

Une autre étude a porté sur l'impact de la *Cox-2* sur la surexpression de *MDR-1*, induite par des médicaments, dans les cellules de leucémie myéloïde aiguë (AML). A nouveau, il a été constaté que la *Cox-2* pourrait être impliquée dans la régulation de l'induction de la surexpression de *MDR-1* par la doxorubicine dans les cellules AML, avec le PGE2 comme étant un facteur de médiation (Puhlmann *et al.*,2005).

Une étude sur des patients de cancer du sein visait à examiner la relation entre l'expression de la *Cox-2* et de *MDR-1*/P-gp. Dans les cas de tumeurs *Cox-2*-positives une

expression plus élevée de *MDR-1/P-gp* a été constatée. Cette cohabitation a été associée à un pronostic défavorable de la maladie (Surowiak *et al.*,2005).

- **Cox-2 en liaison avec la voie des phospholipides**

La régulation de la production de la PGE₂, au cours de l'activation dépendante de PLD et de p38, par les cellules WISH (lignée cellulaire humaine amniotique), a été étudiée. Il a été constaté que dans ces cellules, l'IL-1 bêta pourrait activer la p38 et la PLD par une protéine kinase C et finalement induire l'expression de *Cox-2* (Park *et al.*,2002), proposant ainsi une voie liant la PLD et la *Cox-2*.

Les résultats de l'équipe de Lee *et al.*, (2003) suggèrent que les inhibiteurs de la Phosphatidylcholine-Phospholipase C, de la Phosphatidylcholine-Phospholipase D et de la Protéine Kinase C, ou des activateurs de la propranolol phosphohydrolase, pourraient être utiles dans la gestion de la surproduction de prostaglandines induite par les lypopolysaccharides et le dysfonctionnement vasculaire dans le choc septique.

Dans le cas des cellules musculaires lisses aortiques de rat, L'angiotensine II favorise la production de PGI₂ surtout par une augmentation de *Cox-2* qui est médiée par l'acide phosphatidique, lui-même généré par l'augmentation de l'activité PLD-PKC-dépendante (Frias *et al.*,2003).

- **Cox-2 liée à la voie Akt**

La surexpression de *Cox-2* dans les tumeurs du sein, qui n'expriment pas ER (estrogen receptor α), mais qui expriment le récepteur HER2, est associée à l'activation d'Akt. Cette co-régulation de *Cox-2* et d'Akt serait un marqueur de mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer du sein. Les résultats suggèrent une corrélation entre ces deux acteurs, qui pourrait aussi être utilisée pour améliorer le traitement (Glynn *et al.*,2010).

Dans le cancer de l'endomètre humain, le quatrième cancer le plus fréquent chez les femmes, PTEN est fréquemment muté. En présence d'une protéine mutée PTEN, le niveau de phosphorylation d'Akt est augmenté conduisant à l'activation de cette voie de survie. Dans

l'étude de St-Germain *et al.* (2004), les auteurs ont voulu déterminer l'implication de la voie PI3K/Akt dans la régulation de l'expression de *Cox-2* et la synthèse de la PGE2. Trois lignées différentes de cellules cancéreuses d'endomètre connues pour avoir un type sauvage PTEN (HEC 1-A) ou une protéine mutée inactive PTEN (RL 95-2 et Ishikawa) ont été utilisées dans cette étude. La conclusion était que la voie de survie PI3K/Akt est impliquée dans la régulation de la *Cox-2* et dans la synthèse de la PGE2 dans les cellules humaines de cancer de l'endomètre.

Le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) est surexprimé en réponse à des lésions pulmonaires et a été impliqué dans la réparation des tissus grâce à ses activités anti-apoptotiques et prolifératives. Il a été constaté que le HGF induit la transcription du gène *Cox2* dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (HBEpC). Dans l'étude de Lee *et al.* (2008), il a été révélé que le HGF augmentait le taux d'ARNm de *Cox2* d'une manière Akt-dépendante.

Objectif de l'étude

Objectif de l'étude

Le cycle de la méthionine se trouve au centre d'un carrefour de grande importance pour la cellule. Celui-ci est essentiel pour la survie et la régulation des différents mécanismes cellulaires. Il fournit à la cellule les groupements méthyles participant à la méthylation des différents composés, tels que les lipides, les protéines et l'ADN. De ce fait, le cycle de la méthionine participe de manière significative à la régulation du métabolisme cellulaire, à la modification du génome et à la signalisation cellulaire de manière générale (Fig. 2.1).

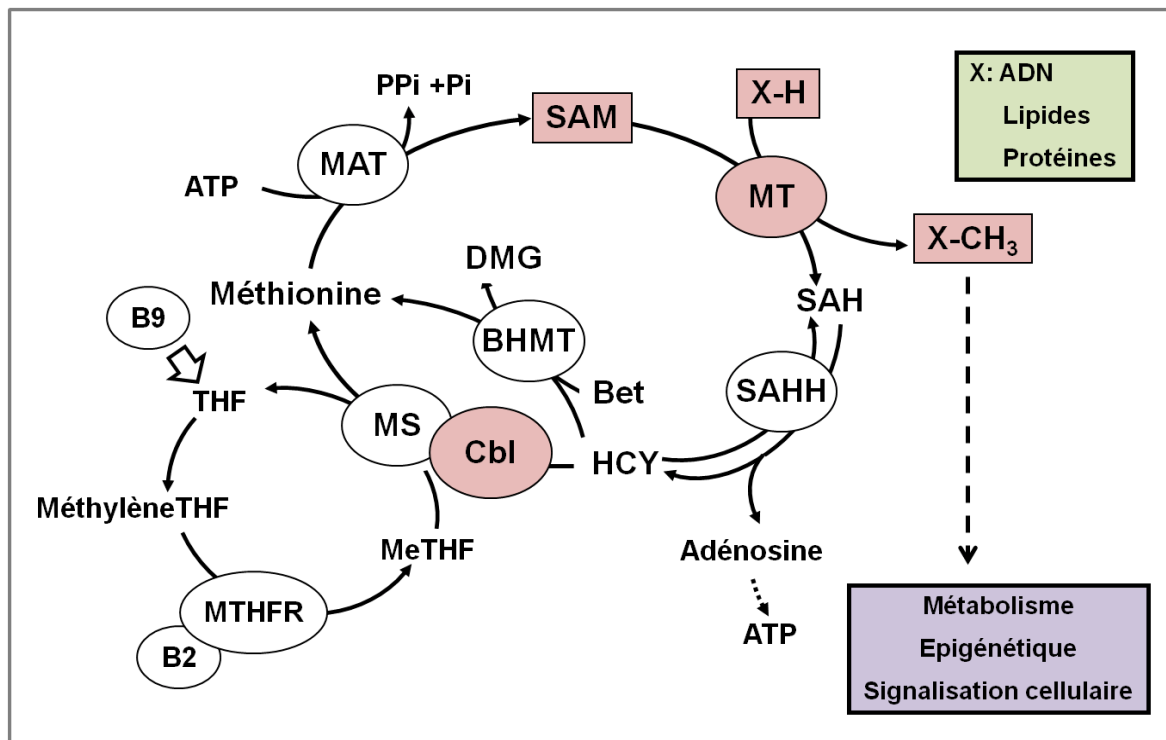


Figure 2.1 : Liaison des réactions de méthylation, générées par le cycle de la méthionine, avec les différentes voies de régulation cellulaire. La méthionine est métabolisée par la méthionine adenosyl-transférase (MAT) en S-adenosylméthionine (SAM), qui est le principal donneur intracellulaire des groupements méthyle. Les méthyletransférases (MT) peuvent

utiliser la SAM afin de méthyler un accepteur de groupements méthyles (X-H) pour former X-CH₃ (substrat méthylé). La cobalamine (Cbl), qui est le cofacteur de la MS, est un déterminant limitant de l'activité du cycle de la méthionine et ainsi des réactions de méthylation intracellulaires. L'ADN, les lipides et les protéines sont des substrats, qui peuvent être méthylés grâce aux groupements méthyle, fournis par le cycle de la méthionine. Les réactions de méthylation peuvent être responsables de la régulation du métabolisme cellulaire, de la modification du génome et éventuellement de la signalisation cellulaire.

D'un autre côté, la chimiothérapie reste l'un des piliers majeurs dans la lutte contre la prolifération des tumeurs. Toutefois, si certains organes démontrent une résistance intrinsèque aux agents anticancéreux, d'autres acquièrent une résistance en réponse même à la chimiothérapie. Une telle chimiorésistance constitue un obstacle de taille à la thérapie. De nombreuses études visent à trouver un moyen de limiter cette chimiorésistance.

Le principal acteur de la chimiorésistance est le gène *MDR-1*. La majorité des études concernant ce gène, se focalisent sur la constatation de sa surexpression dans les différents cas de cancers. Beaucoup d'études se sont intéressées à l'inhibition de la P-gp par des inhibiteurs, comme le vérapamil (Yu *et al.*, 2000). L'utilisation d'agents, synthétisés chimiquement pour améliorer la chimiothérapie, s'est souvent avérée une stratégie limitée, à cause de l'hépatotoxicité provoquée par ces agents. Certaines autres études se basent sur l'inhibition de l'expression du gène *MDR-1* par des oligonucléotides antisens, des siRNA ou des facteurs transcriptionnels artificiels (Xu *et al.*, 2004). Ces stratégies, bien qu'elles ciblent directement le gène, sont techniquement complexes, sont loin d'avoir une très bonne efficacité, sont très onéreuses et difficilement applicables au quotidien d'un patient.

Dans notre équipe, il a été démontré pour la première fois qu'un composé physiologique, la cobalamine, diminuait l'expression du gène *MDR-1*, dans la lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain, HepG2. Cette répression du gène est accompagnée par une augmentation de la cytotoxicité face à la vinblastine. Cet effet sur l'expression du gène *MDR-1* ne passerait pas par une méthylation de son promoteur (Marguerite *et al.*, 2007).

Comme la cobalamine est le cofacteur de la méthionine synthase, il nous semblait évident de penser que cette répression de *MDR-1* étaient liées au cycle de la méthionine.

Objectif

La question cruciale, qui se posait alors était de savoir **comment** la cobalamine agissait sur l'expression du gène *MDR-1*.

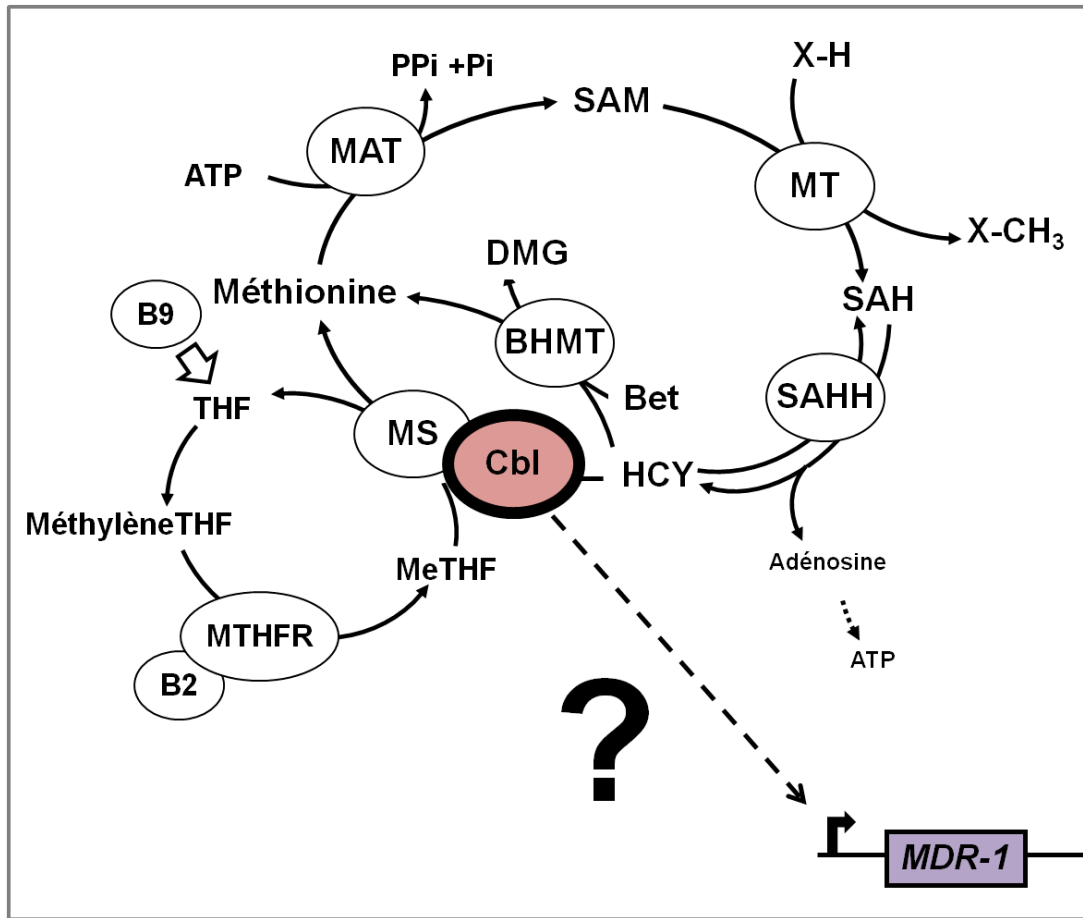


Figure 2.2 : Objectif de l'étude. Observation princeps : la Cbl induit une répression du gène *MDR-1* dans les cellules HepG2 (Marguerite et al., 2007). Question posée : par quels mécanismes ?

C'est à cette question (Fig. 2.2) que j'ai voulu répondre pendant mon travail de thèse. Ce travail fondamental revêt tout d'abord un intérêt scientifique. Il est très important de pouvoir expliquer les mécanismes impliqués dans la voie de régulation de *MDR-1* par la cobalamine. Ce sont des voies inconnues à ce jour. La conséquence de ce travail, initialement fondamental, serait de montrer quelles voies modulent l'expression de *MDR-1* pour éventuellement proposer un moyen de les manipuler. Ainsi, pouvoir agir sur l'expression de ce gène pourrait être un moyen d'éviter ou de limiter le phénomène de chimiorésistance et peut être d'améliorer la chimiothérapie.

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

Le modèle choisi pour effectuer ce travail est la lignée HepG2 (N° ATCC® : HB-8065) (Fig.3.1). Il s'agit d'une lignée cellulaire provenant d'un hépatocarcinome humain. Les cellules sont cultivées (Fiche Technique n° 1, Annexe I) dans du milieu DMEM, jusqu'à une confluence d'environ 80%. Elles sont ensuite incubées avec les agents d'intérêt utilisés dans ce travail, permettant de manipuler le cycle de la méthionine (tels que la cobalamine) ou les différentes voies hypothétiques de régulation du gène *MDR-1* (principalement des inhibiteurs de ces voies). Ceci nous permettra de valider ou d'infirmer nos hypothèses.

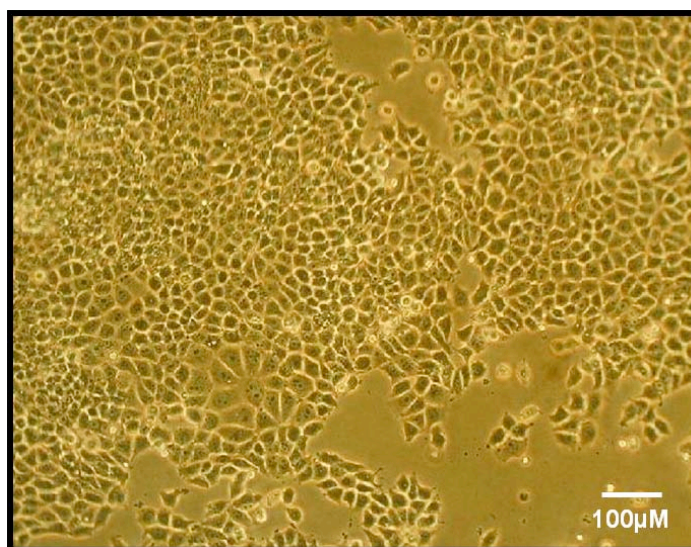


Figure 3.1 : La lignée cellulaire HepG2, observée au microscope optique, à confluence 65%.

Les doses des produits utilisés sont choisies après avoir effectué, pour chacun d'entre eux, une courbe de « dose-réponse ». Une dose pharmacologique, permettant d'avoir un effet sur le métabolisme cellulaire, sans qu'elle soit cytotoxique, a été choisie.

Cette lignée cellulaire présente une particularité très intéressante pour ce travail. Majoritairement, dans le cycle de la méthionine, l'homocystéine est transformée en

méthionine grâce à l'enzyme méthionine synthase dont le cofacteur est la cobalamine/vitamine B12. Il existe pourtant une autre voie, minoritaire, où l'enzyme BHMT est responsable de la transformation de l'homocystéine en méthionine. Il a été montré que, dans le cas de la lignée HepG2, la protéine et l'activité de l'enzyme BHMT sont absentes (Pellanda *et al.*, 2012). Ainsi, dans le cycle de la méthionine, la production de la méthionine est assurée uniquement par la méthionine synthase.

Afin de pouvoir décrire les voies reliant la cobalamine et le gène *MDR-1*, nous avons combiné des données de la littérature, ainsi que des résultats d'expériences préliminaires, réalisées au sein de l'équipe. Ceci nous a permis d'émettre des hypothèses sur trois acteurs différents, qui pourraient occuper une place importante dans le chemin étudié. Ces trois acteurs sont l'enzyme phospholipase D (PLD), la protéine Akt et le gène *Cox-2*.

Nous essayons, tout au long de cette étude, de mettre en évidence les points suivants :

- L'impact qu'a la cobalamine et éventuellement le cycle de la méthionine, sur chacun de ces acteurs.

Pour ceci nous incubons les cellules HepG2 en présence ou absence de cobalamine, associée ou pas à des métabolites (tels que la SAM) ou des inhibiteurs (tels que le bézafibrate) du cycle de la méthionine aux concentrations indiquées dans le texte. Le temps d'incubation est de 24 heures. Nous mesurons l'impact de ces composés sur l'activité de la PLD, sur l'expression des protéines PP2A, Me-PP2A, Akt et P-Akt, par immunoprécipitation, et sur l'expression des gènes *MDR-1* et *Cox-2*, par qRT-PCR .

- La relation qu'ont ces acteurs avec l'expression du gène *MDR-1*.

Pour l'évaluation de cette partie, nous avons utilisé des inhibiteurs et/ou des activateurs de chacun de ces acteurs et ensuite nous avons étudié leur impact sur l'expression du gène *MDR-1* (par qRT-PCR), sur l'expression de la protéine codée par ce gène, la P-gp (par immunoprécipitation) et/ou sur la viabilité cellulaire face à l'agent cytotoxique, la vinblastine (par la méthode de viabilité/toxicité cellulaire MTT).

Les molécules utilisées sont :

a. Le n-Butanol et l'acide oléique, inhibiteur et activateur, respectivement, de la PLD.

b.1. L'acide okadaïque et l'acide palmitique, inhibiteur et activateur, respectivement, de la PP2A, protéine qui inhibe la phosphorylation d'Akt.

b.2. Les inhibiteurs de la voie MEK ou MAPK, U0126 et PD98059. Cette voie active celle d'Akt.

b.3. Les inhibiteurs de la voie PI3K, LY294002 et Wortmannine. Cette voie active aussi celle d'Akt.

c. Les inhibiteurs de Cox-2, le nimésulide, l'acide acétylsalicylique et le carprofen, ainsi que le produit de la protéine Cox-2, la prostaglandine E2.

- Dans quel ordre, ces trois acteurs interviennent dans la voie allant de la cobalamine au gène *MDR-1* et quel est l'influence de chacun de ces acteurs sur celui que nous avons situé en son aval.

Ainsi, nous utilisons à nouveau les inhibiteurs/activateurs décrits au paragraphe précédent. Nous étudions l'effet qu'ont ceux de la PLD sur l'expression de la protéine Akt et l'expression du gène Cox-2, ainsi que l'influence de l'expression du gène Cox-2 par les effecteurs de la voie Akt. Nous avons placé la PLD, l'Akt et le Cox-2 dans l'ordre décrit, en nous basant sur les données de la littérature et nos expériences préliminaires. La justification de cette hypothèse est expliquée dans la partie introductive de ce travail.

Il s'agit d'une tradition du laboratoire de détailler les différentes méthodes utilisées sous forme des fiches, que j'inclus en **annexe I**. Cette habitude constitue le moyen de fournir, à la génération suivante des collaborateurs du laboratoire, tous les détails des expériences réalisées dans chaque étude. Nous pouvons, ainsi, minimiser les erreurs de manipulation lors des expériences, faire gagner du temps et du matériel et assurer la reproductibilité des résultats.

Dans les **fiches techniques de n°1 au n°5**, nous retrouvons les méthodes utilisées en culture cellulaire. Celles-ci concernent le maintien des lignées cellulaires en culture, mais aussi le repiquage et leur stockage.

- ***Lignée cellulaire et conditions de culture (Fiche Technique n° 1, Annexe I)***

La lignée cellulaire HepG2 a été procurée par ATCC® (numéro HB-8065). Elle est issue d'un carcinome hépatique humain. Les cellules ont les caractéristiques des cellules

épithéliales et elles se développent en adhérant sur leur support. Les cellules sont décongelées comme cela est décrit plus loin (Fiche Technique n° 5, Annexe I). Elles sont mises en culture dans des flacons de culture Falcon. Le milieu utilisé pour cette culture est le DMEM 4,5 g/L de glucose (voir composition Fiche Technique n° 1, Annexe I). Il est supplémenté avec 10% de SVF et 1% de mélange d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine). Les cellules sont incubées avec les différents agents testés quand elles atteignent 80% de confluence. Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine. Quand elles arrivent à forte confluence, elles peuvent former des multicouches. Elles ne peuvent pas survivre très longtemps dans cet état, même si le milieu est renouvelé, et elles se décollent. Il est donc nécessaire de les repiquer une fois par semaine (Fiche Technique n° 3, Annexe I). Un test de mycoplasme est réalisé fréquemment afin de s'assurer de l'absence de contaminations.

- ***Décomplémentation du Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Fiche Technique n° 2, Annexe I)***

Le SVF est fourni en flacon de 500 mL congelé à -20°C et conservé ainsi jusqu'à sa décomplémentation. Pour le décomplémenter, nous plaçons le flacon au bain Marie pendant 30 minutes à 56°C. Il est possible par la suite de réaliser (facultatif) une centrifugation, à température ambiante, pendant 5 minutes à 1100 rpm, afin d'éliminer les éventuelles protéines dénaturées qui ont précipité. Le SVF doit être aliquoté en flacon de 50 mL de façon stérile. Les aliquots sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation. Le flacon de SVF vide est éliminé dans la poubelle à incinérer.

- ***Trypsination et Repiquage des cellules (Fiche Technique n° 3, Annexe I)***

Le milieu de culture cellulaire est éliminé et le tapis cellulaire rincé deux fois avec du PBS 1x stérile. Les cellules sont incubées avec un fin film de trypsine à 37°C pendant 5 minutes. Nous devons vérifier au microscope que les cellules s'arrondissent et qu'elles se décollent. Par la suite nous devons inhiber l'action de la trypsine par ajout de SVF. Les cellules sont décollées avec l'aide de la pipette. La suspension cellulaire est transférée dans un tube à centrifuger. Les cellules sont centrifugées à 1000 rpm pendant 5 min. Par la suite, nous devons éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 5 mL de milieu de culture

correspondant au milieu dans lequel les cellules serontensemencées. Nous pouvons compter les cellules et ensemencer à $1,5.10^4$ cellule par cm^2 .

- ***Congélation des cellules (Fiche Technique n° 4, Annexe I)***

Dans du DMSO (9% DMSO, 36%SVF, 55% DMEM) :

Les cellules adhérentes contenues dans une flasque ou une boîte de Pétri sont trypsinées (une fine pellicule de trypsine couvre les cellules et agit pendant 5 minutes à 37°C). Une centrifugation de 5 minutes à température ambiante à 1100 rpm permet d'éliminer toute trace de trypsine. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 400 μL de milieu de culture utilisé pour ce type cellulaire. A cette suspension est ajouté goutte à goutte un mélange de 600 μL (500 μL de SVF et 100 μL de diméthylsulfoxyde (DMSO)). Le mélange final est ensuite déposé dans un cryotube de 1 mL. Le cryotube est par la suite disposé dans une boîte de congélation permettant une diminution de la température de $1^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ jusqu'à -80°C . Plus de 24 heures après le cryotube est placé dans l'azote liquide (-196°C) et répertorié au cahier correspondant.

Dans du glycérol (10% glycérol, 30% SVF, 60% DMEM) :

Une solution stérile de glycérol est préparée à l'autoclave. Le milieu de congélation contient 1 mL de glycérol, 2 mL de SVF, 2 mL de milieu de culture. Nous préparons une suspension cellulaire de densité 4.10^6 cellules/mL dans le milieu de culture et nous déposons 0,5 mL de cette suspension dans des cryotubes, soit 2.10^6 cellules /tube. 0,5 mL de milieu de congélation sont ajoutés en agitant. Les cryotubes sont placés dans une boîte de congélation pendant 24h et à -80°C . Par la suite, les tubes doivent être transférés dans l'azote liquide.

- ***Décongélation des cellules (Fiche Technique n° 5, Annexe I)***

Un cryotube de 1 mL, contenant des cellules stockées dans l'azote liquide, est rapidement décongelé par friction entre les mains. Après stérilisation externe du cryotube à l'éthanol 70% (v/v), la suspension cellulaire est diluée dans 12 mL de milieu de culture adapté à ce type cellulaire. L'ensemble est agité délicatement, puis centrifugé, à température ambiante, pendant 5 min à 1100 rpm. Le surnageant est éliminé afin d'éloigner le DMSO cytotoxique. Les cellules sont mises en suspension dans du milieu de culture adapté, qui sera

contenu dans une flasque ou boîte de Pétri, placée dans l'incubateur de culture cellulaire, à température et concentrations en CO₂ contrôlées.

La méthode de viabilité/toxicité cellulaire, par la réduction mitochondriale du MTT, est décrite en **fiche technique n° 6**.

- ***La méthode MTT (Fiche Technique n° 6, Annexe I)***

Le MTT est un sel de tétrazolium soluble dans l'eau formant une solution jaunâtre quand il est préparé dans du milieu de culture DMEM. Il est converti dans les cellules en formazan par clivage du cycle tétrazolium grâce à l'action des déshydrogénases mitochondriales. Le formazan présente une couleur pourpre. Il est insoluble dans l'eau, mais soluble dans le DMSO.

Les cellules HepG2 sontensemencées sur des plaques de 96 puits à une densité de 3.10⁵ cellules par puit. Quand la confluence cellulaire atteint le 80 %, elles sont incubées, à concentration constante, aux différents agents que nous souhaitons tester, pendant 24 heures. Au bout de 24 heures le milieu est renouvelé, comprenant l'agent d'intérêt, ainsi que, cette fois-ci des concentrations croissantes de vinblastine (le cytotoxique à tester) par colonne des puits. La colonne ne comprenant pas de vinblastine correspond au 100 % de viabilité cellulaire pour les conditions testées. La colonne des puits où les cellules sont incubées à l'azide de sodium correspond au 0 % de viabilité cellulaire. Les cellules sont incubées ainsi pendant 48 heures, afin de permettre l'action de la vinblastine. Au bout de 48 heures, le milieu est éliminé et les cellules sont incubées à une solution contenant 5mg de MTT / mL de PBS dilués au 50^{ème} dans du DMEM, pendant 1 à 2 heures à 37°C. Le milieu est enlevé délicatement quand un tapis bleu/violet apparaît. 150 µL de DMSO par puit sont par la suite ajoutés, afin de dissoudre les cristaux de formazan. La lecture des densités optiques est réalisée avec un lecteur des plaques à 570 nm. La courbe de viabilité cellulaire est calculée à partir des valeurs obtenus.

Dans les **fiches techniques de n° 7 au n° 13**, elles sont décrites les méthodes d'extraction des protéines (cytosoliques et membranaires), du dosage des protéines totales dans un échantillon, ainsi que la détection et étude de l'expression d'une protéine précise par la méthode d'immunoprécipitation (Western blot).

N.B. Après révélation des protéines immunoprécipitées, les bandes obtenues ont été analysées par le logiciel ImageJ 1.43u. Pour chaque condition, le ratio (Intensité de la bande de la protéine d'intérêt/ Intensité de la bande de la protéine témoin) a été calculé et représenté sous forme d'histogramme en unités arbitraires. Au ratio de la condition témoin (cellules non traitées) a été attribuée la valeur 1, par rapport à laquelle les valeurs des ratios des autres conditions sont comparées. En tant que protéines témoin, ont été choisies des protéines, dont l'expression n'est pas modifiée selon les différentes conditions d'incubation cellulaire. Dans le cas de l'étude d'une protéine, qui peut être phosphorylée, la protéine témoin choisie sera la forme non-phosphorylée de cette protéine d'intérêt.

- ***Extraction des protéines cytosoliques (Fiche Technique n° 7, Annexe I)***

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri jusqu'à 80 % de confluence et ensuite en présence d'agents d'intérêt pendant 24 heures. L'extraction des protéines doit être effectuée sur glace. Le tapis cellulaire est lavé 3 fois au PBS_{1x} froid. Le PBS doit être aspiré soigneusement après le dernier rinçage pour bien assécher la surface cellulaire (à cette étape il y a la possibilité de congeler les boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction). Par la suite, nous rajoutons 150 à 200 µL de tampon RIPA froid et nous devons remuer la boîte pour l'étaler sur toute la surface. Les boîtes sont incubées 10 minutes sur glace, puis secouées dans tous les sens pour bien décoller le tapis cellulaire. L'homogénéisation du contenu cellulaire de la boîte est réalisée par 10-20 inspirations-expirations avec une seringue de 1 mL. Le lysat est récupéré dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Afin de récupérer l'extrait protéique final, nous devons effectuer 2 cycles de congélation-décongélation (Azote liquide-bain marie à 37°C) et puis centrifuger pendant 30 minutes à 12000 g à 4°C. Le surnageant récupéré est stocké à -80°C ou utilisé pour un dosage des protéines.

- ***Extraction des protéines membranaires (Fiche Technique n° 8, Annexe I)***

La procédure ressemble à celle utilisée lors de l'extraction des protéines cytosoliques. Les différences principales sont 1) l'utilisation d'un tampon de lyse et d'un tampon de sucrose (décrit dans la *Fiche Technique n° 8, Annexe I*) et 2) La lyse des cellules est effectuée en utilisant l'appareil d'homogénéisation cellulaire Dounce. Le contrôle de la lyse cellulaire est effectué en utilisant le bleu trypan pour une observation au microscope. Un pourcentage de 80 % de lyse est idéal.

- ***Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA) (Fiche Technique n° 9, Annexe I)***

Les protéines extraites sont dosées avec le kit BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninic acid protein assay kit). La méthode BCA, plus tolérante que celle de Lowry ou de Bradford vis-à-vis de nombreux réactifs utilisés pour extraire les protéines, est compatible avec les détergents. Elle est basée sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin et la capacité de l'acide bicinchoninique à former un complexe coloré avec les ions cuivreux. La structure macromoléculaire de la protéine, le nombre de liaisons peptidiques, et la présence des quatre acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine) sont responsables de la réduction des ions cuivriques Cu^{3+} . Le produit de la réaction, coloré en pourpre, est formé par l'interaction de deux molécules de BCA avec un ion Cu^{2+} . Le complexe est hydrosoluble et présente une forte absorbance à 562 nm permettant le dosage colorimétrique des protéines.

- ***Immunodétection des protéines sur membrane (Western-Blot) (Fiches Techniques de n° 10 au n° 13, Annexe I)***

Le western Blot est une méthode de détection des protéines à partir d'un extrait cellulaire ou tissulaire purifiés, comportant 3 étapes : une séparation des protéines en gel (SDS-PAGE), un transfert des protéines sur un support solide ou réplique et une détection immunologique couplé à une révélation. L'électrophorèse analytique des protéines permet leur séparation au travers d'un gel de polyacrylamide. Le PH élevé du gel assure une charge négative à toutes les protéines qui peuvent alors migrer uniformément sous un champ électrostatique. La séparation des protéines qui s'effectue selon leurs poids moléculaires grâce à la présence de SDS qui dénature les structures tertiaires et quaternaires des polypeptides. Une réplique du gel est réalisée après transfert des protéines sur une membrane de PVDF, grâce à l'application d'un champ électrostatique. Enfin la détection des protéines est réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps ayant la capacité de former des interactions protéines-protéines spécifiques. Les anticorps peuvent être couplés à un système permettant leur révélation par fluorescence, radioactivité ou par réaction enzymatique.

L'extraction des ARN, le test de qualité et leur quantification, leur transcription par RT-PCR et l'obtention d'ADN par PCR et enfin l'analyse de qualité de cet ADN, sont décrits dans les **fiches techniques de n° 14 au n° 19.**

N.B. Les résultats de la qRT-PCR sont calculés par la méthode des $\Delta\Delta CT$. Dans un premier temps la valeur ΔCT pour chaque échantillon ou pour le calibrateur a été déterminée, par la formule suivante :

$$\Delta CT (\text{échantillon}) = CT \text{ gène cible} - CT \text{ gène de référence}$$

$$\Delta CT (\text{calibrateur}) = CT \text{ gène cible} - CT \text{ gène de référence}$$

Ensuite la valeur $\Delta\Delta CT$ a été calculée pour chaque échantillon par la formule suivante :

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{échantillon}) - \Delta CT (\text{calibrateur})$$

C'est cette dernière valeur qui est rapportée dans les histogrammes présentés. Nous le nomme ΔCT (Gène d'intérêt/Gène de référence). Le gène de référence et le calibrateur permettent de comparer les conditions, ainsi que les expériences entre elles. Le gène de référence a été choisi par rapport à sa stabilité d'expression indépendamment des conditions d'incubation des cellules.

- ***Étude de l'expression génique (Fiches Techniques de n° 14 au n° 19, Annexe I)***

L'étude de l'expression des gènes est réalisée par RT-PCR (*Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction*) afin de détecter l'accumulation des ARNm. Le principe de cette technique consiste à extraire les ARN totaux des cellules à analyser et de les copier *in vitro* en ADNc (ADN complémentaire) simple brin grâce à l'action de la transcriptase inverse, étape obligatoire avant la polymérisation en chaîne qui met en œuvre une ADN polymérase. Les molécules d'ADNc obtenues servent de matrice pour cette réaction et un fragment de l'ADNc cible est multiplié en utilisant un couple d'amorces spécifiques correspondant à la séquence de l'ARN d'intérêt. Le principe de l'amplification *in vitro* repose sur la répétition de trois processus : (i) la dénaturation des 2 brins d'ADN à 94°C, (ii) l'hybridation d'oligonucléotides (amorces) complémentaires d'une séquence cible d'ADN monocaténaire à une température d'hybridation spécifique et (iii) la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (Taq DNA polymerase) à partir des oligonucléotides, réalisée à la température optimale de 72°C. Les fragments obtenus après les cycles de PCR sont alors suffisamment nombreux pour être visualisés sur gel d'agarose après électrophorèse. Les amplicons sont visualisés sous UV et leur taille (en paire de base) est estimée par comparaison avec des fragments étalons, le gel est scanné avec un système d'acquisition et d'analyse d'image en

préservant la linéarité du rapport quantité d'ADN / signal et l'intensité du signal de chaque bande est finalement mesurée.

Ainsi la mesure de l'expression des ARNm, est basée sur l'utilisation d'un agent intercalant fluorescent appelé SYBR Green dont la fluorescence sera mesurée par le iCycler™, Biorad pendant chaque cycle à l'étape d'amplification. Cette technique nécessite l'extraction des ARN de qualité c'est-à-dire avec un bon rapport 260/280 nm entre 1,8 et 2 et une absence totale de contamination par l'ADN. Cette étape tout comme l'étape de transcription inverse et l'étape de PCR en temps réel nécessite une très grande rigueur pour s'assurer de la meilleure reproductibilité et pour permettre la comparaison entre les différents échantillons à l'aide d'un calibrateur. L'analyse des résultats est réalisée comme indiquée plus haut.

La méthode de mesure de la concentration des métabolites SAM, SAH à partir d'homogénats cellulaires par HPLC, est incluse en **fiche technique n° 20.**

- ***Chromatographie liquide à haute performance (Fiche Technique n° 20, Annexe I)***

L'échantillon (50 µL), obtenu comme décrit dans la *Fiche Technique n° 7, Annexe I*, est injecté dans un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) constitué d'une pompe à haute pression (TSP, P1000XR), un injecteur d'échantillon automatisé (TSP, AS100), une colonne contenant une résine de silice greffée en groupements octadécyls (Cl 8, Lichrospher OD2, 5 µm, 250 x 4 mm) maintenu à 30°C à un débit constant de 0,75 mL/min (générant une pression d'environ 130 bar). Le gradient continu appliqué par la pompe consiste en un mélange de tampon A (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,2, Ac. heptanesulfonique 10 mM, acétonitrile 10%) et de tampon B (phosphate de sodium 50 mM, pH 3,2, Ac. heptanesulfonique 10 mM, acétonitrile 50%). Le signal est mesuré par absorbance des groupements adényles de la SAM et de la SAH (métabolites mesurés) à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 254 nm (TSP, UV2000 - ultraviolets). Les quantités de SAM et SAH sont calculées à partir d'une gamme de standards et les résultats sont exprimés en nmol/g de protéine.

L'évaluation de l'activité PLD est incluse en **fiche technique n° 21.**

- **Dosage de l'activité PLD (Fiche Technique n° 21, Annexe I)**

Le tapis cellulaire est récupéré dans du PBS_{1x} et la suspension cellulaire est soumise aux ultrasons pendant quelques secondes. Un dosage des protéines est effectué selon la méthode décrite sur la *Fiche Technique n° 9, Annexe I*. 50 µg de protéines totales sont utilisés pour le dosage de l'activité de la phospholipase. Le mélange réactionnel final est de 220 µL et il contient 0,1 mM BODIPY-phosphatidylcholine (B-PC), substrat fluorescent, 150 mM NaCl, 0,2 mM octylglycoside, 44 mM de tampon phosphate [pH 7,5], 80 mM de bêta-glycérophosphate, 10 mM d'EGTA (Éthylène glycol tétra-acétique), dithiothréitol 5 mM et 1% de n-But (135 mM). Ce mélange réactionnel est incubé avec l'extrait protéique à 37 ° C pendant 60 min. Les produits ont été ensuite séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant du chloroforme / méthanol / eau / acide acétique (44:44:10:2, v / v / v / v) et a révélé à la lumière UV.

L'extraction des phospholipides, leur dosage et leur séparation par chromatographie sur couche mince sont décrits dans la **fiche technique n° 22**.

- **Dosage des phospholipides (Fiche Technique n° 22, Annexe I)**

L'extrait cellulaire, dont nous souhaitons mesurer le contenu en phospholipides, est mélangé avec 2,5 ml de méthanol et soniqué pendant 1min. Un volume de 1,25 ml de chloroforme est alors ajouté à chaque échantillon, avant de répéter la sonication. Un mélange de 1,25 ml de chloroforme et 1,25 ml d'eau est ensuite ajouté. Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 2500 rpm

Deux phases sont obtenues :

- La phase supérieure contient la phase aqueuse avec les acides nucléiques et les protéines et
- la phase inférieure le chloroforme et des lipides

La phase organique est prélevée et évaporée sous vide. Les lipides extraits sont ensuite repris avec 25 µl de chloroforme. La quantité contenant 30 µg de lipides est déposée sur une plaque de chromatographie en couche mince (Bligh et Dyer, 1959) en silice. La migration dans la première dimension s'effectue avec une phase constituée de chloroforme, du méthanol, de l'ammoniaque et de l'eau (30/13,5/1/1,5 ; v/v/v/v), pendant 30 min. La migration dans la deuxième dimension s'effectue dans une phase constituée de chloroforme,

du méthanol, d'acétone, d'acide acétique et d'eau (15/20/5/5/2,5 ; v/v/v/v/v). Une fois les plaques sèches, les phospholipides sont révélés par coloration à la Rhodamine B. Ils sont grattés et utilisés pour mesurer la composition en phosphate avec la méthode de Chen *et al.* (1956) ; (Rouser *et al.* 1970).

Le plan expérimental de cette étude est illustré dans la figure 3.2.

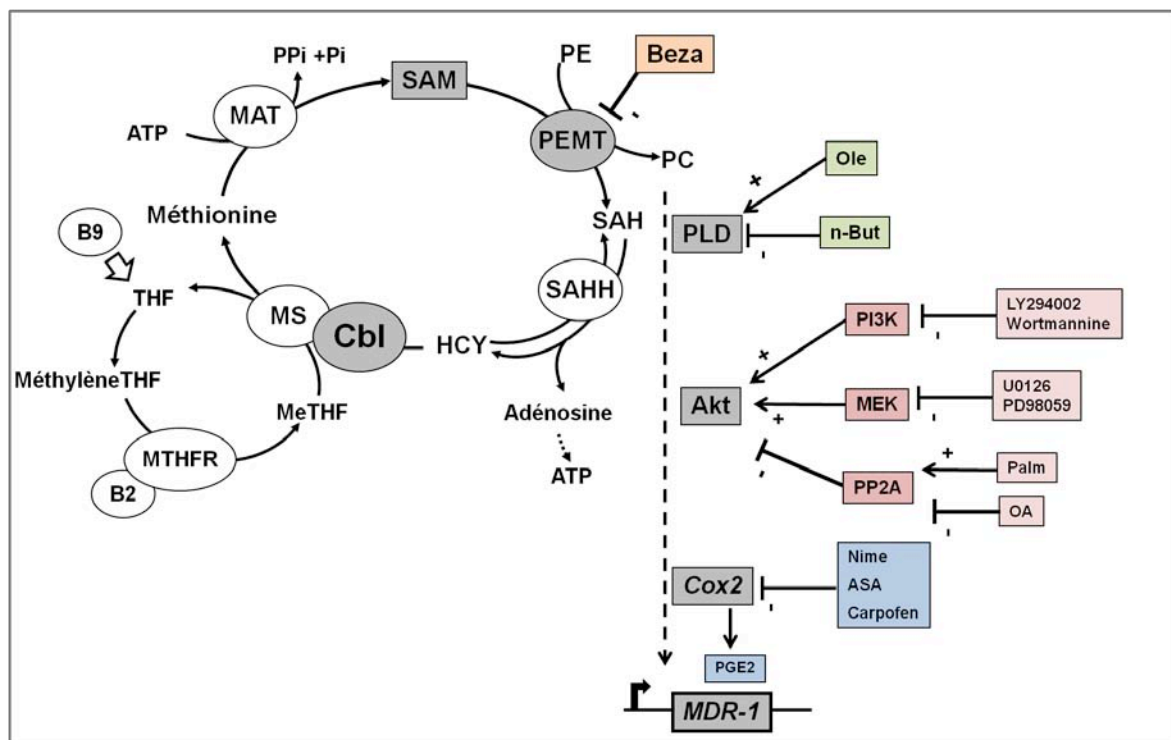


Figure 3.2 : Plan expérimental de l'étude. Afin de mettre au clair le chemin reliant la cobalamine (Cbl) au gène multidrug resistance-1 (MDR-1), nous avons agi par des différents effecteurs sur des acteurs potentiellement impliqués dans cette voie. Dans cette figure, ils sont représentés, les inhibiteurs et les activateurs utilisés, ainsi que leurs cibles. (SAM : A-Adénosyl-Méthionine ; PEMT : Phosphatidyl-éthanolamine-méthyle-transférase ; PE : Phosphatidyl-éthanolamine ; PC : Phosphatidyl-choline ; Beza : Bézafibrate ; PLD : Phospholipase D ; Ole : Acide oléique ; n-But : n-Butanol ; Akt : Protéine kinase B ; PI3K : Phosphoinositide 3-kinase ; MEK : Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein

Matériel et Méthodes

kinase ; PP2A : Protéine phosphatase 2 ; Palm : Acide palmitique ; OA : Acide okadaïque ; Cox-2 : Cylooxygénase 2 ; Nime : Nimésulide ; ASA : Acide acetyl- salicylique; PGE2: Prostaglandine E2;)

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

Dans cette partie du mémoire seront présentés les résultats obtenus lors de cette étude. Ils sont séparés en trois parties différentes, afin de faciliter leur compréhension. Ces trois parties sont :

1. L'implication de la phospholipase D dans la diminution de l'expression du gène MDR-1 par la cobalamine ;

2. L'implication d'AKT dans la voie, PLD-dépendante, dans la diminution de l'expression du gène MDR-1 par la cobalamine ;

et

3. L'implication de Cox2 dans la voie, PLD/AKT-dépendante, dans la diminution de l'expression du gène MDR-1 par la cobalamine.

1. L'implication de la phospholipase D dans la diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine.

Le premier résultat, qui a constitué le début de cette étude a été celui de la diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine. Je rappelle que la répression de ce gène est accompagnée par une augmentation de la cytotoxicité des cellules HepG2, vis-à-vis de la vinblastine. Cet effet sur l'expression du gène *MDR-1* ne passerait pas par une méthylation de son promoteur (Marguerite *et al.*, 2007).

La question évidente, qui a suivi a été : **Comment la cobalamine influence l'expression du gène *MDR-1* ? Par quelle voie cette action a lieu ?**

Puisque la méthylation du promoteur du gène *MDR-1* avait été exclue pour expliquer la diminution de son expression par la cobalamine, une autre hypothèse a été étudiée à savoir que la cobalamine influencerait la méthylation des phospholipides et en conséquence qu'elle influencerait l'activité d'une phospholipase. En particulier, nous avons voulu explorer l'hypothèse que la phospholipase D soit peut être un lien entre la cobalamine et l'expression du gène *MDR-1*.

Comment justifier une telle hypothèse ?

Parmi les altérations biochimiques des cellules cancéreuses, des changements dans la composition des phospholipides et du métabolisme ont été étudiées (Dobrzynska *et al.*, 2005). Ceux-ci incluent des changements dans des microdomaines membranaires et les cavéoles, ce qui suggère que ces organites spécialisés peuvent en quelque sorte faciliter le phénomène MDR des cellules cancéreuses (Lavie *et al.*, 2001). Il a également été démontré que les cavéoles étaient enrichies en phospholipase D (PLD), qui est une protéine membranaire impliquée dans le transport vésiculaire et la transduction du signal (Czarny *et al.*, 1999).

La PLD catalyse l'hydrolyse de la liaison diester de la phosphatidylcholine (PC) pour libérer l'acide phosphatidique (PA) et de la choline (Exton, 2002). Il a été proposé que le PA

agisse comme une molécule de signalisation intracellulaire activant les protéines kinases, des phospholipases et des protéines tyrosine kinases (Exton, 1997).

Rappelons que la phosphatidyl-éthanolamine méthyle-transférase (PEMT) est une enzyme connue pour modifier la composition des phospholipides cellulaires. Comme cette enzyme catalyse le transfert du groupe méthyle de la S-adénosyl-méthionine (SAM) sur la phosphatidyl-éthanolamine pour obtenir la phosphatidylcholine, l'activité PEMT dépend strictement de la disponibilité cellulaire en SAM et donc de l'activité de la Méthionine Synthase (MS). Je rappelle aussi que la Cbl conduit à une augmentation significative de l'activité de la MS (Marguerite *et al.*, 2007).

Nous avons constaté que l'implication de la PLD dans le phénomène de la multidrug resistance était encore assez peu documenté. Une augmentation de l'activité de cette enzyme a été rapportée dans le cas des cellules cancéreuses humaines résistantes aux cytotoxiques (Fiucci *et al.*, 2000) et cette augmentation de l'activité de la PLD a été aussi rapportée dans le cas du cancer du sein (Welsh *et al.*, 1994). Par ailleurs les phospholipides peuvent être des substrats physiologiques de la P-glycoprotéine humaine (Bosch *et al.*, 1997). Ces suggèrent une liaison possible entre la voie des phospholipides, l'activité de la PLD et MDR.

Dans cette première partie des résultats nous allons essayer de répondre à quatre questions :

- Est-ce que la cobalamine agit sur l'activité de la PLD ?
- Est-ce que l'action de la cobalamine sur la PLD passe par l'activation du cycle de la méthionine ?
- Est-ce que les acteurs du cycle de la méthionine agissent sur le gène *MDR-1* ?
- Est-ce que l'activité de la PLD est liée à l'expression du gène *MDR-1* ?

1.1. Diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine.

La cyanocobalamine est utilisée tout au long de cette étude, car il s'agit de la forme de cobalamine la plus commercialisée et surtout la plus stable. Elle se transforme en methylcobalamine, la forme active, qui active la méthionine synthase.

Quand les cellules HepG2 atteignent 80% de confluence, elles sont incubées en absence ou présence de 100nM de cobalamine, pendant 24 heures. L'expression du gène *MDR-1* a été déterminée par RT-PCR quantitative (Fiche technique n°18). Ce résultat avait dans un premier temps été observé par PCR semi-quantitative (Marguerite *et al.* 2007).

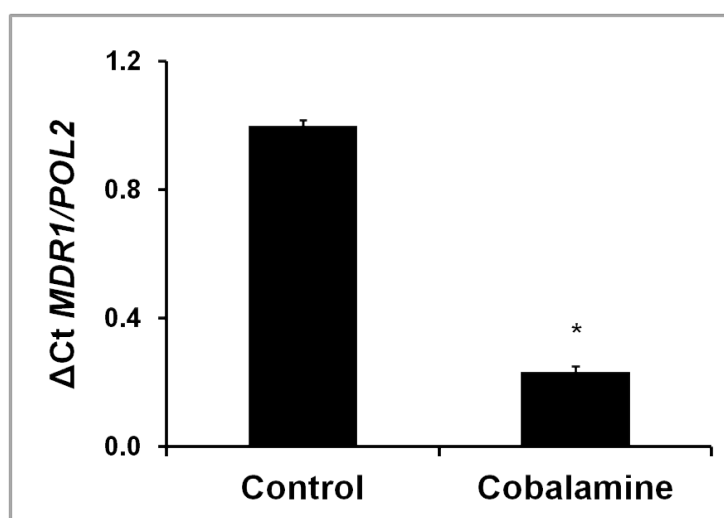


Figure 4.1 : L'action de la Cbl sur l'expression du gène *MDR-1*. Nous avons étudié l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en absence ou présence de 100nM de cobalamine (* : $p < 0.01$). Une diminution de l'expression du gène de 75% a été observée en présence de Cbl. Cette figure est représentative de 9 expériences différentes.

En utilisant une technique plus sensible, nous confirmons que l'expression du gène *MDR-1* diminuait en présence de cobalamine ($0,233 \pm 0,015$) par rapport aux cellules témoin ($0,998 \pm 0,018$) non traitées (Fig. 4.1). Il s'agit d'une diminution de l'expression du gène d'environ 75%.

1.2. Implication de la cobalamine dans la production des métabolites du cycle de la méthionine, SAM et SAH.

La méthionine est le précurseur de la SAM. La SAM est ensuite transformée en SAH grâce à des méthyltransférases comme la PEMT. Un des moyens d'étude de la PEMT est

l'utilisation de son inhibiteur, le bézafibrate (Nishimaki-Mogami *et al.*, 1996). L'ajout de ce composé aux cellules devrait avoir comme conséquence une différence du rapport PC/PE membranaire et une action possible sur des enzymes qui ont comme substrat la PC, comme par exemple la phospholipase D. En retour, le bézafibrate pourrait jouer sur l'activité du cycle de la méthionine et donc sur la quantité de SAM cellulaire produite et aussi donc du rapport SAM/SAH.

La mesure, par HPLC (Fiche technique n° 20), de métabolites comme la SAM et la SAH, a été effectuée, en présence ou absence de 100nM de cobalamine, associée ou pas avec 10µM de bézafibrate. La quantité de SAM pour les cellules non traitées, incubées avec la cobalamine (100nM), le bézafibrate (10µM) ou l'association de Cbl et de bézafibrate est de $1,8 \pm 0,2$, $2,6 \pm 0,2$, $1,3 \pm 0,1$ et $2,3 \pm 0,15$ nM par gramme de protéine, respectivement (Fig. 4.2).

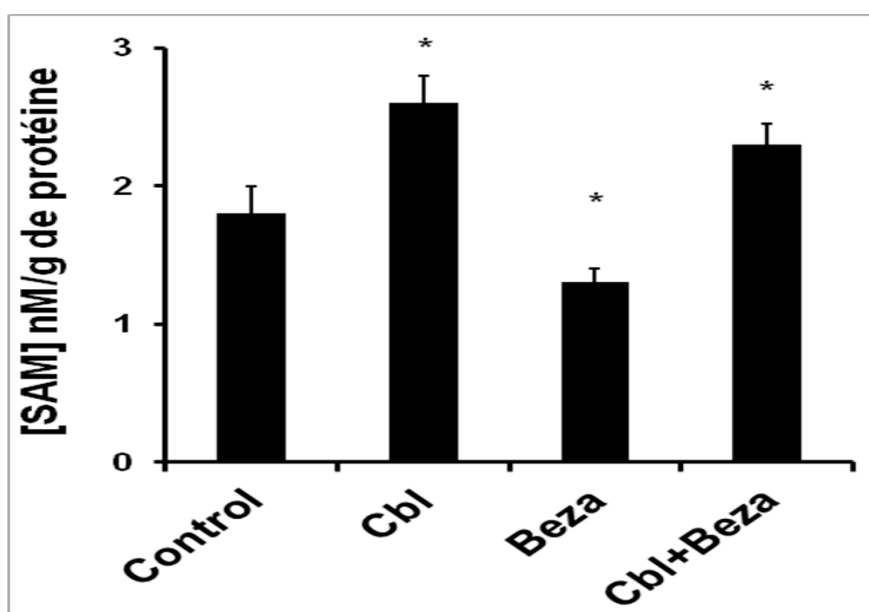


Figure 4.2 : Production de SAM en présence de Cbl ou/et de bézafibrate. Mesure, par HPLC, de la quantité de la SAM, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl), 10 µM de bézafibrate (Beza), ou association des deux. *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes.

L'ajout de la Cbl conduit à une augmentation de la quantité de SAM, résultat auquel on s'y attendait puisque la cobalamine active le cycle de la méthionine et donc la production

de la SAM. Par contre on pourrait s'attendre à une augmentation beaucoup plus importante de la SAM dans les conditions d'utilisation du bézafibrate. Ce n'est pas le cas, probablement parce que l'accumulation de la SAM intracellulaire est régulée.

La quantité de la SAM est influencée par toute voie de régulation de ce cycle. La concentration intracellulaire de la méthionine favorisera une des deux voies du métabolisme de l'homocystéine (la voie de reméthylation et la voie de transsulfuration). La disponibilité en méthionine et en SAM orientera ce métabolisme vers l'une ou vers l'autre de ces deux voies. Il est connu que lorsque la concentration en méthionine augmente, la SAM augmente, la MTHFR est inhibée par la SAM, et la CBS est activée et la voie de transsulfuration est favorisée. Ainsi, le cycle de la méthionine est activé et l'homocystéine est catabolisée par la voie de transsulfuration. La concentration de la SAM n'est pas aussi élevée que nous aurions pu penser. Sans doute pour plusieurs raisons, la première est qu'effectivement une augmentation de SAM conduira automatiquement à l'activation de mécanismes de régulation (voie de transsulfuration) qui conduiront à sa diminution. Une autre raison serait l'utilisation possible de la SAM par d'autres méthyltransférases qui consommeront la SAM produite.

Nous savons que les méthyltransférases, telles que la GNMT ou la PEMT, sont très abondantes au niveau du cytoplasme des cellules du foie et elles sont capables d'utiliser le méthyle cédé par la SAM pour méthyler leur substrat et libérer la SAH. L'accumulation de SAH a un effet inhibiteur sur la plupart des méthyltransférases ayant comme substrat la SAM. Pour cette raison la SAH est considérée parfois comme un composé bio-régulateur (Finkelstein *et al.*, 1984, Zappia *et al.*, 1969), qui régule *via* les méthyltransférases la concentration de la SAM.

Nous observons également, qu'en présence de cobalamine associée au bézafibrate, la quantité de la SAM augmente de 75 % par rapport à celle obtenue avec l'utilisation du bézafibrate seul. Ceci confirme l'activation du cycle par la cobalamine.

L'autre métabolite important du cycle de la méthionine est la SAH (Fiche technique n°20), qui est produite grâce à la transformation de la SAM par les méthyltransférases, comme la PEMT. La quantité de SAH (Fig.4.3) pour les cellules non traitées, incubées avec de la cobalamine (100nM), du bézafibrate (10µM) ou avec un mélange de cobalamine et de bézafibrate est de 30±3, 70±4, 19±2,5 et 48±2,5 nM par gramme de protéine, respectivement.

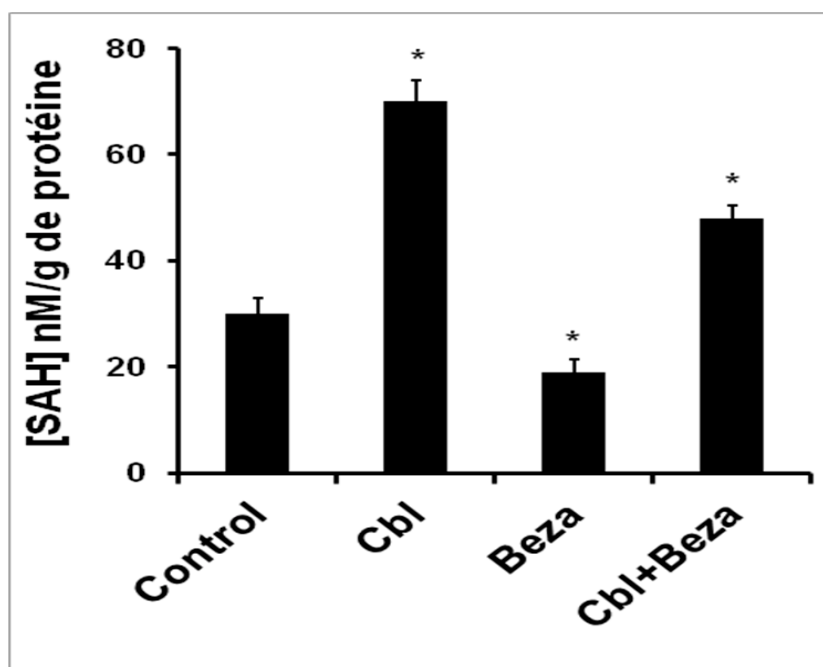


Figure 4.3: Production de SAH en présence de Cbl ou/et de bézafibrate. Mesure par HPLC, de la quantité de la SAH (S-Adénosyl Homocystéine), en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl), 10 μ M de bézafibrate (Beza), ou d'une association de bezafibrate et de Cbl. *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes.

La cobalamine active le cycle de la méthionine et une augmentation de la quantité de la SAH ne nous surprend pas. Une augmentation de l'activité de la méthionine synthase par la cobalamine conduit à une augmentation de la production de la méthionine, transformée ensuite en SAM. Plus le cycle est activé, plus il y a de SAM produite. La SAM, étant le substrat des méthyltransférases, sera transformée en SAH. Donc plus il y a de SAM, plus il y aura de SAH. Nous pouvons suivre la même logique dans le cas de l'utilisation du bezafibrate qui conduit à une baisse de la production de SAM et donc de SAH. D'autre part, comme la PEMT est bloquée, il est logique de penser que moins de SAH sera produite.

Regardons maintenant comment évoluent les rapports SAM/SAH. L'ajout de cobalamine seule conduit à une diminution de ce rapport de 33.3%. Lorsqu'on observe les figures 4.2 et 4.3., nous constatons aussi que la somme SAM + SAH est élevée dans cette condition. On peut penser que l'ajout de cobalamine induit une forte synthèse de SAM mais

aussi qu'elle activera aussi une forte activité des méthyltransférases qui sera telle qu'elle conduira à une diminution du rapport SAM/SAH. La SAH pourra alors exercer ses activités régulatrices.

D'autre part, une faible augmentation du rapport SAM/SAH, de l'ordre de 16%, est observée, dans le cas de l'utilisation du bézafibrate. Une moindre utilisation de la SAM (la PEMT est bloquée) et l'utilisation de la SAH, sans qu'elle ne soit renouvelée, expliquent cette augmentation. Cette observation suggère aussi que la PEMT compte pour une part appréciable de l'utilisation de la SAM cellulaire.

Dans le cas de l'utilisation du mélange Cbl et bézafibrate, ce rapport diminue de 16% par rapport au témoin et de 28% par rapport à la condition où le bézafibrate est utilisé seul. La cobalamine active la formation de la SAM. La SAM, ne pouvant pas être utilisée par la PEMT, est prise en charge par d'autres méthyltransférases, telles que la GNMT. Des résultats récents par d'autres membres de l'équipe du laboratoire ont montré qu'effectivement la GNMT était fortement activée par la Cbl dans les cellules HepG2 (résultats non montrés). De cette manière, une partie de la transformation de la SAM en SAH a quand même lieu, avec comme résultat, un niveau d'utilisation de la SAM par des voies indépendantes du cycle de la méthionine, plus prononcé que sa production en SAH.

1.3. Implication de la SAM dans l'expression du gène *MDR-1*.

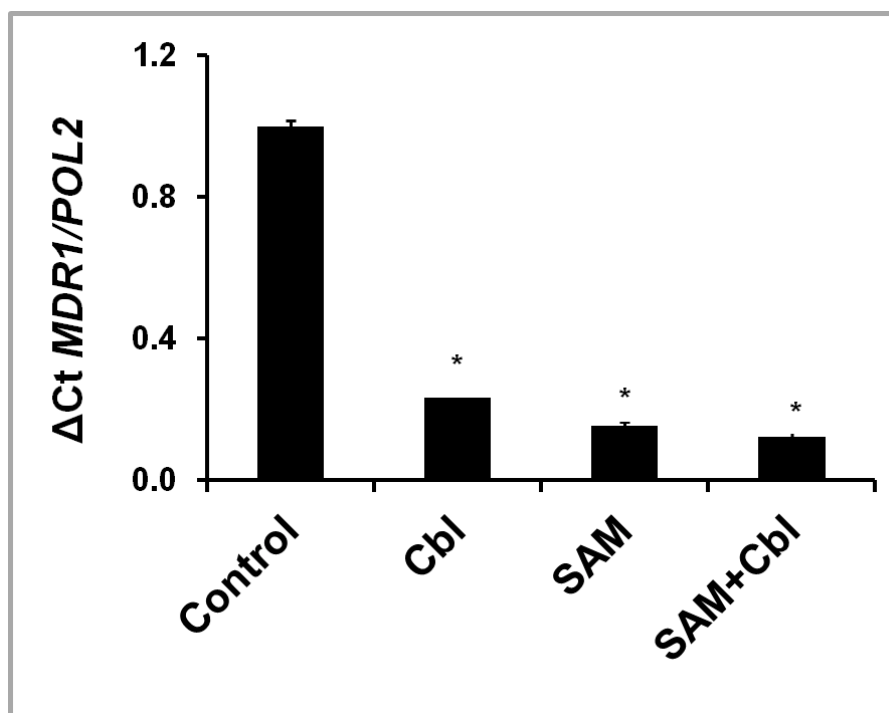


Figure 4.4 : Action de la SAM sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100nM de cobalamine (Cbl) associée ou non avec 75 μ M de S-Adénosyl Méthionine (SAM). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 6 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Nous avons observé une diminution d'environ 75% de l'expression du gène *MDR-1* lorsque les cellules ont été incubées avec de la cobalamine. La cobalamine active le cycle de la méthionine et donc, comme nous venons de voir, la production de la SAM. Nous avons ajouté de la SAM aux cellules pour voir si ce composé pouvait mimer les effets de la Cbl. Nous montrons (Fig.4.4) que la SAM conduit également à une réduction importante de l'expression du gène *MDR-1* ($\Delta C_t = 0.15 \pm 0.012$ en présence de SAM, vs $\Delta C_t = 0.998 \pm 0.018$ pour la condition témoin (control)). Cet effet est légèrement additionnel quand la SAM est associée à la cobalamine ($\Delta C_t = 0.12 \pm 0.01$).

L'ajout de cobalamine augmente l'activité de la méthionine synthase de dix fois (Marguerite *et al*, 2007). Nous n'observons qu'une augmentation de 45% de la production de SAM par l'ajout d'une même quantité de cobalamine. Cette augmentation est capable d'induire une diminution de l'expression du gène *MDR-1* de 75%. Ceci correspond à un effet

physiologique assez puissant. Ainsi, la manipulation du cycle de la méthionine pourrait finalement s'avérer un outil très intéressant pour l'amélioration de la chimiothérapie.

1.4. Implication de la cobalamine dans la production des phospholipides PE et PC.

La SAH n'est pas le seul produit fourni par la PEMT. Cette enzyme transforme la PE en PC, puisque la PE est un lipide qui peut être méthylé (Akesson *et al*, 1978). En plus, dans les hépatocytes, une des utilisations prédominantes de la SAM est la transméthylation de la PE pour former la PC par l'enzyme PEMT (Jacobs *et al.*, 2005). Il est intéressant, alors, d'utiliser à nouveau la cobalamine et le bézafibrate et de mesurer la quantité intracellulaire du substrat (PE) et du produit (PC) de la PEMT. Les résultats sont reportés dans la figure 4.5.

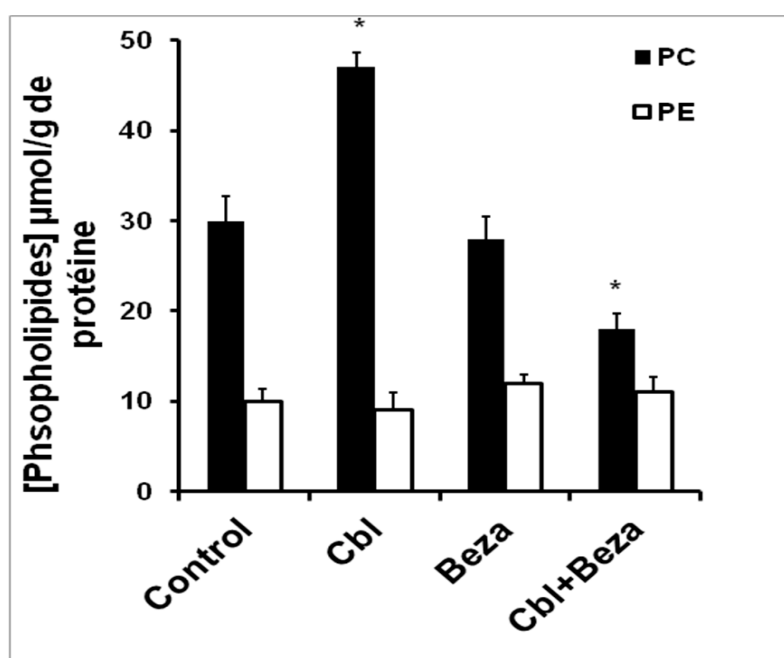


Figure 4.5 : Influence de la Cbl et du bézafibrate sur la production des phospholipides PE et PC. Dosage de la quantité de la PE (Phosphatidyléthanolamine) et de la PC (Phosphatidylcholine), en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl), de 10 μM de bézafibrate (Beza), ou association des deux. *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control)). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°22).

Quand le cycle de la méthionine est activé par la cobalamine, la quantité de PC produite augmente (30 ± 3 mmol/g vs 47 ± 4 mmol/g de protéine), alors que le niveau de PE reste invariable (11 ± 3 mmol/g de protéine). Par contre, l'utilisation de bézafibrate seul n'a pas

produit des changements de la quantité de PC (28 ± 3 mmol/g de protéine), ni de celle de PE. L'association de cobalamine et de bézafibrate a eu pour conséquence une diminution de la quantité de PC (18 ± 2 mmol/g de protéine).

Nous pouvons ici aussi mieux comprendre ce résultat en observant l'évolution du rapport PE/PC. Dans le cas de l'incubation cellulaire avec la cobalamine, une diminution de ce rapport de l'ordre de 42% a été obtenue. Ceci est comparable à la diminution du rapport SAM/SAH, pour la même condition. La cobalamine active le cycle de la méthionine et par conséquent provoquerait l'activation de l'enzyme PEMT. L'activité de la PEMT augmentée conduit à l'utilisation des substrats (SAM et PE) de l'enzyme et une augmentation de la quantité de ses produits (SAH et PC). Il est alors logique que le rapport substrat/produit diminue par rapport à la condition témoin.

Dans le cas de l'utilisation du bézafibrate, aucune variation du rapport PE/PC est observée et nous n'observons non plus d'augmentation de la quantité de PC. Nous pouvons quand même penser que la PEMT est bloquée et ne transforme pas la PE en PC. Ceci signifierait que le « turnover » des phospholipides est lent dans les cellules et dans ces conditions opératoires. Pourtant nous avons observé des effets du bézafibrate sur les quantités de SAM, de SAH et sur le rapport SAM/SAH. Ce résultat nous a surpris. On pourrait supposer que dans cette condition, la PEMT est effectivement bloquée et influence les quantités de SAM en amont et de SAH en aval mais que la voie alterne (voie Kennedy) de production des phospholipides prenne le relais pour maintenir une homéostasie des phospholipides ? Cette hypothèse devra être vérifiée.

Dans le cas de l'association de la cobalamine et du bézafibrate, nous observons une baisse de la quantité de PC, en conséquence le rapport PE/PC augmente (de 84%) par rapport au témoin. La production de la PC n'est pas assurée par la PEMT, puisqu'elle est bloquée par le bézafibrate. La diminution de la PC pourrait être expliquée par une stimulation de son utilisation par la Cbl, en particulier par des phospholipases. Effectivement, comme nous le verrons plus loin, dans la figure 4.8, la phospholipase D, est activée par la cobalamine.

1.5. Implication du bézafibrate dans l'expression du gène *MDR-1*.

Nous avons poursuivi cette étude en regardant les effets du bézafibrate sur l'expression du gène *MDR-1* (Fig. 4.6). Une surexpression du gène est observée, quand le bézafibrate est utilisé seul ($\Delta Ct = 1.7 \pm 0.10$ vs $\Delta Ct = 0,998 \pm 0,018$ pour le témoin (control)).

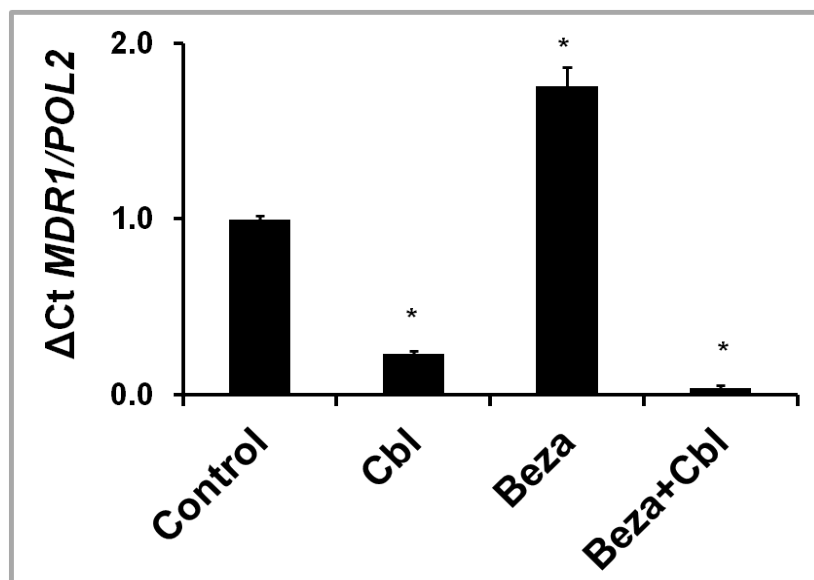


Figure 4.6 : L'action de bézafibrate sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100nM de cobalamine (Cbl) associée ou pas avec 10 μ M de bézafibrate (Beza). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

D'autre part, l'association de la cobalamine et du bézafibrate mène vers une diminution importante de l'expression du gène ($\Delta Ct = 0.03 \pm 0.01$). Nous aurions pu penser que l'effet de la cobalamine serait « annulé » par le bézafibrate et que, le cycle étant bloqué, l'expression du gène *MDR-1* augmenterait. Pourtant ce n'est pas le cas. Ces résultats sont difficiles à interpréter si nous tenons compte des effets uniques du bézafibrate sur la PEMT. Un des soucis de l'utilisation du bezafibrate est sa spécificité. Il est clair et connu que ce composé possède une activité inhibitrice de la PEMT. Les effets du bezabibrate sur les quantités de SAM, SAH, en relation avec celles de la PC et de la PE peuvent lui être attribués. Par contre, il faut être beaucoup plus réservé quant à son effet sur l'expression du gène *MDR-1*. En effet, Il ne faut pas oublier que le bézafibrate est aussi un activateur de PPAR α , qui en plus d'être activé par les acides gras, peut être un facteur de transcription génique. Il est alors

possible que la voie PPAR soit impliquée dans la voie étudiée ici. Ceci nécessiterait bien sur une investigation plus approfondie.

1.6. Influence de la cobalamine sur l'activité de la phospholipase D.

Afin de rechercher un lien possible entre l'activité de la méthionine synthase et l'activité de la PLD, nous effectuons des mesures directes de l'activité de la PLD (en utilisant un substrat spécifique fluorescent), en utilisant la réaction de transphosphatidyltion (Fig.4.7). La PLD catalyse l'échange d'une tête polaire de phospholipide (substrat) avec un alcool primaire, pour former le phosphatidyl alcool correspondant (Yang *et al.*, 1967). Par conséquence, l'utilisation d'alcools primaires tels que le n-But conduit à une augmentation du Phosphatidyl-Butanol (PBut) et une diminution à la production de PA. La PC marquée par la molécule fluorescente BODIPY (B-PC) est un substrat spécifique de la PLD (Ella *et al.*, 1994).

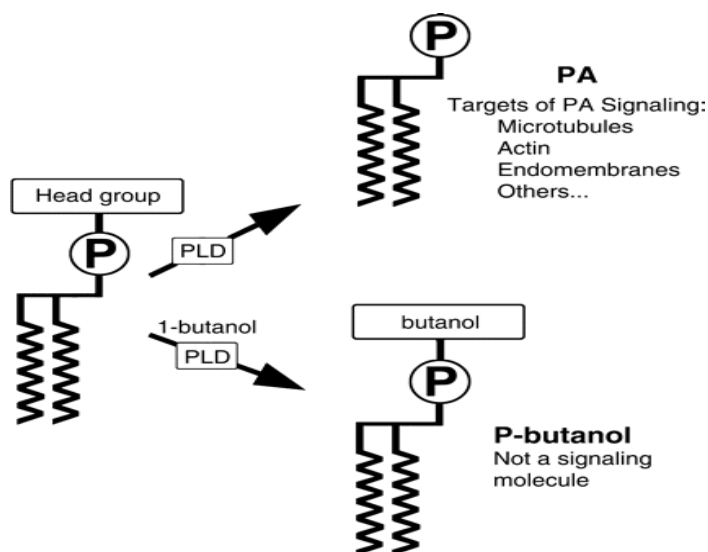


Figure 4.7 : Réaction de transphosphatidyltion (Peters *et al.*, 2007). L'hydrolyse d'un phospholipide par la PLD conduit à la production de l'acide phosphatidique (PA), qui est une molécule active qui participe à la signalisation intracellulaire. Si dans le milieu réactionnel nous rajoutons un alcool primaire, tel que le 1-Butanol (ou n-Butanol), la PLD va l'utiliser de façon préférentielle, conduisant à la production du phosphatidyl-Butanol (P-Butanol), qui est une molécule, qui ne participe pas à la signalisation cellulaire.

L'activité de la PLD a été examinée, dans des extraits de cellules HepG2, qui ont été incubées pendant 24 h en présence ou en absence, de 100nM de Cbl et/ou de modulateurs de la PLD. Il s'agit d'une part du n-Butanol (135mM) et d'autre part de l'acide oléique (20μM), car ils agissent comme inhibiteur et activateur de la PLD, respectivement. Notons bien que le n-Butanol utilisé comme substrat de la réaction de transphosphatidylation et celui utilisé en tant qu'inhibiteur de la PLD, ne sont pas reliés. Pour la réaction de transphosphatidylation, n'importe quel alcool primaire serait convenable.

Après incubation des extraits avec la B-PC, nous avons procédé à une chromatographie sur couche mince (TLC) (Rouser *et al.*, 1970). Comme nous pouvons le voir dans la Fig.4.8, les cellules incubées avec la cobalamine ou l'acide oléique ont présenté une production trois ou cinq fois plus élevée de B-PBut que celle des conditions témoin (control). Par contre, en présence de n-But cette production est très diminuée (5 ± 2 % par rapport au Témoin).

Trois produits peuvent principalement être observés : la Lyso-PC, le Lyso-PBut et le P-But, indiquant que la voie métabolique de la PLD est active dans les cellules HepG2. Par contre, nous n'observons ni le MAG, ni le DAG. Ceci est justifié par le fait que l'utilisation du n-But conduit à une absence de production de PA. Le PA pourrait être converti par la PA phosphatase pour générer le DAG et ensuite, par la diacylglycerol lipase pour générer le MAG. L'absence de PA serait une barrière pour le métabolisme cellulaire et pour son éventuel rôle en tant que second messenger.

La Cbl active donc la PLD. On peut supposer que la PA produite peut alors interagir avec des récepteurs intracellulaires qui conduisent à la répression du gène *MDR-1*. Dans la littérature, de nombreuses cibles intracellulaires de PA ont été identifiées, tels que ras (rat sarcoma) / raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) / MEK (Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase) / Erk (extracellular signal-regulated kinase) voie, Akt (protéine Kinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin) ou PKC (protéine kinase C) (Exton, 1997;. Wang *et al.*, 2006).

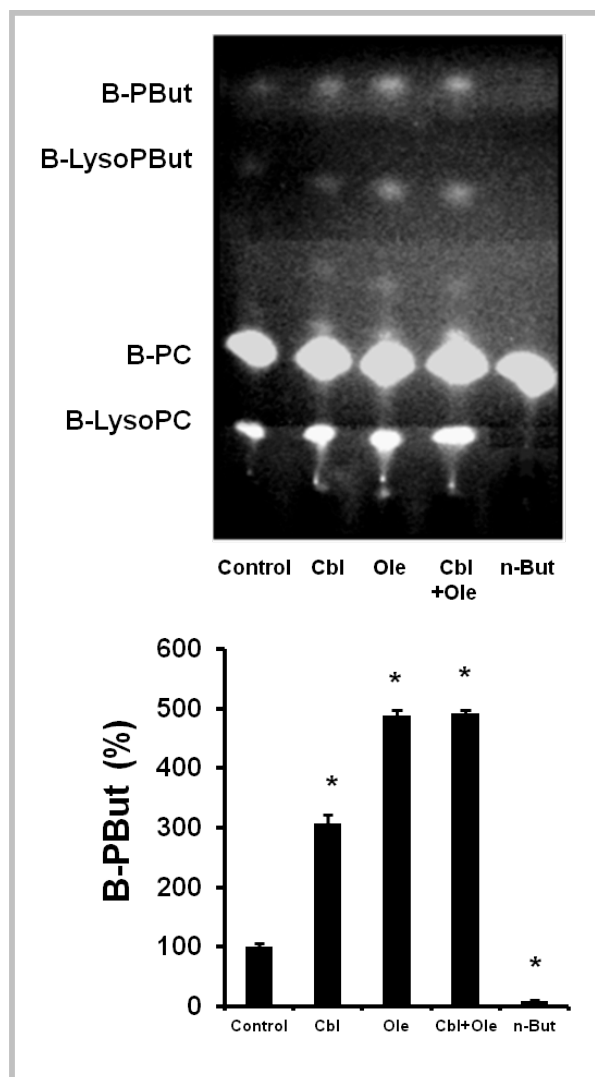


Figure 4.8: Activité de la phospholipase D. Évaluation, par chromatographie sur couche mince, de l'activité de la phospholipase D, en présence ou absence de 100nM de cobalamine, associée, ou non, avec l'activateur (20 μ M d'acide oléique : Ole) ou l'inhibiteur (135 mM de *n*-Butanol : *n*-But) de cette enzyme. B-PBut, (BODIPY-phosphatidylbutanol); B-LysoPBut, (BODIPY-Lysophosphatidyl-butanol); B-PC, (BODIPY-Phosphatidylcholine: substrat); B-LysoPC, (BODIPY-Lysophosphatidylcholine), le BODIPY étant une molécule fluorescente. * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°21).

Dans la figure 4.8, nous observons que la production du Bodipy-PhosphatidylButanol, qui est le produit de la réaction de transphosphatidylolation qui a lieu pendant notre expérience, augmentait de trois ou cinq fois dans le cas de l'utilisation de la cobalamine, de l'acide

oléique ou de leur association. La cobalamine active l'activité de la PLD et ceci conduit comme nous avons vu précédemment à l'utilisation d'une partie de la PC, (qui est le substrat de la PLD) aussi nouvellement produite sous l'action de la Cbl.

L'acide oléique active la PLD d'une manière encore non élucidée. Il est quand-même discuté qu'une des isoformes de la PLD (PLD3) serait spécifiquement activée par ce composé et elle est appelée PLD-oléate sensible (Okamura *et al.*, 1994).

Le n-Butanol inhibe totalement l'activité de la phospholipase D et ainsi nous n'observons aucune trace de B-PBut. Cette inhibition de la PLD par le n-Butanol a lieu parcequ'il est un alcool primaire. Le Tert-Butanol (alcool tertiaire) n'a aucun effet. La PLD utilise de préférence les alcools de cette conformation par rapport à l'eau. Les alcools de conformation différente ne sont pas transformés par la PLD. L'inhibition de l'enzyme est due au fait que le produit PBut est une molécule inactive et ne joue aucun rôle dans la signalisation cellulaire, alors que le produit de l'hydrolyse de la PC, le PA, est actif dans la signalétique intracellulaire.

1.7. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression du gène *MDR-1*.

Nous avons vu que la cobalamine accroissait l'activité de la phospholipase D. Il est nécessaire, maintenant, de vérifier si la PLD et l'expression du gène *MDR-1* sont reliées. Nous avons alors déterminé, par RT-PCR semi-quantitative et quantitative (Fig.4.9), si l'expression du gène *MDR-1* peut être modulée par les mêmes effecteurs qui ont été utilisés pour modifier l'activité de la PLD.

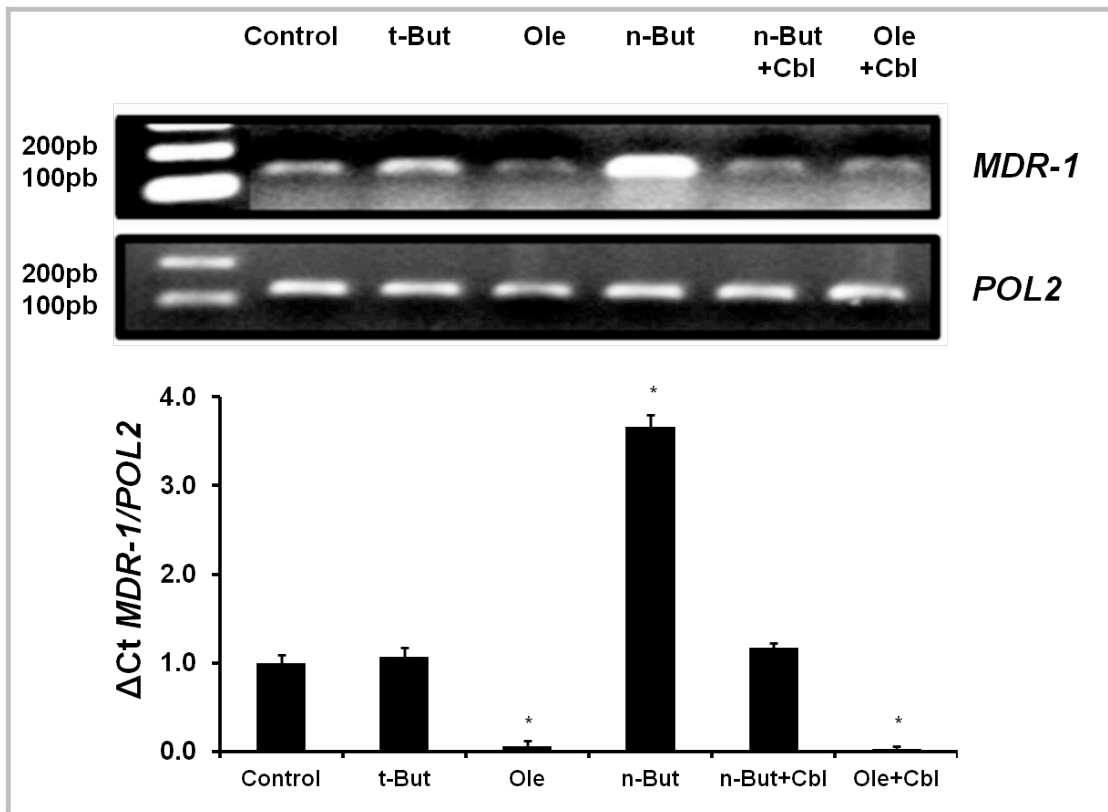


Figure 4.9 : Action des effecteurs de la PLD sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par semi-quantitative (électrophorèse) et quantitative (histogramme) RT-PCR, en présence ou absence de 135 mM de tert-Butanol (t-But); de 20 μ M d'acide oléique (Ole) ; de 135 mM de n-Butanol (n-But); d'un mélange de 135 mM n-Butanol et 100 nM de cobalamine (n-But + Cbl); ou encore d'un mélange de 20 μ M d'acide oléique et 100 nM cobalamine (Ole + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

En présence de 20 μ M d'acide oléique, une diminution de l'expression du gène *MDR-1* a été observée ($\Delta C_t = 0.06 \pm 0.06$), par rapport aux cellules non traitées ($\Delta C_t = 0.998 \pm 0.018$). Au contraire une incubation cellulaire avec le n-But a conduit à une impressionnante augmentation de l'expression du gène *MDR-1* ($\Delta C_t = c$), alors qu'aucune modification n'a été observée par l'utilisation de son analogue inactif, le tert-Butanol (t-But). La cobalamine, associée au n-But (n-But+Cbl) diminue l'augmentation de l'expression du gène *MDR-1*, obtenue par le n-But seul ($\Delta C_t = 1.2 \pm 0.05$ vs $\Delta C_t = 3.7 \pm 0.13$, pour le n-But seul). Dans le cas d'une association de la cobalamine et de l'acide oléique (Ole+Cbl) une diminution de

l'expression du gène *MDR-1* est à noter. Elle est similaire à celles provoquées par la Cbl ou par l'acide oléique seul.

L'expression du gène *MDR-1* reste inchangée, quand nous utilisons le tert-Butanol. Le tert-But est un alcool tertiaire, qui ne peut pas être utilisé par la PLD à cause de son conformation. Le n-Butanol par contre, qui inhibe la PLD et peut être transformé en phosphatidylbutanol par cette enzyme, provoque une augmentation de l'expression du gène *MDR-1*.

L'acide oléique associé ou pas à la cobalamine, conduit à la diminution de son expression et cet effet est de la même ampleur que celle de la diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine seule. Les cellules HepG2 de nature hépatocytaire ont vocation physiologique à accumuler la graisse (en partie sous forme de phospholipide?). Nous pouvons ainsi nous poser la question d'un effet non spécifique sur le métabolisme lipidique et une mise en réserve de corps gras par les cellules grâce à cet apport exogène avec un effet qui serait artéfactuel pour cette expérience. Nous avons auparavant réalisé cette même manipulation avec d'autres acides gras insaturés à 18 atomes de carbone, l'acide α -linolénique (ω 3) et l'acide linoléique (ω 6) et l'acide stéarique (résultats non montrés). Aucun des autres acides gras n'ont influencé l'expression du gène *MDR-1*. Le fait que l'acide oléique soit un activateur de la PLD (Lee *et al.*, 2002), appuie donc bien l'hypothèse que la cobalamine influence le gène *MDR-1* via la voie de la phospholipase D. Par ailleurs, la cobalamine réussit à contrebalancer l'effet du n-Butanol et à ramener l'expression du gène étudié au niveau du celle du témoin.

Nous constatons alors que la modification de l'activité de la PLD par son inhibiteur, le n-But, et son activateur, l'acide oléique, influence clairement l'expression du gène *MDR-1*. Nous avons vu précédemment que la cobalamine provoque une augmentation de l'activité de la PLD et une diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Ici nous constatons que ces trois acteurs semblent liés, puisque la cobalamine associée aux effecteurs de la PLD, influence l'expression génique de *MDR-1*. Il semblerait, alors, que la cobalamine agisse sur le gène *MDR-1* par l'intermédiaire de la phospholipase D.

1.8. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression de la protéine P-gp.

Nous avons maintenant voulu déterminer par Western-blotting (Fig.4.10), si les modifications de l'expression du gène *MDR-1* étaient corrélées avec la quantité de la P-glycoprotéine, codée par le gène *MDR-1*.

Quand les cellules sont incubées avec le n-But, une augmentation de la présence de la protéine d'environ deux fois a été observée (de 1 ± 0.1 pour le témoin vs 2.11 ± 0.3 pour les cellules incubées avec le n-But). Lorsque les cellules sont incubées avec de l'acide oléique, une diminution de la P-gp a été notée (0.65 ± 0.09). L'analogue inactif du n-But, le t-But n'a pas eu d'effet sur l'expression de la protéine, qui reste au même niveau que celui du témoin (control). La cobalamine (n-But+Cbl) contrebalance l'augmentation de la P-gp induite par le n-But seul (de 2.11 ± 0.3 à 1.14 ± 0.1). Dans le cas d'une association de la cobalamine et de l'acide oléique (Ole+Cbl), une diminution encore plus marquée de la P-gp (0.36 ± 0.13) a été observée.

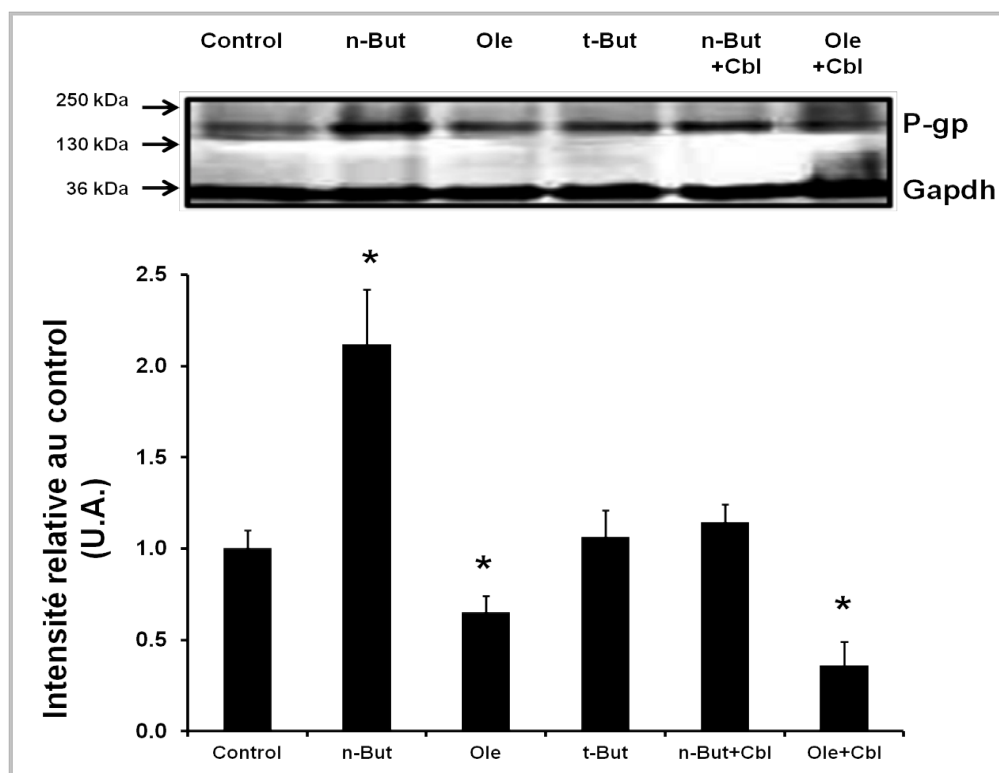


Figure 4.10 : Action des effecteurs de la PLD sur l'expression de la protéine P-gp. Étude de l'expression de la protéine P-gp, par Western blot, en présence ou absence de 135 mM de

tert-Butanol (*t*-But); de 20 μ M d'acide oléique (*Ole*); de 135 mM de *n*-Butanol (*n*-But); d'un mélange de 135 mM *n*-Butanol et de 100 nM de cobalamine (*n*-But + *Cbl*) ; d'un mélange de 20 μ M d'acide oléique et de 100 nM cobalamine (*Ole* + *Cbl*). (*P*-pg/*Gapdh* en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

Nous constatons alors que l'effet des effecteurs de la PLD, associés ou non à la cobalamine, est tout à fait comparable à l'effet observé sur l'expression génique de *MDR-1*. Ceci constitue un élément supplémentaire qui appuie l'éventuel lien entre la cobalamine, la phospholipase D et le gène *MDR-1*.

1.9. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur la cytotoxicité de la vinblastine.

L'étude des différentes voies intracellulaires qui influencent l'expression de la protéine P-gp est importante du point de vue mécanistique. Il nous restait à nous assurer que les variations observées précédemment conduisaient aussi à des modifications de la fonctionnalité de cette protéine. Nous avons alors étudié sa capacité de détoxification cellulaire. L'agent « toxique », dans le cas de cette étude, est l'agent antimétabolique, vinblastine. Il s'agit d'un médicament utilisé en chimiothérapie et c'est aussi un substrat connu de la P-gp. Il est bien documenté le fait que la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis de la vinblastine est reliée à la régulation de l'expression du gène *MDR-1* (Arias *et al.*, 1990). L'effet des effecteurs de la PLD sur la résistance des cellules HepG2 face à la vinblastine a été déterminé par l'étude de leur chimiosensibilité, en utilisant la méthode dite du MTT.

Les cellules HepG2 montrent (Fig.4.11) une résistance concentration-dépendante face à la vinblastine. L' IC_{50} est de 5 μ M pour le témoin (Control). En présence de 20 μ M d'acide oléique, un déplacement vers la gauche de la courbe de viabilité a été observé (IC_{50} : 0.9 μ M). Un effet opposé (déplacement vers la droite) a été observé quand le *n*-But a été utilisé (IC_{50} : 10 μ M). L'association de l'acide oléique avec la cobalamine montre un effet similaire à celui obtenu par l'acide oléique seul. La cobalamine semble encore une fois contrebalancer l'effet du *n*-But (*n*-But+*Cbl*), ramenant la viabilité cellulaire proche de celle du témoin.

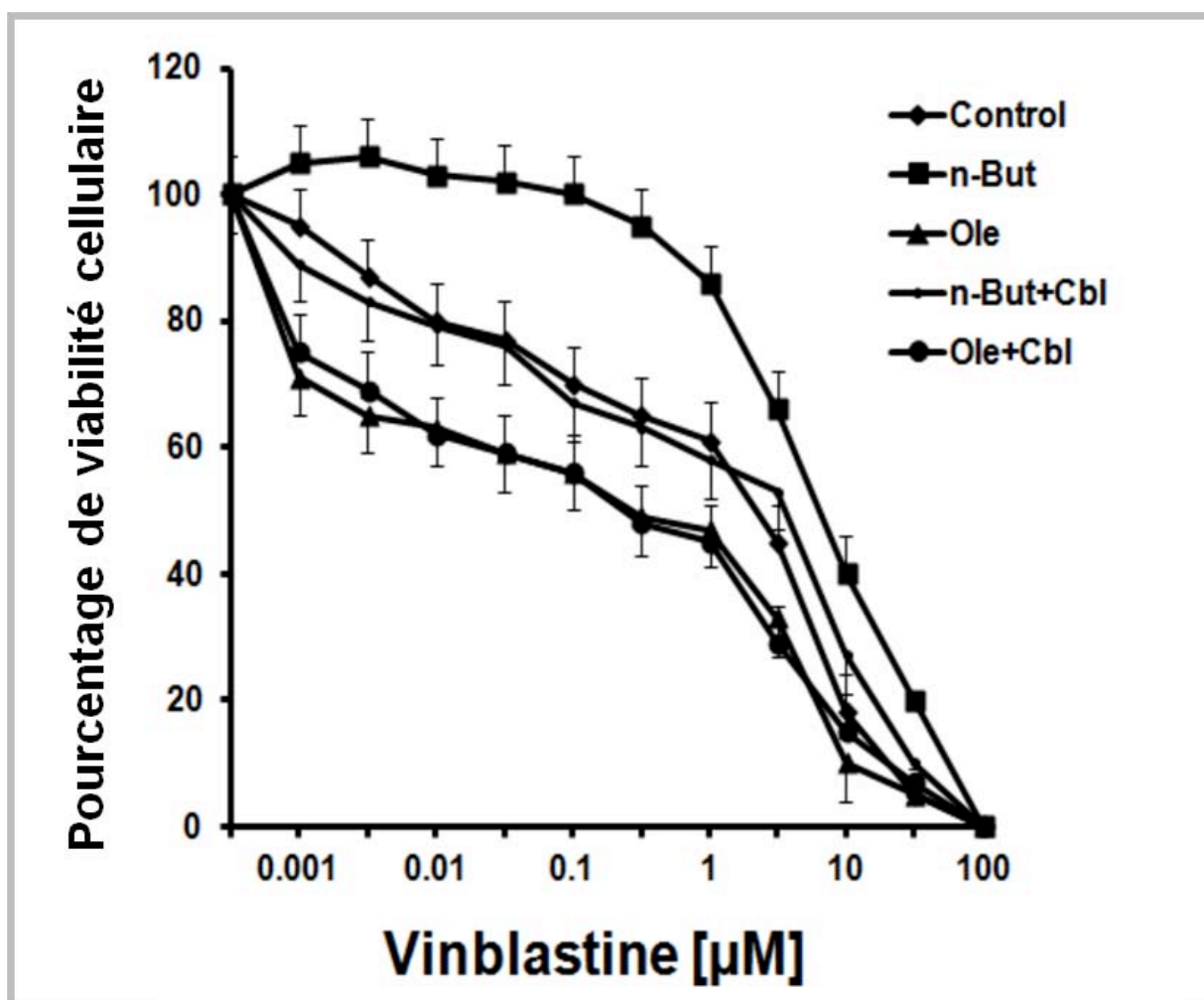


Figure 4.11 : Action des effecteurs de la PLD sur mortalité cellulaire induite par la vinblastine. La toxicité, mesurée par la technique du MTT, a été mesurée en ajoutant des concentrations croissantes de vinblastine en présence ou absence de 20 µM d'acide oléique (Ole); de 135 mM de n-Butanol (n-But); d'un mélange de 135 mM n-Butanol et 100 nM de cobalamine (n-But + Cbl); ou encore d'un mélange de 20 µM d'acide oléique et 100 nM Cbl (Ole + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 6 expériences différentes. (Fiche technique n°6).

Les cellules cancéreuses utilisées sont devenues plus sensibles à la vinblastine, quand elles sont cultivées en présence de cobalamine, d'acide oléique ou d'une association des deux composés. Dans le cas de l'association de la cobalamine et de l'acide oléique, les cellules sont 5 fois plus sensibles que les cellules non traitées. Ceci constitue un résultat très intéressant et il pourrait être le début d'une étude *in vivo* et pourquoi pas d'une étude clinique, par la suite,

afin de proposer des molécules qui pourraient améliorer les protocoles chimiothérapeutiques.

Il a été suggéré que la PLD pourrait jouer un rôle dans la progression des plusieurs cancers (Zhong *et al.*, 2003 ; Welsh *et al.*, 1994) où l'expression et l'activité de la PLD sont élevées. Cela impliquait, que l'activité de la PLD, ou des composants de la signalisation de la voie PLD pourraient être ciblés, afin de détruire les cellules cancéreuses, qui présentent une activité PLD élevée (Fiucci *et al.*, 2000). L'objectif serait ici d'inhiber la PLD afin de tuer les cellules cancéreuses. Notre proposition est différente de celle-ci puisque nous pensons plutôt activer la PLD mais lors d'un traitement avec un vinca-alcaloïde. D'autre part, aucun des modèles étudiés ne fait état de leur statut vitaminique ou nutritionnel.

Il serait aussi intéressant de déterminer 1) le «statut de chimiosensibilité» de ces modèles et 2) si, et dans quelle mesure, les agents utilisés pour cibler et inhiber la PLD n'induirait pas une possible surexpression du gène *MDR-1*. On peut donc proposer, qu'une attention particulière soit portée en manipulant ces agents, c'est-à-dire, qu'ils doivent être sélectionnés comme n'étant pas substrats ou inducteurs de *MDR-1*.

Dans les dernières années, plusieurs travaux ont porté sur le transport des glycérophospholipides, les sphingolipides et leurs analogues, par la P-gp. Un certain nombre d'analogues de lipides à chaîne courte a été trouvé comme pouvant être expulsés des cellules par la P-gp (Foster *et al.*, 2006 ; Van Helvoort *et al.*, 1996). Parmi les lipides endogènes, le PC-PAF (PC-Platelet Activating Factor), ainsi que la PE et PC sont des substrats de la P-gp (Bosch *et al.*, 1997; Ernest *et al.*, 1999). Toutefois, en raison de sa faible spécificité de substrat, il est intéressant d'imaginer une implication de la P-gp dans la répartition transversale des lipides endogènes dans la membrane plasmique et il est donc peu probable que les changements dans la concentration PC puissent modifier certaines propriétés biochimiques directes de P-gp.

D'autre part, il a été montré que le ratio membranaire PC / PE pouvait interagir avec les affinités de liaison des médicaments à la P-gp. Plusieurs médicaments, qui sont des composés amphiphiles, semblent agir en fonction de leur capacité à rivaliser avec les phospholipides dans les sites de liaison de la molécule P-gp (Raggers *et al.*, 2000). Les lipides (en particulier la PC), qui interagissent faiblement avec la P-gp, peuvent être plus facilement déplacés, ce qui donne plus d'affinités pour la liaison avec ces médicaments. Au contraire, les

lipides à fortes liaisons (par exemple PE) peuvent être plus difficiles à déplacer, ce qui réduit l'affinité de liaison à la drogue. Ainsi, non seulement la Cbl active la PLD et réprime le gène *MDR-1*, mais il pourrait aussi potentialiser l'action (en augmentant le rapport PC/PE) d'autres médicaments amphiphiles, tels que la doxorubicine (Pajeva *et al.*, 2004). D'autres expériences doivent désormais être conçues pour vérifier cette hypothèse.

De nombreuses cellules cancéreuses sont avérées méthionine-dépendantes, conduisant à élaborer des stratégies pour abaisser les taux circulants de la méthionine, afin de limiter la croissance du cancer (Cavuoto *et al.*, 2012), en particulier en combinaison avec des médicaments anticancéreux. Nous nous proposons l'idée que l'activation du cycle de la méthionine devrait plutôt améliorer la chimiothérapie. Ces deux propositions ne sont en fait pas antinomiques. On pourrait en effet émettre l'hypothèse que la réduction des niveaux de méthionine devrait augmenter l'activité intracellulaire de la méthionine synthase comme une réaction adaptative. Nous avons précédemment montré que la méthionine synthase activée par la Cbl, potentialise la cytotoxicité induite par la vinblastine (Marguerite *et al.*, 2007). Il serait intéressant de déterminer si, et dans quelle mesure, des combinaisons de carence en méthionine, de cobalamine et / ou d'acide oléique et de drogues peut avoir un bénéfice clinique dans le traitement du cancer.

Il y a actuellement des données confuses au sujet des effets de la Cbl dans la thérapie combinatoire dans le cancer. Une supplémentation alimentaire en acide folique et en Cbl a été montré comme étant associée au métabolisme des cellules cancéreuses de la prostate et à une efficacité moindre du substrat de la P-gp, le docétaxel (Tisman *et al.*, 2011). Cependant, ces études portent sur les cellules cancéreuses de la prostate, exprimant fortement la MRP1 (Zalcberg *et al.*, 2000). Par ailleurs, un travail récent démontre une implication possible de l'acide folique dans le cancer de la prostate (Wien *et al.*, 2012), mais pas dans d'autres types de cancer. Dans ces études, les faibles efficacités du traitement peuvent donc être attribuées à l'acide folique, mais pas à la Cbl.

Un autre groupe (Jiralspong *et al.*, 2009) a montré que les patients atteints à la fois de cancer et de diabète sucré (Mellitus), ont une meilleure réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. Ces patients recevaient la metformine, un bon antidiabétique mais qui connu pour provoquer aussi à une carence en Cbl. Les patients traités à la metformine sont aussi très souvent traités avec de la Cbl. Il serait intéressant de déterminer dans cette étude, si une

corrélation pourrait être établie entre les niveaux de Cbl et l'efficacité de la chimiothérapie.

En résumé...

Nous avons essayé de mettre en évidence un lien possible entre la cobalamine, l'activation de la phospholipase D et la répression du gène *MDR-1*. Afin de faciliter la lecture du manuscrit, un schéma récapitulatif des résultats, discutés jusqu'à maintenant, est donné ci-dessous (Fig.4.12). Nous rappelons que l'activation de la méthionine synthase par son cofacteur, la cobalamine (Cbl) conduit à : une augmentation de la production de la SAM et de la SAH, de la production de la PC, une activation de l'enzyme PLD et ceci conduit à une diminution de l'expression du gène *MDR-1* et de la présence de la protéine P-gp, ainsi qu'à une augmentation de la sensibilité des cellules HepG2 vis-à-vis d'un agent anticancéreux, la vinblastine.

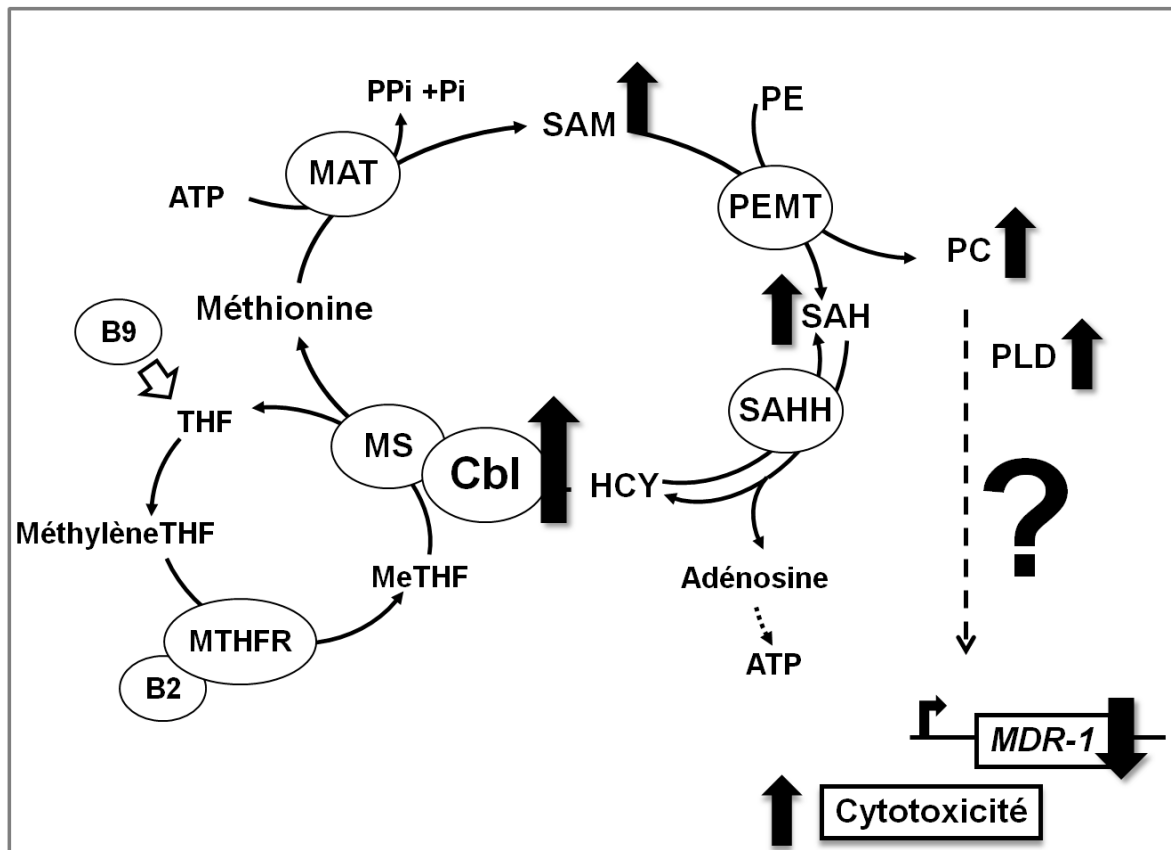


Figure 4.12 : La phospholipase D, un lien entre le cycle de la méthionine et le gène MDR-1. Nos résultats appuyent l'hypothèse que la diminution de l'expression du gène MDR-1 engendrée par la cobalamine, passe par l'activation de la phospholipase D (PLD). Cette modification de l'expression du gène s'accompagne par une augmentation de la sensibilité cellulaire vis-à-vis de la vinblastine.

Plusieurs questions émanent de ces premiers résultats. La plus évidente est celle du « comment », c'est-à-dire quelles sont les voies par lesquelles la cobalamine et la phospholipase D agissent sur l'expression du gène *MDR-1*. C'est cette question que nous allons tenter d'éclaircir dans la suite de ce travail.

2. Implication d'AKT dans la diminution de l'expression du gène *MDR-1* induite par la cobalamine.

Il y a un certain nombre d'arguments de la littérature qui étayent le fait qu'il puisse y avoir un lien possible entre la Cbl et l'expression du gène *MDR-1*. Ces éléments sont documentés dans la partie introductive de ce mémoire. En résumé on peut dire qu'il est connu qu'une inhibition d'Akt conduit à une inhibition de l'expression du gène *MDR-1* (Barancik *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2007) et que cette voie Akt peut également être influencée par la modification de la concentration intracellulaire de Cbl (Battaglia-Hsu *et al.*, 2009). Mais encore aucun travail n'avait fait un lien direct possible entre la Cbl, Akt et *MDR-1*.

Entreprendre d'étudier la voie Akt est ambitieux. Il s'agit d'une voie très complexe. La protéine Akt1 est responsable des voies de signalisation cellulaire nécessaires à la survie de la cellule. Son action jouerait un rôle dans l'inhibition de l'apoptose, l'induction de la synthèse protéique et par conséquent dans la prolifération des cancers. Il ne s'agissait édidemment pas pour nous d'étudier toute la complexité des interrelations entre Akt et le métabolisme cellulaire mais seulement de mettre en évidence dans un premier temps un lien possible entre l'activation du cycle de la méthionine (en l'activant par la Cbl, la phosphorylation d'Akt et l'expression de *MDR-1*).

Trois voies agissant sur Akt ont été choisies, afin d'étudier sur l'implication d'Akt dans le lien Cbl-*MDR-1*. Des inhibiteurs et/ou des activateurs de ces voies ont été utilisés, afin d'observer leurs effet sur l'expression du gène *MDR-1*. Ces trois voies sont la PI3K, la MEK et la PP2A. Ces voies ont été décrites dans la partie introductive de ce mémoire. Une autre question qui est d'importance dans cette étude est de savoir si et dans quelle mesure la PLD est impliquée / reliée à Akt et l'expression de *MDR-1*.

2.1. Implication des effecteurs de la phospholipase D sur l'expression de la protéine Akt.

Nous souhaitons tester l'hypothèse d'une éventuelle implication de la voie Akt dans la voie, PLD-dépendante, d'influence du gène *MDR-1* par la Cbl. Pour cela nous allons rechercher si la Cbl et les effecteurs de la phospholipase D modifient la phosphorylation d'Akt.

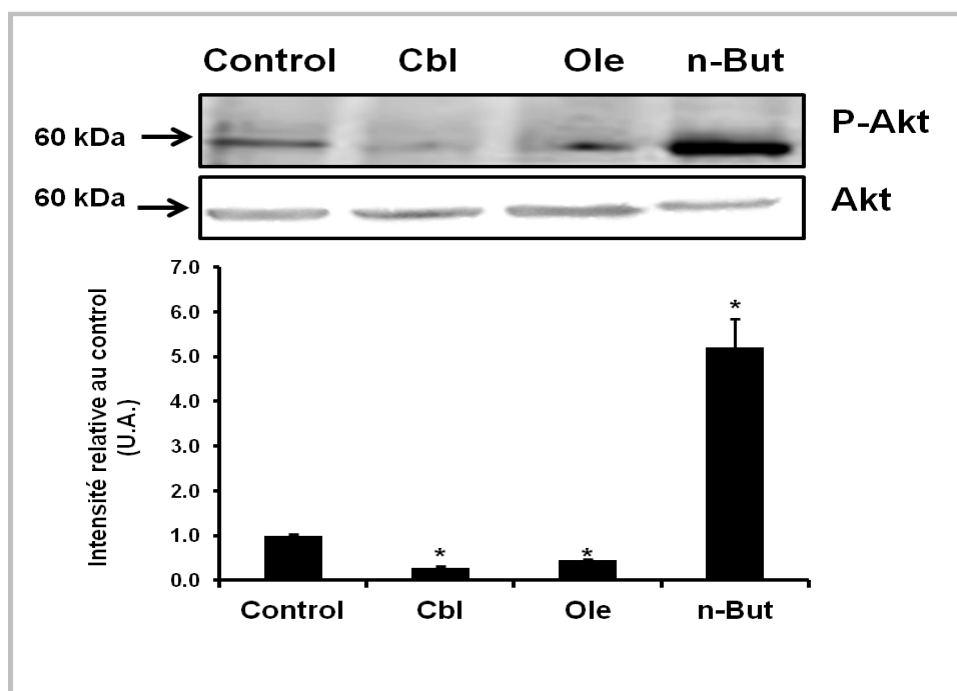


Figure 4.13 : Implication des effecteurs de la phospholipase D sur la phosphorylation d'Akt. Étude de l'expression de la protéine P-Akt, par Western blot, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M d'acide oléique (Ole); de 135 mM de n-Butanol (n-But) (P-Akt/Akt en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). L'histogramme montre les intensités relatives des bandes par rapport aux conditions témoin. Chaque histogramme représente les valeurs de numérisation des bandes de P-Akt sur celles d'Akt. Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

Les cellules HepG2 sont incubées en présence ou absence de 100 nM de cobalamine, de 20 μ M d'acide oléique ou de 135 mM de n-Butanol L'expression de la protéine P-Akt a été étudiée par Western blot. L'incubation des cellules avec de la Cbl, ainsi qu'avec de l'acide oléique, conduit à une diminution de l'expression de P-Akt (de 1 ± 0.02 pour le témoin jusqu'à 0.27 ± 0.04 et 0.45 ± 0.01 respectivement), alors que le n-Butanol induit une forte expression (5.20 ± 0.63) (Fig.4.13).

Nous trouvons ici des similarités avec les résultats obtenus lors de l'étude de l'effet de la cobalamine et des effecteurs de la PLD sur l'expression du gène *MDR-1*. La cobalamine diminue l'expression de P-Akt de la même façon qu'elle le fait pour *MDR-1*. En plus, les effecteurs de PLD agissent sur P-Akt de façon tout à fait comparable à leur action sur *MDR-1* et la protéine P-gp. L'utilisation du n-But augmente l'expression de la protéine P-Akt de cinq

fois par rapport à la condition témoin. L'acide oléique la diminue d'environ 50%. Il semble évident, si en plus nous tenons compte de la littérature exposée plus haut dans le chapitre, que le lien entre la PLD et la voie Akt est bien présent dans les cellules HepG2. Par ailleurs, la Cbl agit à la fois sur l'activité de la PLD et sur l'expression de la P-Akt. Pour l'instant, nous ne pouvons pourtant pas affirmer que l'implication de la cobalamine sur l'expression de P-Akt passe par la PLD.

Ce résultat souligne pour l'instant une tendance de « co-régulation » de la protéine P-Akt et du gène *MDR-1*.

2.2. Effet de l'activité du cycle de la méthionine sur l'expression de la protéine Akt.

L'activation de la méthionine synthase par la Cbl a conduit, comme nous avons vu auparavant, à une augmentation de la production de la SAM. Nous avons vu que la SAM conduisait à une diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Parallèlement, l'inhibiteur de la PEMT, le bézafibrate, provoque une augmentation de l'expression du gène *MDR-1*.

A ce niveau de l'étude, nous souhaitons examiner l'effet de ces acteurs du cycle de la méthionine, un métabolite et un inhibiteur, sur l'expression de la protéine P-Akt. Nous pourrions ainsi, nous assurer qu'il y a effectivement un lien entre ce cycle et la voie Akt et que ce lien est actif et influence véritablement l'expression de P-Akt.

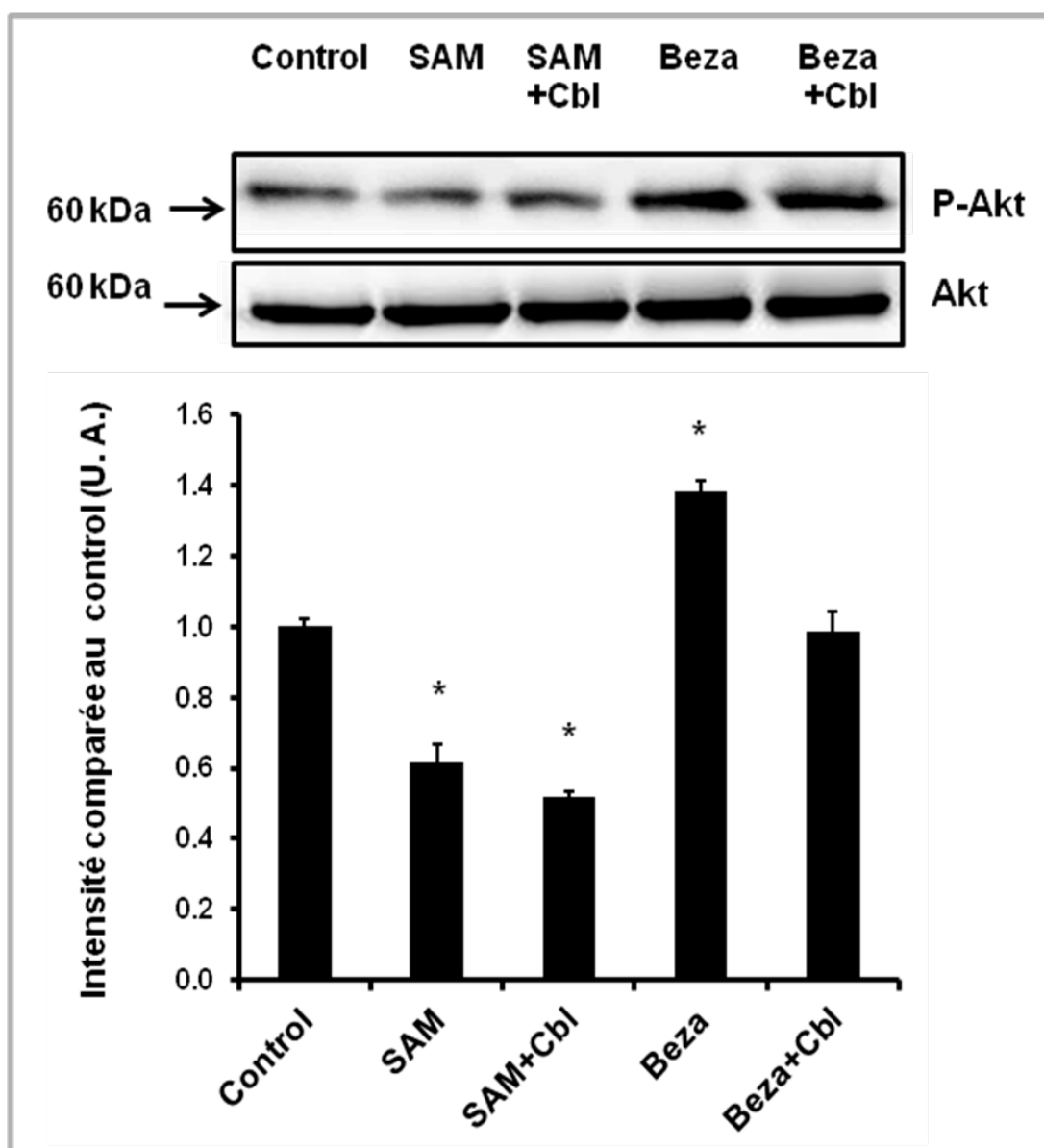


Figure 4.14: Implication de la SAM et du Bézafibrate sur expression de la protéine phospho-Akt. Étude de l'expression de la protéine P-Akt, par Western blot, en présence ou absence de 75 μ M de S-Adénosyl Méthionine (SAM), associée ou pas avec 100nM de cobalamine (Cbl) et de 10 μ M de bézafibrate (Beza) associée ou pas avec 100nM de cobalamine (Cbl) (P-Akt/Akt en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control)). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

L'incubation des cellules avec de la SAM, associée ou non à la Cbl, conduit à une diminution de la phosphorylation de la protéine Akt (de 1 ± 0.02 pour le témoin à 0.61 ± 0.05 et 0.51 ± 0.01 , respectivement). Pour le bézafibrate, nous observons une augmentation de P-Akt

(1.38 ± 0.03). La Cbl diminuera l'augmentation de P-Akt induite par le Bézafrate (0.98 ± 0.05). (Fig.4.14 et Fig.4.15). La SAM diminue l'expression de la protéine P-Akt de 40%, Cette diminution sera de 50 % si elle est associée à la Cbl.

L'association de la SAM à la Cbl diminuera l'expression de la P-Akt, de manière un peu plus importante que lorsque les agents sont utilisés seuls. Nous avons vu que la Cbl activait la PLD, et ce d'une manière encore non élucidée. La Cbl active aussi le cycle de la méthionine et fournit de la SAM utilisable pour les réactions de méthylation. A la fois la SAM et la PLD agissent sur la P-Akt. Nous pouvons alors penser que les effets de la SAM et de la Cbl puissent être additifs, l'effet de la Cbl passant par l'activation de la PLD. Il serait aussi logique de penser que l'effet de la SAM serait médié par une méthyltransférase.

Le bézafrate conduit à une augmentation de l'expression de la P-Akt de 40% par rapport au témoin. Cet effet est annulé quand il est associé à la cobalamine. Le bézafrate seul bloque la PEMT. En plus, nous avons vu qu'il augmentait l'expression du gène *MDR-1*. Ici aussi, nous pourrions penser au manque de spécificité du bézafrate qui active aussi la voie des PPAR α et que son action sur l'expression de la protéine P-Akt est possiblement dû à un effet sur cette voie. Ceci serait très intéressant à explorer dans le futur. Le fait que la cobalamine annule en partie l'effet du bézafrate, soutient l'hypothèse qu'elle agisse de façon indépendante de la PEMT, et éventuellement par la voie PPAR.

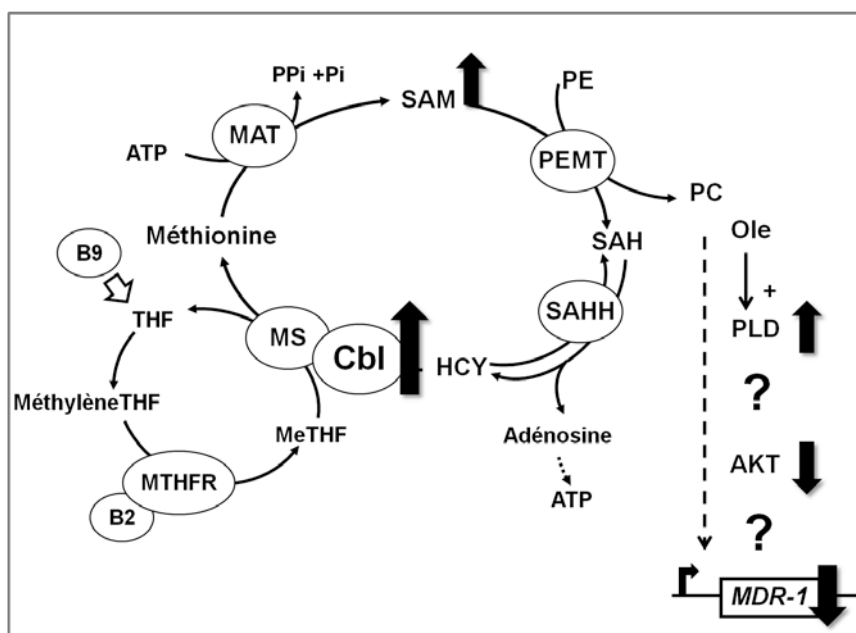


Figure 4.15: Action de la Cbl et de la SAM sur la PLD, la P-Akt et le MDR-1. La cobalamine et/ou la SAM conduisent à une augmentation de l'activité de la PLD, à une diminution de l'expression de la protéine phospho-Akt et à une diminution de l'expression du gène MDR-1.

Pour étudier un peu plus la relation entre Akt et MDR-1, nous allons poursuivre le travail en nous focalisant sur les trois voies agissant sur Akt qui ont été choisies. Nous utilisons, alors, des activateurs et/ou des inhibiteurs des voies PP2A, MEK et PI3K et nous observerons leurs effets sur l'expression du gène MDR-1.

2.3. Effet de la voie PP2A sur la régulation de MDR-1.

La première voie étudiée sera celle de PP2A, qui régule les décisions de survie ou de mort cellulaire, via la voie Akt, selon le contexte (Andrabi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2003). En plus, il a été récemment démontré qu'une carence en Cbl influençait le degré de phosphorylation de la PP2A, dans le cas du neuroblastome (Battaglia-Hsu *et al.*, 2009). La PP2A est une phosphatase, qui est connue pour diminuer la phosphorylation d'Akt en P-Akt. Un inhibiteur, l'acide okadaïque, et un activateur, l'acide palmitique, de cette protéine seront utilisés, afin de vérifier l'effet de cette voie sur l'expression du gène MDR-1.

Nous montrons que l'acide okadaïque (Fig.4.16) augmente l'expression de P-Akt d'environ 87% (de 1 ± 0.02 pour le témoin (control), à 1.87 ± 0.15), alors que lorsqu'il est associé à la Cbl, l'expression de P-Akt ne s'élève qu'à 1.56 ± 0.11). L'acide palmitique, en revanche, provoque une diminution de l'expression de P-Akt (de 1 ± 0.02 à 0.64 ± 0.03) et lorsqu'il est associé à la Cbl, cette diminution est encore plus prononcée (0.37 ± 0.10).

Nous montrons ici, par cette expérience, un effet de ces deux composés sur l'expression de la P-Akt. La PP2A est connue pour inhiber la protéine phospho-Akt. En utilisant un inhibiteur de la PP2A, l'acide okadaïque, nous levons l'action d'inhibition de la PP2A sur P-Akt. Une inhibition, qui annule l'autre, a comme résultat l'activation de la cible finale. C'est exactement ce que nous obtenons. L'expression de la P-Akt augmente de 87% quand nous utilisons l'acide okadaïque. La combinaison de ce produit avec la cobalamine conduit à une augmentation de l'expression de la P-Akt de 56% par rapport au témoin et à une diminution de 30% par rapport à la condition où une association d'acide okadaïque et de Cbl est ajoutée aux cellules. Nous avons vu précédemment que la Cbl seule diminuait l'expression de P-Akt d'environ 70%. Ici son effet n'est pas aussi prononcé puisqu'il est contrebalancé par celui de l'acide okadaïque. Ceci pourrait être un indicateur du fait que la Cbl pourrait agir sur la P-Akt *via* PP2A.

L'acide palmitique est un activateur de la PP2A. Nous rappelons que la PP2A inhibe la P-Akt. Donc une activation de l'inhibition doit résulter à une inhibition de la cible finale, qui est la P-Akt. C'est aussi le cas. L'acide palmitique seul diminue l'expression de la P-Akt de 35% par rapport au témoin. Son association à la Cbl conduit à une diminution de la P-Akt de 60%. La Cbl renforce l'effet de l'acide palmitique de 25%. Ceci aussi constitue un indicateur que la Cbl agisse sur P-Akt par la voie de la PP2A.

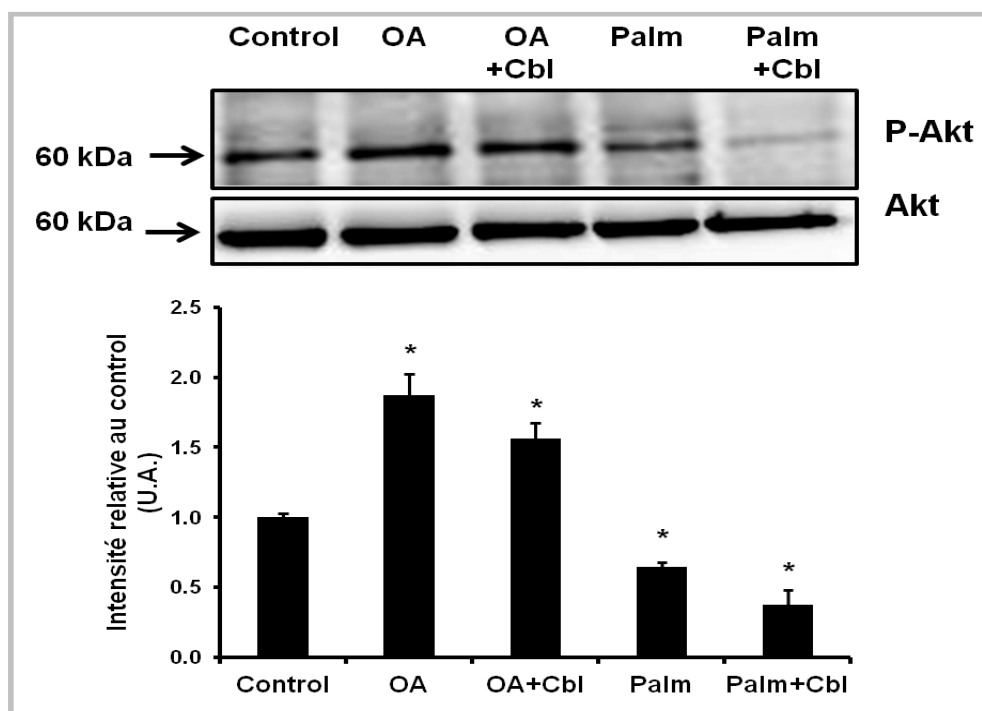


Figure 4.16: Implication des effecteurs de la PP2A sur l'expression de la protéine phospho-Akt. Étude de l'expression de la protéine P-Akt, par Western blot, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl) associée ou non à 100 μ M d'acide okadaïque (OA) ou à 100 μ M d'acide palmitique (Palm) (P-Akt/Akt en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control)). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

Il existe une méthylase intéressante dans le cadre de cette étude qui est la protéine phosphatase méthyl transférase (PPMT). Cette transférase permet une modification postraductionnelle de la PP2A par méthylation. Il s'agit ici pour nous de voir si la Cbl, en activant la génération de SAM conduirait à une méthylation de cette transférase. L'étude de la méthylation de PP2A a été recherchée par Western-blotting. Nous observons (Fig.4.17) que la protéine PP2A méthylée est exprimée dans les cellules HepG2 (témoin : 1 ± 0.02), et que cette méthylation est augmentée quand les cellules sont incubées avec de la Cbl (2.33 ± 0.28).

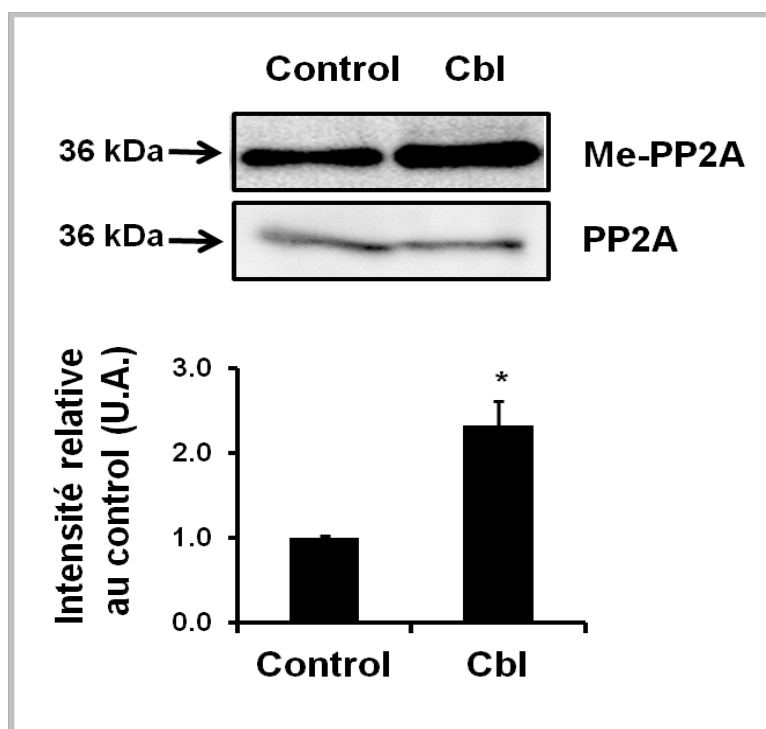


Figure 4.17: Influence de la cobalamine sur l'expression de la Me-PP2A. Étude de l'expression de la protéine Me-PP2A, par Western blot, en présence ou en absence de 100 nM de cobalamine (Cbl) (Me-PP2A/PP2A en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control)). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

La PP2A est une protéine présente dans les cellules HepG2. Elle est régulée par méthylation grâce à la méthyltransférase PPMT qui est une transférase SAM dépendante. La Cbl, comme nous avons vu précédemment, active la méthionine synthase et ainsi le cycle de la méthionine, qui est le donneur cellulaire des méthyles, méthyles utilisés par la suite pour la méthylation de PP2A. En conséquence, nous suggérons, à partir de notre résultat, que la Cbl pourrait agir en partie sur l'expression de la protéine P-Akt en activant le cycle de la méthionine, puis en provoquant la méthylation de la PP2A qui va par la suite inhiber la phosphorylation d'Akt.

Nous avons alors recherché quel pouvait être l'effet de ces effecteurs de la PP2A, sur l'expression du gène *MDR-1*. Les résultats sont présentés dans la figure 4.18. L'inhibiteur de PP2A, l'acide okadaïque, conduit à une augmentation de l'expression du gène *MDR-1* par

rapport au témoin (passant de 1 ± 0.01 à 1.53 ± 0.04). Cette augmentation est annulée quand il est ajouté en association à la Cbl (1.04 ± 0.01).

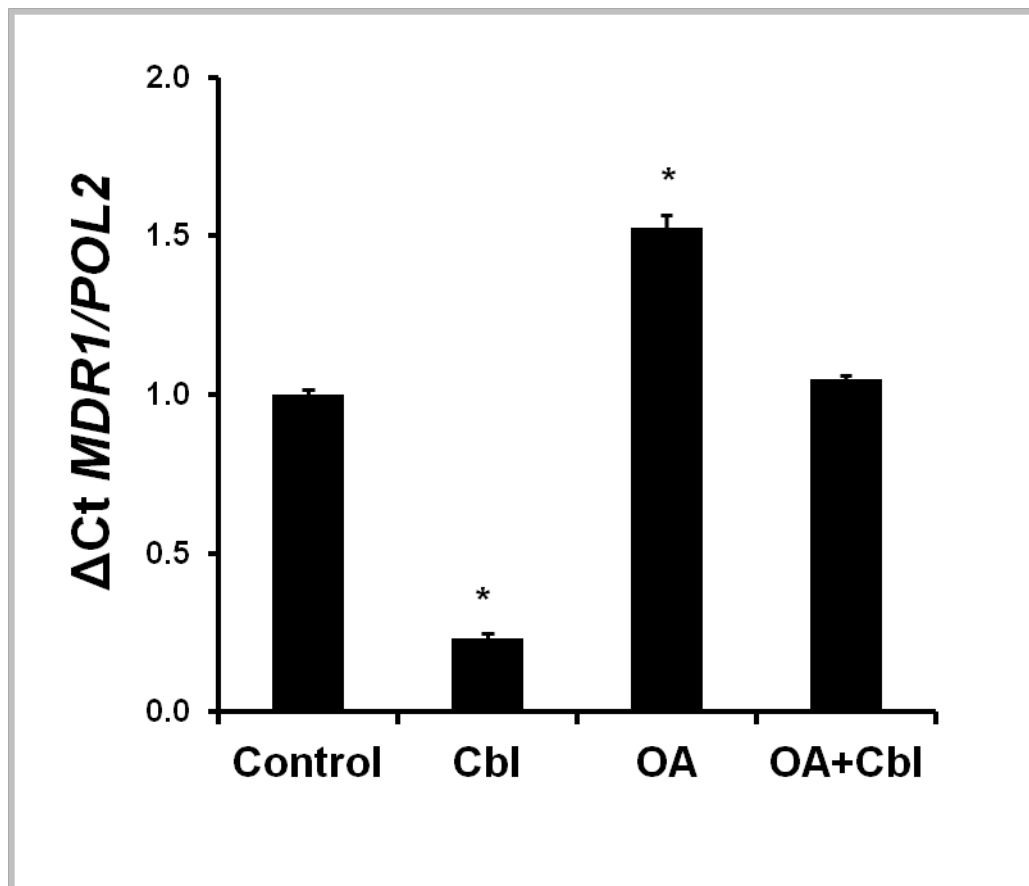


Figure 4.18: L'action de l'acide okadaïque, inhibiteur de la PP2A, sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 10nM d'acide okadaïque (OA); ou d'un mélange de 10nM de d'acide okadaïque et de 100 nM de cobalamine (OA+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

L'acide okadaïque est un inhibiteur de la PP2A. La PP2A elle-même inhibe la protéine Akt. Nous avons vu précédemment que l'acide okadaïque provoquait une augmentation de l'expression de la P-Akt et, aussin comme nous le constatons ici, une augmentation de l'expression du gène *MDR-1* de 50% par rapport au témoin. Il est clair alors que, dans les cellules HepG2, l'expression du gène *MDR-1* est influencée par la PP2A via la voie Akt.

Lorsque nous ajoutons aux cellules un mélange de Cbl et d'acide okadaïque, nous voyons que la Cbl diminue l'augmentation de l'expression du gène *MDR-1*, provoquée par l'acide okadaïque. Il semblerait donc, que la Cbl agisse sur l'expression du gène *MDR-1* en influençant la PP2A et ensuite P-Akt.

A l'inverse, l'activateur de PP2A, l'acide palmitique, provoque une diminution de l'expression de *MDR-1* par rapport au témoin (de 1 ± 0.01 pour le control, à 0.50 ± 0.01) (Fig.4.19) et cette diminution est plus importante quand ce l'acide palmitique est ajouté en combinaison la Cbl (0.43 ± 0.03).

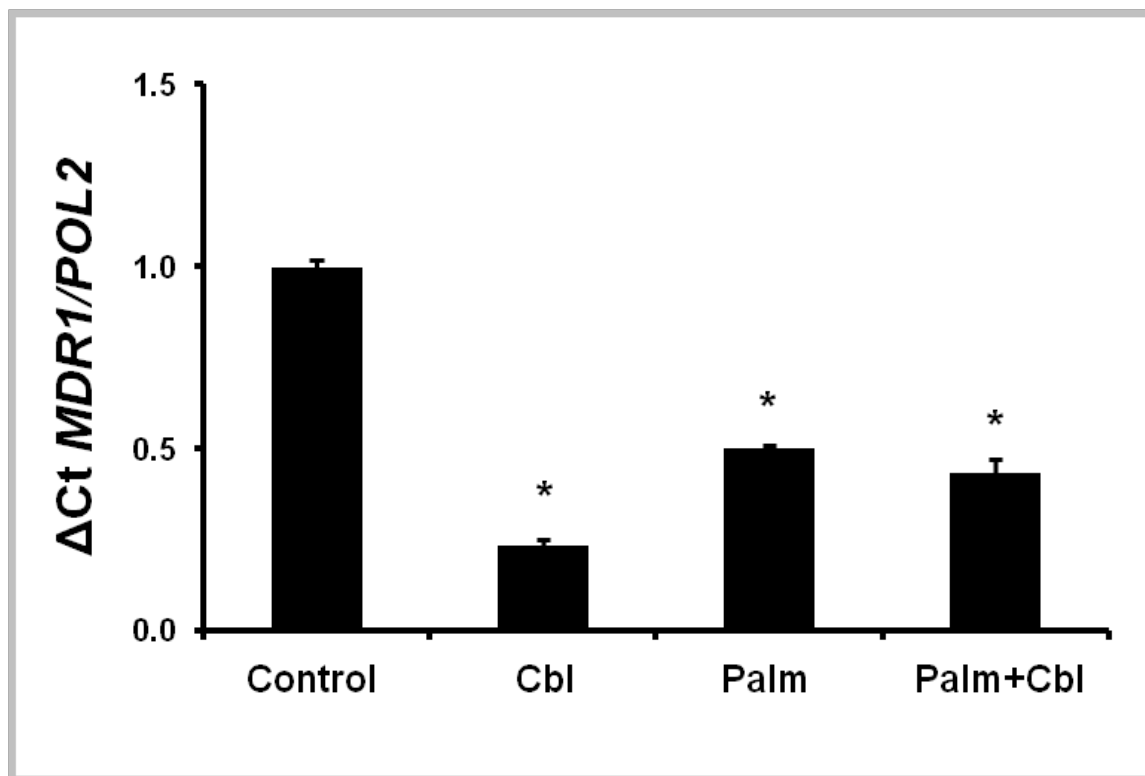


Figure 4.19: Action de l'acide palmitique, activateur de la PP2A, sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 100 μ M d'acide palmitique (Palm); d'un mélange de 100 μ M de d'acide palmitique et de 100 nM de cobalamine (Palm+ Cbl). * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

L'acide palmitique active la PP2A et nous avons observé qu'il diminuait la formation de la P-Akt. Ici, nous constatons que, l'acide palmitique conduisait également à une diminution de l'expression du gène *MDR-1* de 50% par rapport au témoin. Ici encore, nous pouvons raisonnablement émettre l'hypothèse que la voie de la PP2A influence le gène *MDR-1*, probablement *via* son action sur la voie Akt.

Quand l'acide palmitique est associé à la Cbl, la diminution de l'expression du gène *MDR-1* est de 57% par rapport au témoin et de 7% par rapport à la condition d'utilisation de l'acide palmitique seul. L'effet de la Cbl sur l'expression du gène *MDR-1* pourrait passer par la voie PP2A, inhibitrice de celle d'Akt.

Pour résumer, si nous intégrons nos différents résultats, nous pouvons proposer la chaîne métabolique suivante : la Cbl active le cycle de la méthionine, qui conduit à une activation des méthyltransférases, telles que la PPMT. La PPMT méthyle la protéine PP2A et donc la rend active. Cet effet peut être obtenu également par l'acide palmitique. Une activation de PP2A conduit à une diminution de l'expression de la protéine P-Akt, puisque la voie PP2A est une voie inhibitrice de celle d'Akt. L'activation de la voie PP2A par la Cbl ou par l'acide palmitique a aussi comme résultat la diminution de l'expression du gène *MDR-1* (Fig.4.20). Il n'est pas à exclure que la Cbl agisse sur Akt ou même sur *MDR-1* aussi partiellement par des voies parallèles et indépendantes de la voie PP2A. Ces résultats attirent notre attention puisque, une vitamine et un acide gras réussissent à diminuer l'expression de l'acteur principal de la chimiorésistance, le gène *MDR-1*. Ceci pourrait être une voie métabolique, sur laquelle nous pourrions agir avec des produits combinés à la cobalamine, afin peut être d'éviter ou de limiter le phénomène de chimiorésistance.

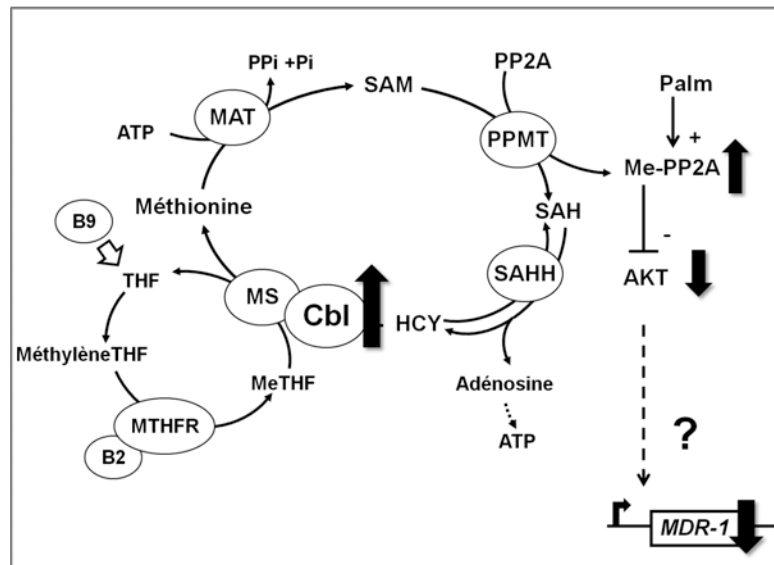


Figure 4.20 : Lien possible entre la Cbl, la Me-PP2A, Akt et MDR-1. L'acide palmitique, mais aussi la cobalamine augmentent l'expression de la Me-PP2A et conduisent à la déphosphorylation de la protéine Akt qui est accompagnée d'une diminution de l'expression du gène MDR-1.

2.4. Effet de la voie MEK sur la régulation de *MDR-1*.

La deuxième voie de régulation d'Akt que nous avons choisi d'étudier a été celle des MAPK ou MEK, voie connue d'activation d'Akt, mais aussi impliquée dans le gliome (Robinson *et al.*, 2010). Ce choix repose surtout sur le fait que MEK peut être régulé par le produit de la PLD, l'acide phosphatidique (Andresen *et al.*, 2002). Les deux inhibiteurs avec lesquels nous allons travailler sont : l'U0126 (IC_{50} 72 nM MEK1; 58 nM MEK2) (inhibition directe de l'activité MEK) et le PD98059 (IC_{50} MEK1 4 μ M, MEK2 50 μ M) (inhibition de l'activation de MEK). Nous allons rechercher leurs effets sur la phosphorylation d'Akt et sur l'expression du gène *MDR-1*.

Nous observons que l'ajout d'U0126 aux cellules conduisait à une augmentation de l'expression de P-Akt d'environ 70% par rapport au témoin, alors qu'associé à la Cbl, l'expression de P-Akt n'augmentait que de 58% (Fig.4.21). Le PD98059, associé ou non à la Cbl, provoque une diminution de l'expression de P-Akt d'environ 60%, par rapport au témoin.

Ces deux produits sont considérés tous les deux comme des inhibiteurs de la voie MEK, qui est une voie activatrice d'Akt. Une inhibition de la voie MEK par ces produits devrait alors conduire à une diminution de l'expression de P-Akt. Comme nous pouvons le voir sur la figure 4.21, ce n'est pas le cas. Le PD98059, associé ou non à la cobalamine, conduit à une diminution de l'expression de la protéine P-Akt. Il a été montré que le PD98059 est un inhibiteur hautement sélectif de l'activation de la MEK1 et de toute la voie de signalisation des MAPK (Crews *et al.*, 1992 ; Cowley *et al.*, 1994). Nous pouvons, ainsi conclure que dans les cellules HepG2 la MEK1 peut influencer l'expression de la P-Akt.

L'utilisation d'U0126 n'a pas eu comme résultat l'inhibition de la P-Akt. Au contraire, nous observons une activation de l'expression de la P-Akt. Ce résultat nous a surpris et n'est pas en accord avec celui observé après l'ajout de PD98059. Ceci pourrait être la conséquence d'un artefact expérimental, surtout en utilisant des produits sensibles à la température, comme l'U0126. Nos conditions expérimentales (24 H de traitement à 37°C) ne nous permettent peut être pas une utilisation optimale de ce composé. Nous pouvons aussi penser que dans le cas des cellules HepG2, comme ce produit inhibe MEK2 préférentiellement, par rapport à MEK1, MEK1 serait celle qui active P-Akt et MEK2 induirait une voie d'inhibition de P-Akt. Il sera

nécessaire d'utiliser d'autres effecteurs de cette voie, pour pouvoir nous renseigner plus sur l'implication possible de la voie MEK sur la phosphorylation d'Akt et sur l'expression du gène *MDR-1*.

Quoi qu'il en soit, une observation qui reste intéressante est que la Cbl associée aux deux inhibiteurs ne modifie pas l'expression de P-Akt par rapport à l'expression observée lors de l'utilisation des inhibiteurs seuls. On peut penser que la voie MEK pourrait effectivement (si nous nous référons à l'effet du PD 98059) affecter la phosphorylation d'Akt. Cependant le fait que la Cbl ne modifie en rien les actions des deux composés utilisés ne plaide pas en faveur de l'implication de la MEK dans les effets de la Cbl sur la phosphorylation d'Akt. Il est aussi possible toutefois que la Cbl puisse agir sur la P-Akt, mais *en amont* de la voie MEK. Ainsi son effet serait masqué par les effecteurs de cette voie.

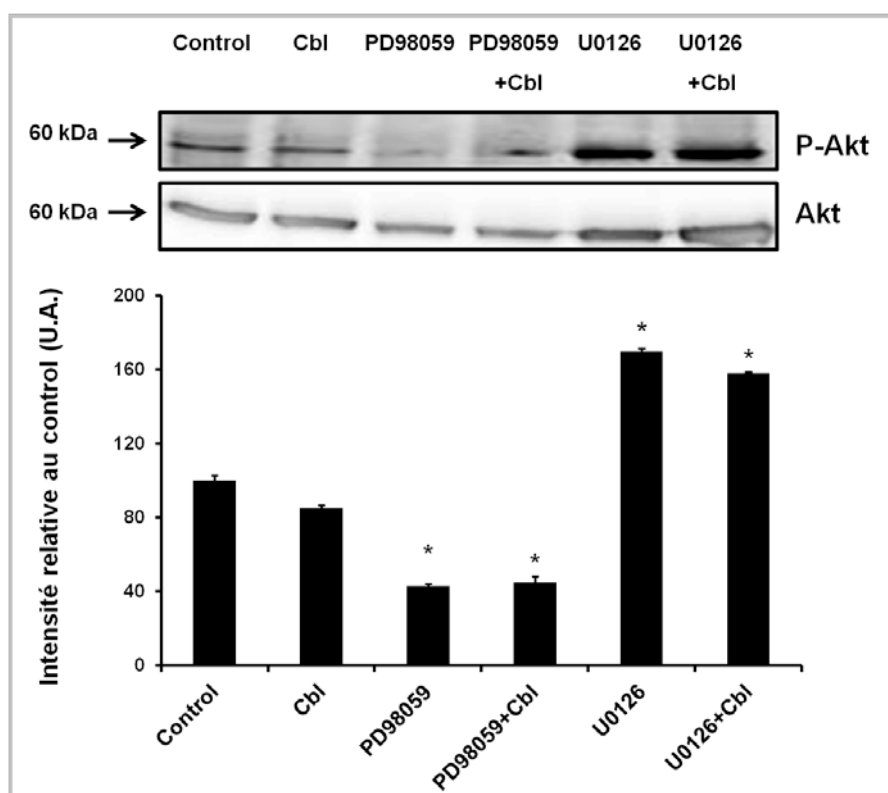


Figure 4.21: Implication des effecteurs de la voie MEK sur l'expression de la protéine phospho-Akt. Étude de l'expression de la protéine P-Akt, par Western blot, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl), associée ou non à 20 μ M de PD98059 ou à 20 μ M de U0126. P-Akt/Akt en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

Nous avons voulu ensuite vérifier si les inhibiteurs de la voie MEK agissaient sur l'expression du gène *MDR-1* (Fig.4.22 et Fig.4.23). L'U0126 ne semble pas modifier l'expression du gène (1.09 ± 0.01) par rapport au témoin (1 ± 0.01), alors qu'associé à la cobalamine l'expression du gène *MDR-1* diminue fortement (0.025 ± 0.01).

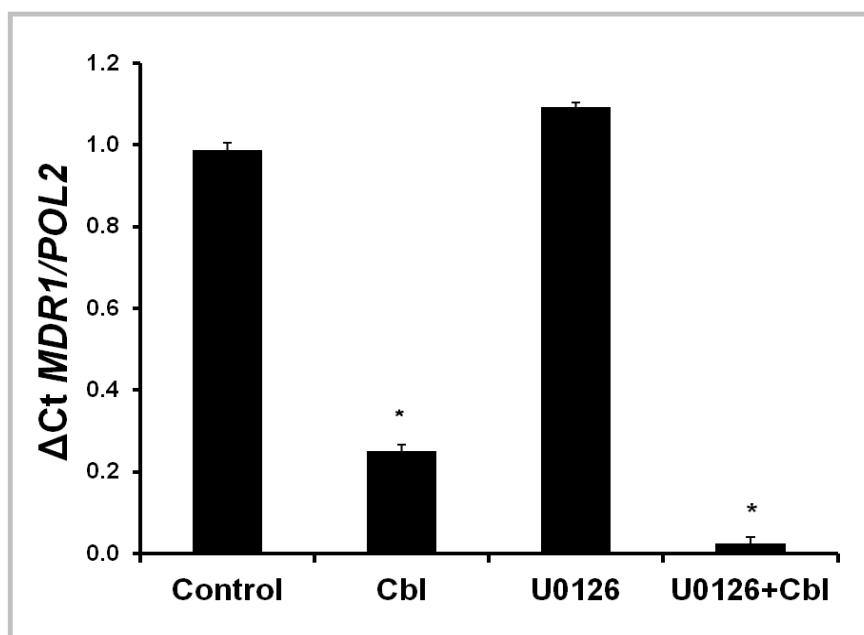


Figure 4.22: Action de l'U0126, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M de U0126; d'un mélange de 20 μ M de U0126 et de 100 nM de cobalamine (U0126+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Le PD98059 augmente faiblement (1.12 ± 0.009) l'expression du gène *MDR-1*. Par contre, une association avec la Cbl conduit également à une forte diminution de l'expression de ce gène (0.11 ± 0.01).

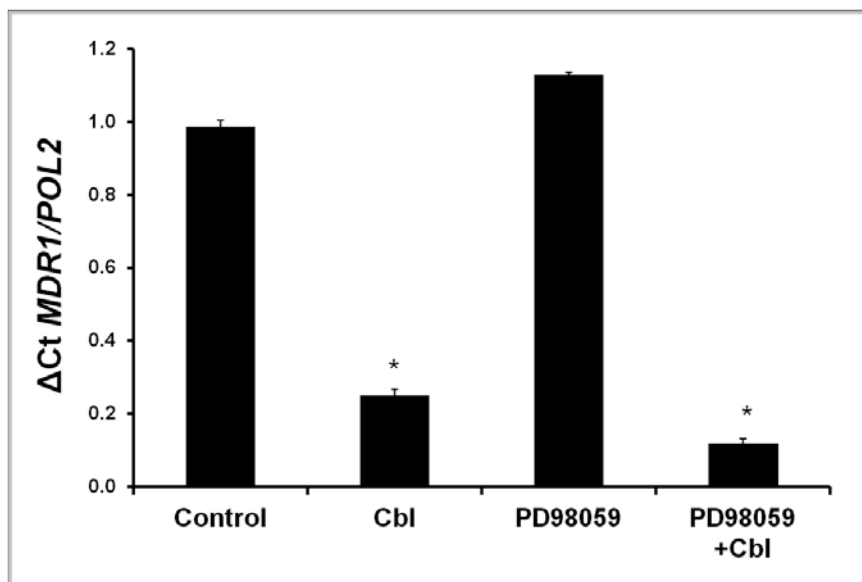


Figure 4.23: Action de PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M de PD98059; d'un mélange de 20 μ M de PD98059 et de 100 nM de cobalamine (PD98059+ Cbl). * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Il semble qu'aucune des deux molécules n'influence l'expression du gène, quand elle est utilisée seule (Fig.4.22 et Fig.4.23). Leur association avec la cobalamine conduit à une très diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Ces deux inhibiteurs ne semblent donc ne pas avoir d'effet seul mais semblent potentialiser la diminution de l'expression du gène *MDR-1* induit par la Cbl. Ceci suggère aussi que les voies inhibées par ces deux composés ne participent probablement pas aux mécanismes étudiés dans notre travail, même s'ils peuvent avoir un effet par eux même sur Akt ou sur l'expression du gène *MDR-1*.

2.5. Effet de la voie PI3K sur la régulation de *MDR-1*.

La troisième voie d'activation d'Akt que nous avons étudiée, est celle de la phosphorylation par la PI3K, qui est une voie bien connue (Franke *et al.*, 1997). Nous avons

utilisé les inhibiteurs de PI3K suivants : le LY294002 (IC_{50} 1,4 μ M, réversible) et la wortmannine (IC_{50} 5nM, irréversible) et nous avons observé leur effet sur l'expression du gène *MDR-1* et sur l'expression de la protéine codée par ce gène, la P-gp.

L'utilisation de l'inhibiteur de PI3K, LY294002, conduit à une diminution de l'expression du gène *MDR-1* (de 1 ± 0.01 pour le témoin, à 0.62 ± 0.12), diminution plus prononcée lorsqu'il est utilisé en association avec la Cbl (0.12 ± 0.03) (Fig.4.24). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque nous avons examiné l'expression de la protéine P-gp (Fig.4.26) sous l'action du LY294002. Quand il est utilisé seul, il diminue l'expression de la protéine P-gp de 30% par rapport au témoin. Quand il est associé à la Cbl, cette diminution est de 60% par rapport au témoin.

La voie de PI3K active la phosphorylation de la protéine Akt. Une inhibition de cette voie conduit à une inhibition de la P-Akt. Nous observons alors que, une inhibition de la voie PI3K/Akt conduit à une diminution de l'expression du gène *MDR-1*, inhibition renforcée dans le cas de l'association de l'inhibiteur LY294002 à la Cbl. Il est possible alors que la cobalamine agisse sur l'expression du gène *MDR-1* aussi *via*, ou en synergie avec, la voie PI3K/Akt.

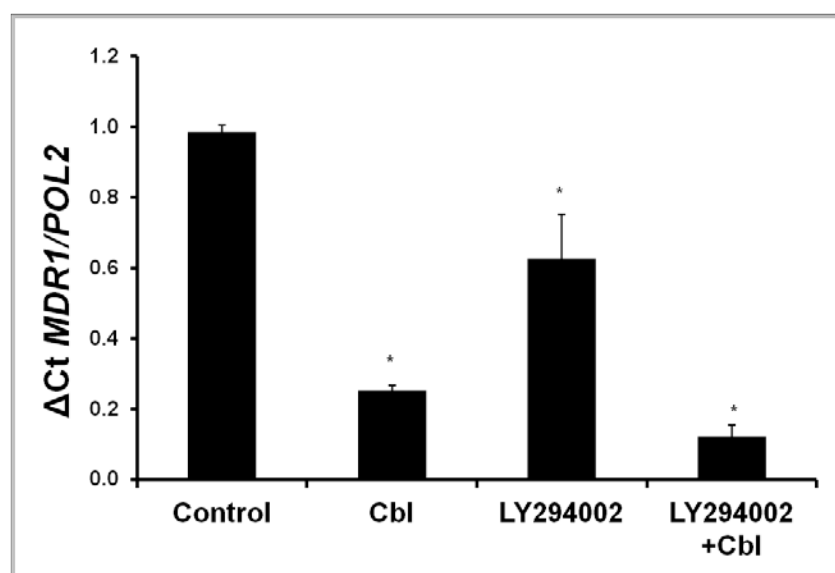


Figure 4.24: Action de LY294002, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M de LY294002; d'un mélange de 20 μ M de LY294002 et de 100 nM

de cobalamine (LY294002 + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

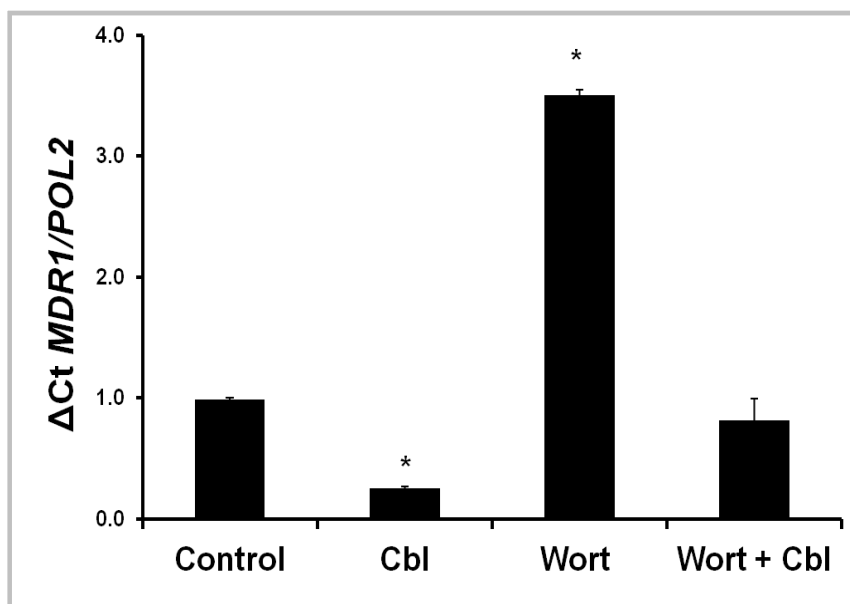


Figure 4.25: Action de la wortmannine, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène MDR-1. Étude de l'expression du gène MDR-1, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 100nM de Wortmannine (Wort); d'un mélange de 100nM de Wortmannine et de 100 nM de cobalamine (Wort + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

L'utilisation du second inhibiteur de la PI3K que nous avons utilisé, la wortmannine, conduit à une augmentation de l'expression du gène *MDR-1* (de 1 ± 0.01 pour le témoin, à 3.50 ± 0.04). Cette augmentation est diminuée lorsqu'il est utilisé en association avec la cobalamine (0.81 ± 0.17) (Fig.4.25). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque nous avons examiné l'expression de la protéine P-gp, sous l'action de la wortmannine associée ou non à la cobalamine (Fig.4.26). Quand elle est utilisée seule la wortmannine provoque une augmentation de l'expression de la P-gp de l'ordre de 180%, effet qu'ici aussi est réduit par la cobalamine, puisque l'expression de la P-gp revient au niveau de celle du témoin (100%).

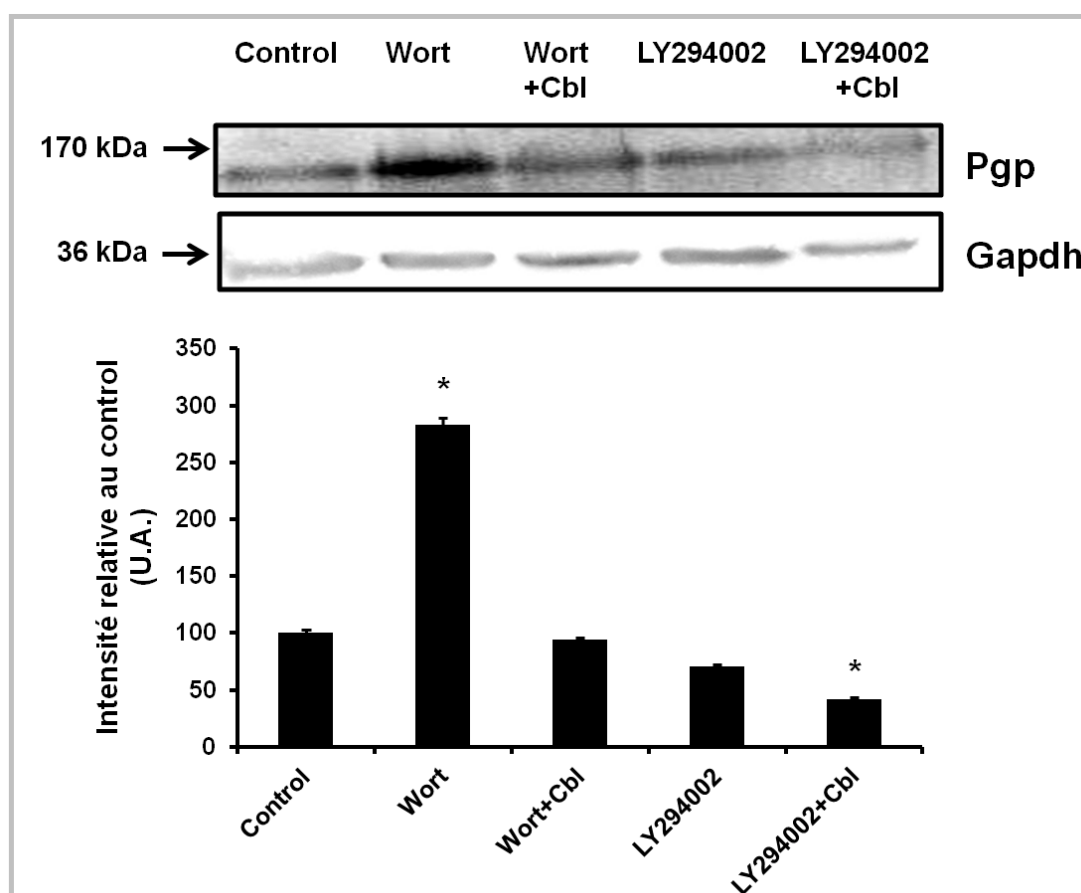


Figure 4.26: Action des inhibiteurs de PI3K, sur l'expression la protéine P-gp. Étude de l'expression de la protéine P-Akt, par Western blot, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl), associée ou non à 100nM de Wortmannine (Wort) ou à 20 μ M de LY294002. P-gp/Gapdh en unités arbitraires ; * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°13).

Dans le cas d'utilisation de ce deuxième inhibiteur, de la voie PI3K/Akt, une diminution de l'expression du gène *MDR-1* était attendue. C'est le contraire que nous avons observé. Ces observations peuvent être expliquées par des spécificités et des capacités à inhiber la voie PI3K qui sont différentes. Le LY294002 est un inhibiteur spécifique de PI3K, alors que la wortmannine est beaucoup moins spécifique. En plus, la wortmannine est également un inhibiteur de la phospholipase D (PLD) (Carrasco-Marin *et al.*, 1994). Ceci pourrait expliquer son effet d'augmentation de l'expression du gène *MDR-1* et de la protéine P-gp, puisqu'il agit de la même façon que le n-Butanol (inhibiteur de la PLD utilisé précédemment). Ce résultat pourrait appuyer le lien entre la voie PLD et *MDR-1*, puisqu'un

inhibiteur de la PLD, de nature différente du n-Butanol, agit de la même façon que le n-But, en activant l'expression du gène *MDR-1* et de la protéine P-gp. Nous pouvons alors considérer la wortmannine comme étant ici un inhibiteur de la PLD. Il sera nécessaire de compléter cette étude avec l'utilisation d'autres inhibiteurs spécifiques de la PI3K.

Ces résultats ne permettent pas, à l'heure actuelle, de mettre en évidence un lien quelconque entre l'activation de la voie Akt par cette voie PI3K, l'expression du gène *MDR-1* et le cycle de la méthionine. Nous pouvons seulement suggérer que la PI3K et la Cbl pourraient avoir des effets synergiques sur l'expression du gène *MDR-1*.

En résumé...

Dans cette partie du travail, nous avons mis en évidence un lien entre la protéine Akt et le cycle de la méthionine, puisque une activation du cycle, par la cobalamine ou par la SAM, conduit à une diminution de la phosphorylation d'Akt. Un effet inverse a lieu quand le cycle de la méthionine est bloqué, au niveau des méthyltransférases, par le bézafibrate. Nous avons vu aussi qu'une activation de la PLD, par l'acide oléique, conduisait à une diminution de l'expression de P-Akt. Une co-régulation d'Akt et du gène *MDR-1* est ainsi constatée. Nous avons aussi associé cette diminution de l'expression de P-Akt et de *MDR-1*, à une inhibition de P-Akt par la Me-PP2A, effet observé quand une augmentation de la méthylation de cette protéine a lieu, grâce à la cobalamine, ainsi que quand l'activateur de la PP2A, l'acide palmitique, est utilisé (Fig.4.27).

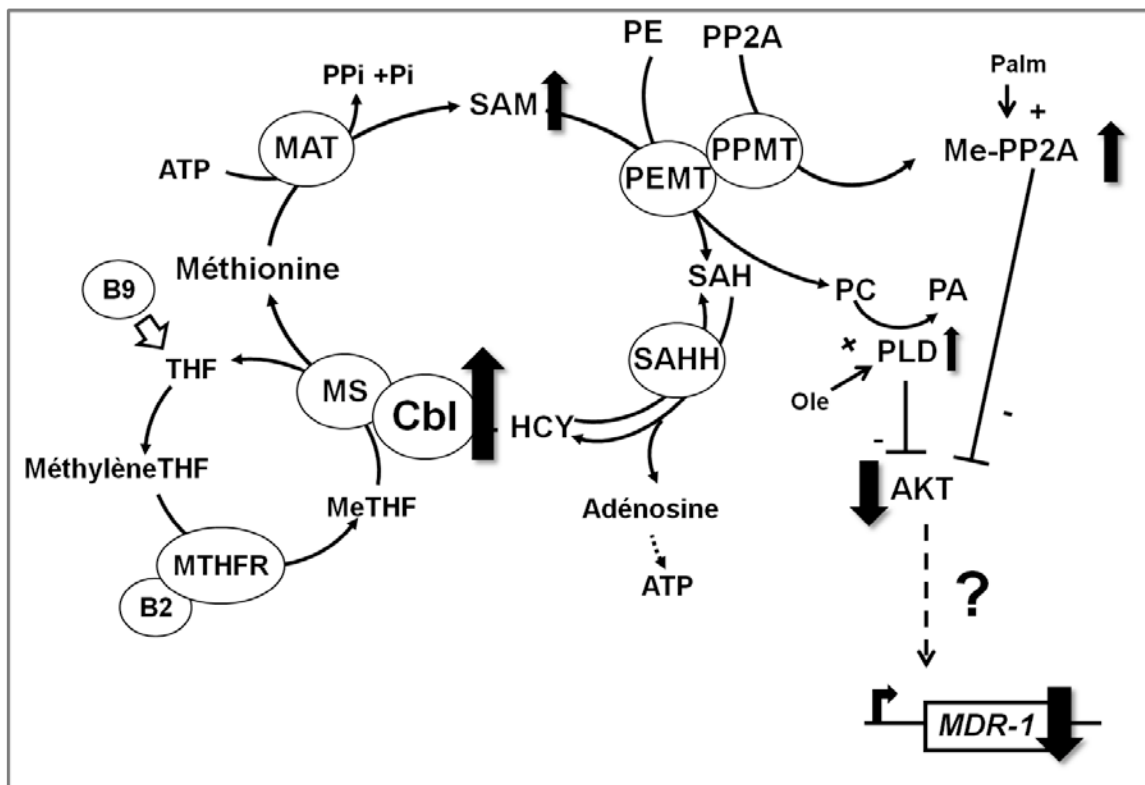


Figure 4.27: Action de l'inhibition d'Akt sur l'expression du gène MDR-1. La cobalamine et/ou la SAM activent l'activité de la PLD et de la Me-PP2A. En plus, la PLD est activée par l'acide oléique et la Me-PP2A par l'acide palmitique. Ces deux voies semblent diminuer l'expression de P-Akt, ce qui s'accompagne par une diminution de l'expression du gène MDR-1.

Dans le travail présenté jusqu'ici, nous avons apporté des éléments, appuyant l'hypothèse que la voie PLD et la voie Akt soient des voies reliant la cobalamine au gène *MDR-1*. Nous avons aussi émis l'hypothèse d'une possible implication de la voie Cox-2 qui relierait la cobalamine et l'expression du gène *MDR-1*. Nous continuons ce mémoire par la présentation des résultats appuyant l'implication de Cox-2 dans la voie de signalisation que nous étudions.

3. Implication de Cox-2 dans la voie, PLD/AKT-dépendante, de diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine.

Il existe un certain nombre de données de la littérature, qui montrent une liaison entre Cox-2 et le cancer et la chimiorésistance ou encore entre Cox-2 et la voie des phospholipides ou encore entre Cox-2 et la voie Akt. Ces données sont documentées dans la perite introductive de ce mémoire. Toutefois, il reste un certain nombre de questions qui sont à l'heure actuelle encore non résolues.

- Est-ce que la cobalamine et le cycle de la méthionine agissent sur l'expression du gène Cox-2 ?
- Est-ce que les voies PI3K, MEK et PP2A, qui influencent la voie Akt, agissent sur Cox-2 ?
- Est-ce que la voie PLD agit sur l'expression du gène Cox-2 ?
- Est-ce que la voie Cox-2 influence l'expression du gène *MDR-1* par l'intermédiaire des voies Akt et PLD ?

Ce sont à ces questions que nous avons voulu répondre dans cette dernière partie de notre travail.

3.1. Diminution de l'expression du gène Cox-2 par la cobalamine.

Nous avons vu précédemment, que la Cbl diminuait l'expression du gène *MDR-1*. Nous avons souhaité savoir si la Cbl agissait de la même façon sur le gène Cox-2. Nous avons incubé les cellules HepG2 avec 100 nM de Cbl et mesuré par q-RT-PCR le niveau des transcrits de Cox-2. Les résultats sont reportés dans la Fig.4.28. Nous observons que la Cbl induisait une diminution de l'expression du gène Cox-2 ($0,05 \pm 0,004$), par rapport au témoin ($0,36 \pm 0,06$). La cobalamine diminue ainsi l'expression du gène Cox-2 de plus de 85%. Le résultat est comparable à la diminution de l'expression du gène *MDR-1* induite par la Cbl, qui était de 80% par rapport au témoin.

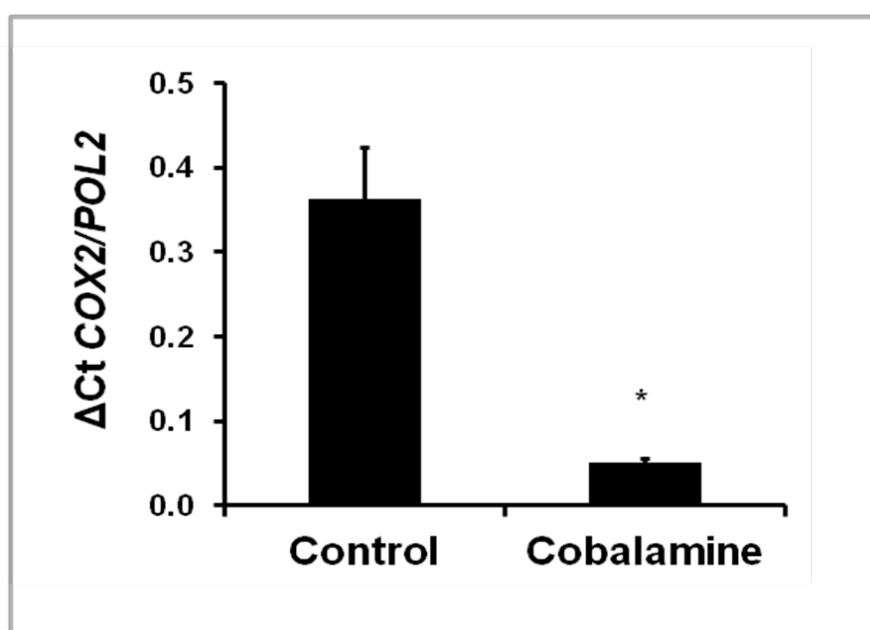


Figure 4.28: Influence de la cobalamine sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en absence ou présence de 100nM de cobalamine. *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

3.2. Effet de l'activité du cycle de la méthionine sur l'expression du gène Cox-2.

Nous avons poursuivi notre travail en étudiant l'effet de la SAM sur l'expression du gène Cox-2. Théoriquement nous devrions nous attendre à un effet similaire à celui de la Cbl. Effectivement, nous trouvons que la SAM conduit également à une réduction de l'expression du gène Cox-2 (0.21 ± 0.04) par rapport au témoin. Cette diminution est beaucoup plus importante quand la SAM est associée à la Cbl (0.02 ± 0.008) (Fig.4.29).

La SAM est un métabolite du cycle de la méthionine qui active les voies de son utilisation lorsque sa concentration intracellulaire augmente. Quand elle est utilisée seule elle active la voie de transméthylation. Elle est aussi le substrat de la PPMT. Nous rappelons que la PPMT est la méthyltransférase qui est responsable de la méthylation et donc de l'activation de la protéine PP2A. Nous avons vu qu'une activation de la PP2A conduisait à une diminution de l'expression de la protéine P-Akt, et aussi du gène *MDR-1*. Il est alors possible que cette voie agisse de la même façon sur le gène Cox-2. Cette hypothèse sera évaluée dans la suite du travail.

L'association de la Cbl à la SAM conduit à une potentialisation de la diminution de l'expression du gène *Cox-2*. Cet effet est aussi comparable à celui exercé sur l'expression du gène *MDR-1* par ces deux mêmes composés. Les deux composés sont capables d'activer le cycle de la méthionine et d'accélérer ou de renforcer la voie agissant sur l'expression des gènes *Cox-2* et *MDR-1*.

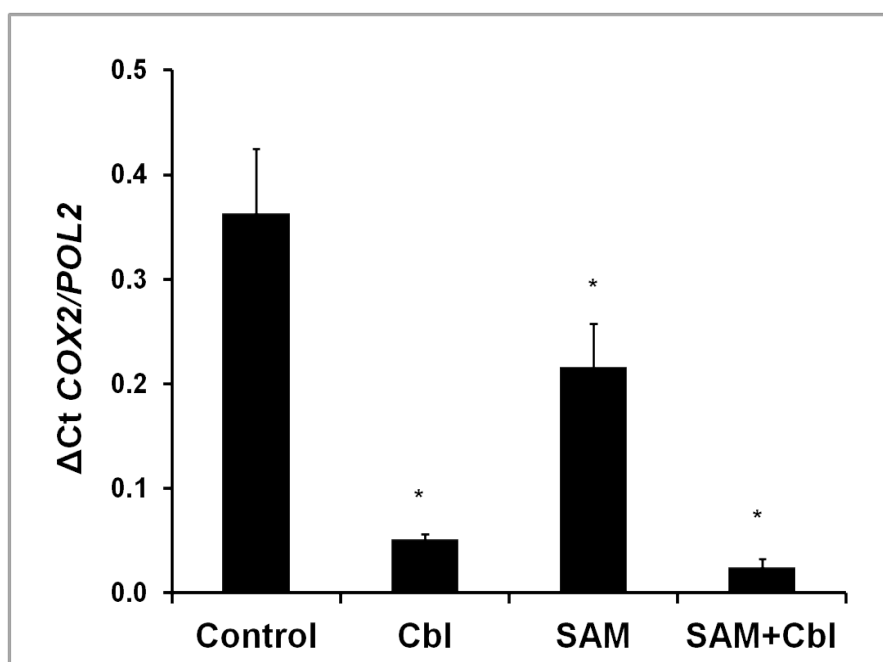


Figure 4.29: Influence de la SAM sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100nM de cobalamine (Cbl) associée ou non avec 75 μ M de S-Adénosyl Méthionine (SAM). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Une surexpression du gène *Cox-2* est également observée, quand le bécafibrate est utilisé seul (0.61 ± 0.08), alors qu'associé à la cobalamine, son effet est annulé et l'expression du gène est similaire à celle observée quand la Cbl est utilisée seule (0.047 ± 0.001) (Fig.4.30).

Le bécafibrate bloque la PEMT, mais nous savons aussi qu'il active les PPAR α . Il est possible que l'expression du gène *Cox-2* soit influencée par cette voie qui semble de plus en plus suggérée, car nous avons émis la même hypothèse dans le cas du gène *MDR-1* où le bécafibrate a eu le même effet d'activation de son expression.

L'association de la Cbl et du bézafibrate conduit à la diminution de l'expression du gène *Cox-2*, annulant l'effet du bézafibrate. Il est possible que le bézafibrate agisse sur l'expression des gènes tels que *Cox-2* et *MDR-1* par la voie des PPAR et que la Cbl agisse sur la voie métabolique que nous avons mise en évidence dans ce travail, c'est-à-dire une voie Akt et PLD dépendante.

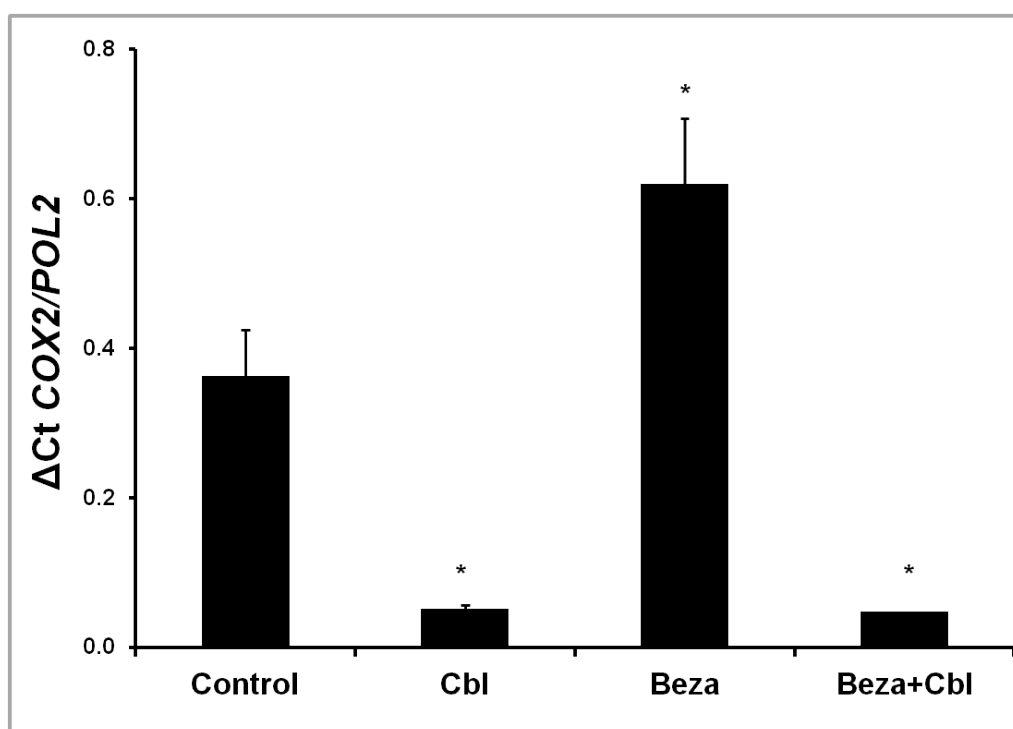


Figure 4.30: Influence du bézafibrate sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100nM de cobalamine (Cbl) associée ou non à 10 μ M de bézafibrate (Beza). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Pour résumer, nous remarquons (Fig. 4.31) que le gène *Cox-2* est régulé de la même façon que le gène *MDR-1*. L'activation du cycle de la méthionine, par la cobalamine et la SAM, conduit à une diminution de l'expression du gène *Cox-2*. D'autre part, le bézafibrate conduit à une surexpression de *Cox-2*. Nous noterons, que l'association du bézafibrate et de la cobalamine pourrait mettre en avant, encore une fois, une probable action de la Cbl qui soit indépendante de la PEMT.

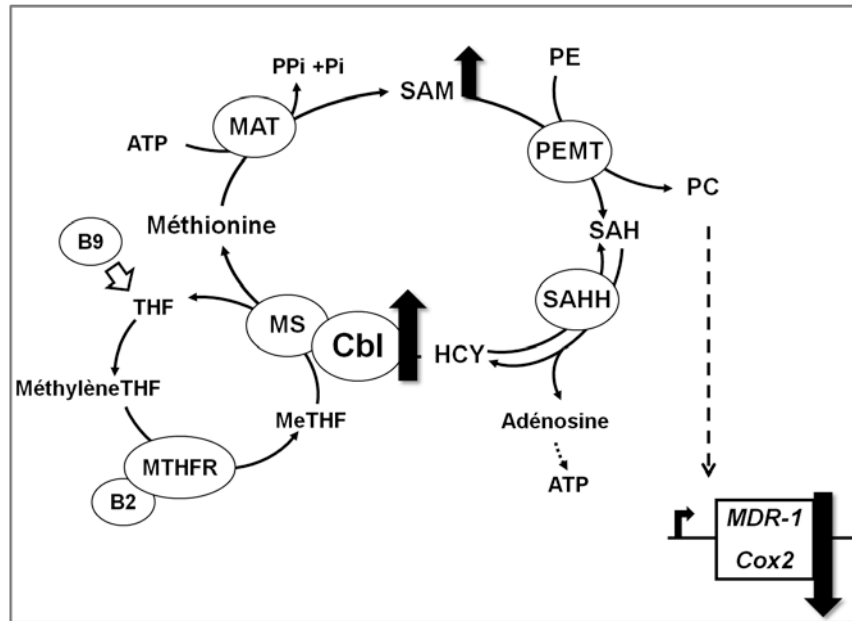


Figure 4.31: Action du cycle de la méthionine sur les gènes *Cox-2* et *MDR-1*. La cobalamine et la SAM ont le même effet sur l'expression des gènes *Cox-2* et *MDR-1*. Elles conduisent à la diminution de leur expression. Il semblerait alors que chez les cellules HepG2, ces deux gènes soient co-régulés.

Une relation liaison entre la Cbl, le cycle de la méthionine et le gène *Cox-2* est bien établie. Nous souhaitons maintenant vérifier si cette liaison passe aussi par la voie PP2A/Akt.

3.3. Effet de la voie PP2A sur la régulation de *Cox-2*

La démarche poursuivie sera similaire à celle que nous avons adoptée pour l'étude de l'expression du gène *MDR-1*. Ainsi, la première voie étudiée sera celle de PP2A, qui, rapellons le, réduit la quantité de la forme phosphorylée d'Akt, qui est la forme active d'Akt. À nouveau, l'inhibiteur acide okadaïque et l'activateur acide palmitique seront utilisés, afin de vérifier l'effet de cette voie sur l'expression du gène *Cox-2*.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 4.32. Nous observons que l'inhibiteur de PP2A, l'acide okadaïque, ne modifie pas (0.40 ± 0.08) l'expression de ce gène par rapport au témoin (0.36 ± 0.06). Quand il est associé à la cobalamine, nous retrouvons aussi une valeur similaire à celle du témoin.

Ce dernier résultat est difficile à interpréter. Apparemment, l'OA ne semble pas avoir d'effet *per se* sur l'expression du gène *Cox-2* à la différence du gène *MDR-1*. On ne peut suspecter cependant un problème de type artéfactuel car le matériel biologique de départ est celui même qui a été utilisé pour la mesure de l'expression du gène *MDR-1*. D'autre part, l'OA n'est pas inactif puisqu'il est capable d'inhiber la diminution de l'expression du gène *Cox-2* induit par la Cbl. Peut-être pouvons nous suggérer que ceci pourrait être dû aux conditions expérimentales que nous avons utilisées. Ce composé est connu pour avoir une bonne spécificité. Nous l'utilisons à des concentrations qui sont celles habituellement utilisées par de nombreux auteurs dans la littérature. Cependant ce composé possède aussi une toxicité intrinsèque assez élevée et la dose d'utilisation adéquate est difficile à trouver. Des doses inférieures sont inefficaces et des doses supérieures sont toxiques (résultats non montrés). Il est possible qu'à cette dose, on observe un effet supérieur sur l'expression du gène *MDR-1* que sur l'expression du gène *Cox-2*. Cette considération mérite réflexion et conduit à émettre certaines réserves sur ce résultat. D'autres inhibiteurs devront être utilisés dans le futur pour étayer ce travail.

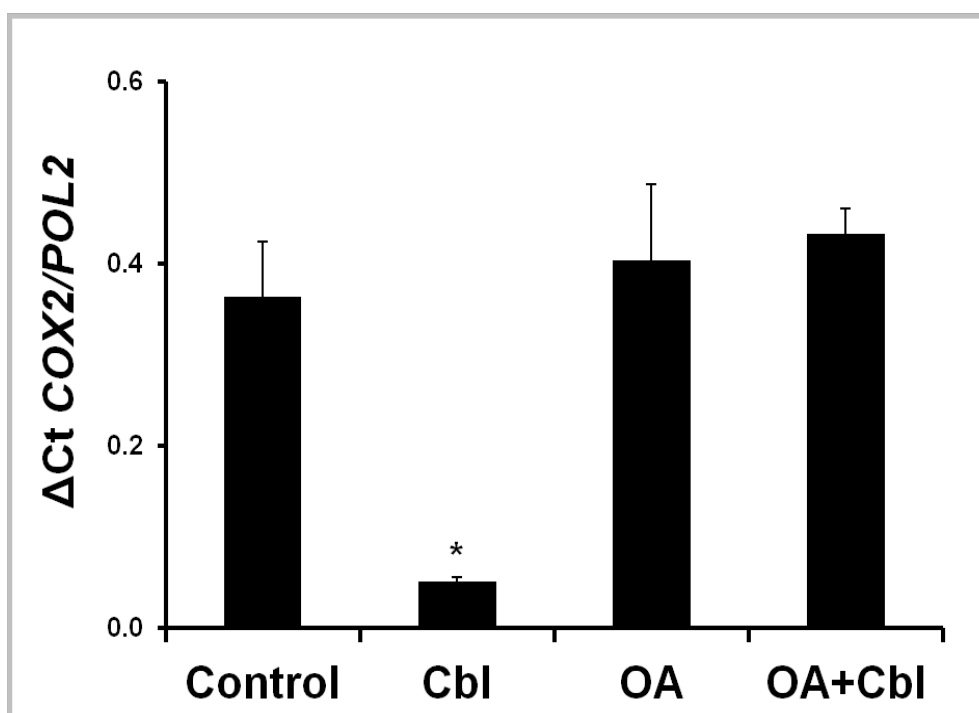


Figure 4.32: Action de l'acide okadaïque, inhibiteur de la PP2A, sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100

*nM de cobalamine (Cbl); de 10nM d'acide okadaïque (OA); d'un mélange de 10nM de d'acide okadaïque et de 100 nM de cobalamine (OA+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au Témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).*

Quoi qu'il en soit, le fait que l'OA est capable d'empêcher la diminution de l'expression du gène *Cox-2* par la Cbl est en faveur d'une possible implication de la PP2A dans ce phénomène.

L'activateur de PP2A, l'acide palmitique, provoque une diminution nette (0.019 ± 0.008) de l'expression de *Cox-2* par rapport au témoin (0.36 ± 0.06) (Fig.4.33) et cette diminution est maintenue quand ce produit est combiné à la Cbl (0.027 ± 0.001).

L'acide palmitique est un activateur de la protéine Me-PP2A, elle-même responsable de la déphosphorylation de la protéine P-Akt. En conséquence, une diminution de l'expression de P-Akt conduit à une diminution de l'expression du gène *Cox-2*. La voie PP2A agirait alors sur le gène *Cox-2* par l'intermédiaire de la voie PP2A/Akt. Ces résultats sont très similaires à ceux trouvés lors de notre étude de l'expression du gène *MDR-1*. La question qu'il faudra se poser serait maintenant de savoir si cette voie PP2A/Akt agit sur l'expression du gène *MDR-1* de manière concomitante à, ou par l'intermédiaire de, l'expression du gène *Cox-2*. Des éléments de réponse à cette question seront apportés plus loin dans ce mémoire.

La Cbl et l'acide palmitique agissent ainsi de la même manière, inhibant nettement l'expression du gène *Cox-2*. Ceci renforce l'hypothèse que la Cbl agit, en grande partie, sur l'expression des gènes *Cox-2* et *MDR-1*, par l'intermédiaire de la voie PP2A/Akt.

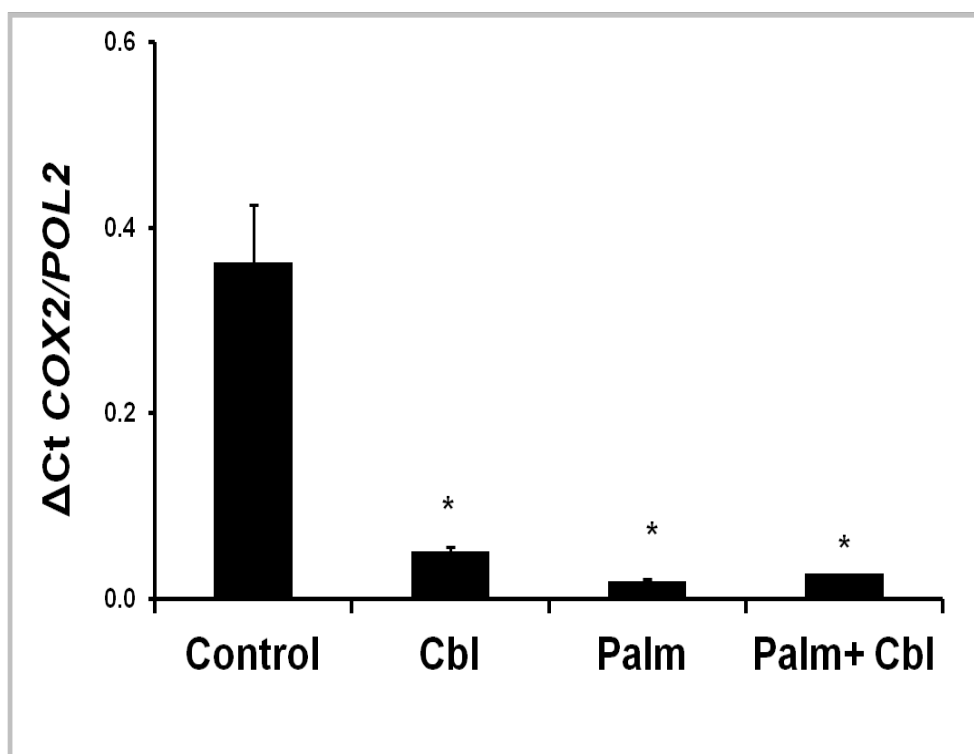


Figure 4.33: Action de l'acide palmitique, activateur de la PP2A, sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 100 μ M d'acide palmitique (Palm) ; d'un mélange de 100 μ M de d'acide palmitique et de 100 nM de cobalamine (Palm+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Pour résumer, nous notons qu'une activation, par l'acide palmitique, de l'inhibition de la voie Akt, par la PP2A, conduit, alors à une diminution de l'expression du gène *Cox-2*, et ceci très similairement avec la diminution de l'expression du gène *MDR-1* (Fig.4.34).

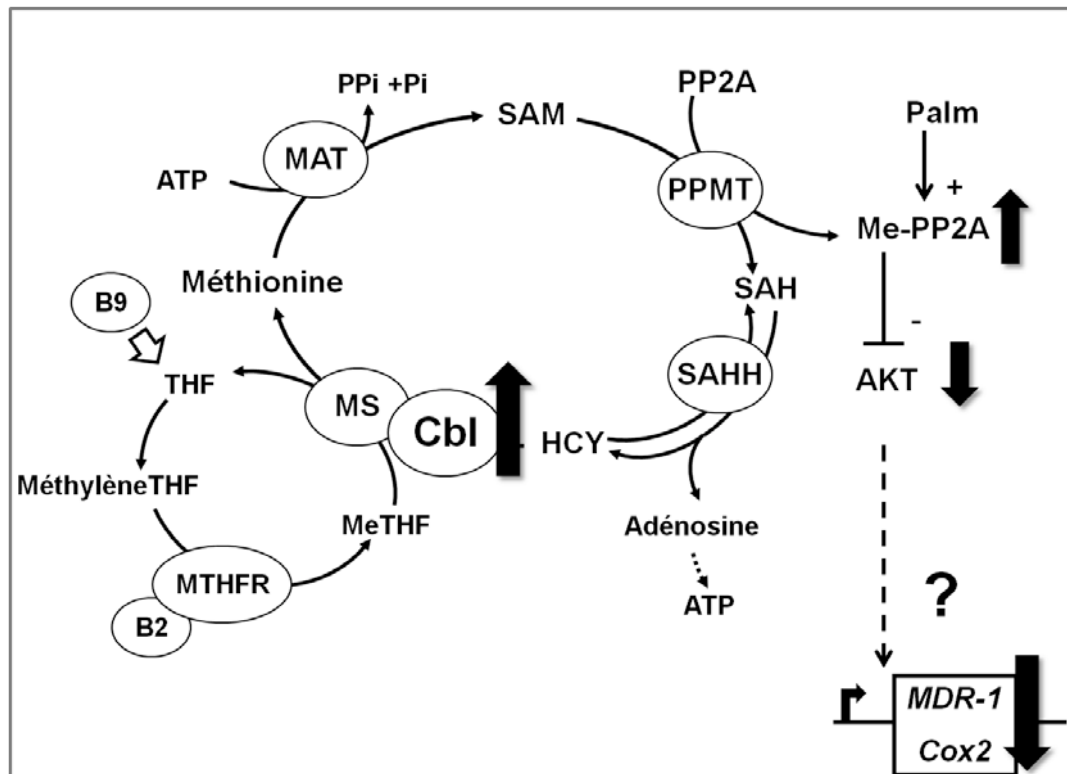


Figure 4.34: Action de la cobalamine et de la voie PP2A sur les gènes Cox-2 et MDR-1. La cobalamine et l'acide palmitique activent la Me-PP2A, qui inhibe la phosphorylation d'Akt. Cette inhibition est accompagnée par une diminution de l'expression des gènes Cox-2 et MDR-1.

3.4. Effet de la voie MEK sur la régulation de Cox-2

La deuxième voie de régulation d'Akt choisie a été celle des MAPK ou MEK, voie connue d'activation d'Akt. Les deux inhibiteurs choisis sont de nouveau l'U0126 et le PD98059. Leur influence sur le gène *Cox-2* a été étudiée.

L'U0126 conduit à une diminution (0.01 ± 0.006) de l'expression du gène *Cox-2* par rapport au témoin (0.36 ± 0.06) (Fig.4.35), diminution persistante dans le cas de sa combinaison avec la Cbl (0.03 ± 0.008).

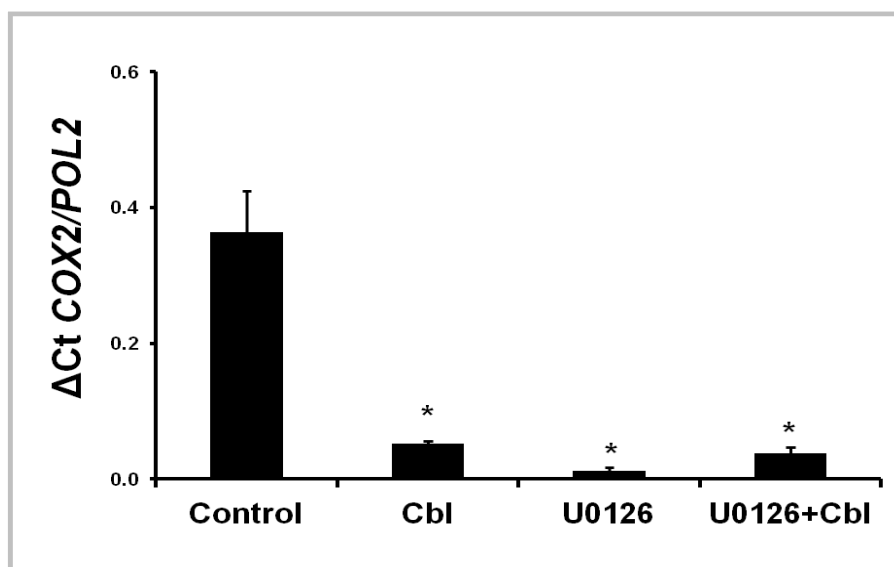


Figure 4.35 : Action de l'U0126, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M de U0126; d'un mélange de 20 μ M de U0126 et de 100 nM de cobalamine (U0126+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

L'action du produit U0126 sur l'expression du gène Cox-2, n'est pas la même que sur l'expression du gène *MDR-1*. En effet, le composé U0126 induit une baisse importante de l'expression du gène Cox-2, similaire à celles induite par la Cbl et au mélange Cbl/U0126. Alors que dans le cas de l'expression du gène *MDR-1*, nous avons exclu une éventuelle action de la voie MEK, il semble que l'U0126 soit capable d'agir directement sur l'expression du gène Cox-2, éventuellement par une voie MEK2-dépendante. Cette voie peut être parallèle et indépendante à celle reliant Cox-2 à *MDR-1*. Cette donnée est cependant en accord avec la littérature qui décrit une implication de la voie MEK dans l'expression du gène Cox-2. Par contre, ce résultat ne peut pas, a priori, nous donner des indications sur l'implication de la voie MEK dans la diminution induite de l'expression du gène Cox-2 par la Cbl.

Le produit PD98059 (Fig.4.36), semble provoquer une augmentation de l'expression du gène Cox-2 (0.91 ± 0.04), qui est légèrement diminuée (0.64 ± 0.12), quand les cellules HepG2 sont incubées en présence d'un mélange de PD98059 et de Cbl.

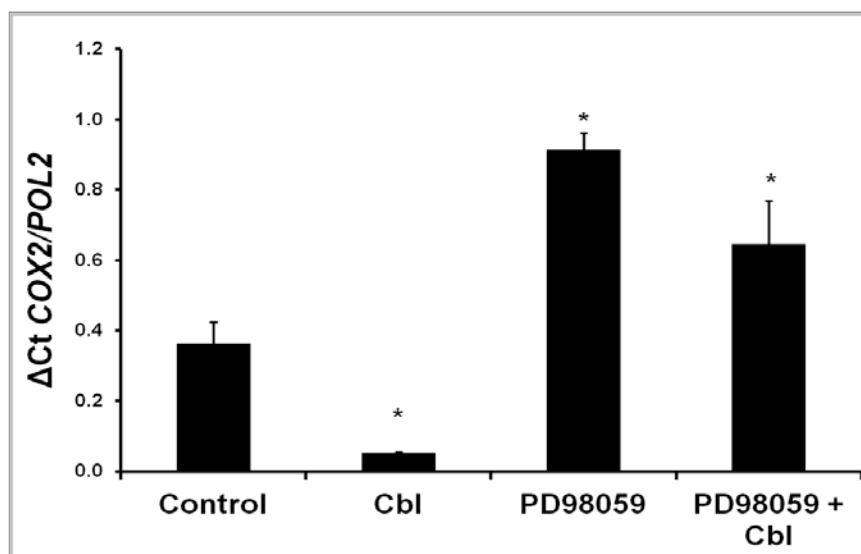


Figure 4.36 : Action de PD98059, inhibiteur de MEK, sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20μM de PD98059; d'un mélange de 20μM de PD98059 et de 100 nM de cobalamine (PD98059+ Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au Témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Avec ce produit, qui inhibe spécifiquement MEK1, nous obtenons des résultats inattendus, puisqu'ils ne ressemblent ni à l'action d'U0126 sur Cox-2, ni à l'action sur l'expression du gène *MDR-1*, ou il ne modifiait pas l'expression du gène.

L'implication de la voie MEK, dans la régulation de l'expression du gène Cox-2, semble un peu compliquée, puisque des effets contraires sont obtenus, en utilisant des produits qui sont supposés provoquer une diminution similaire de l'expression du gène. A ceci s'ajoute le fait que la même voie ne semble pas influencer le gène *MDR-1*.

Ces données sont troublantes. Une étude bibliographique extensive sur des sujets, ou modèles cellulaires proches du notre étude montre que ces deux composés sont souvent utilisés pour valider une étude sur les MEK, et montre tous des résultats similaires quant à leur effet pharmacologique. Nous trouvons ici des résultats qui semblent contradictoires. Ce travail a été reproduit un grand nombre de fois (> 10 fois) pour nous assurer de leur validité. Ceci indique en fait qu'il est probable que le niveau de complexité doit être supérieur à ce que nous pouvions penser initialement. Nous émettons maintenant l'hypothèse que ces composés agiraient différemment sur différentes formes de MEK dont l'équilibre fin influencera de manière importante et peut être différentes les expressions relatives des gènes Cox-2 et/ou de

MDR-1. Il est difficile aussi dans ce cas de conclure clairement sur une implication de cette voie MEK, dans l'inhibition induite par la CBL de l'expression des gènes *Cox-2* et *MDR-1*.

3.5. Effet de la voie PI3K sur la régulation de *Cox-2*

Afin d'étudier l'activation d'Akt par phosphorylation par la PI3K nous avons utilisé encore une fois les inhibiteurs de PI3K suivants: le LY294002 et la wortmannine et nous avons observé leur effet sur l'expression du gène *Cox-2*.

L'ajout de LY294002 aux cellules ne semble pas influencer l'expression du gène *Cox-2* par rapport au témoin (0.36 ± 0.06) (Fig.4.37), alors qu'une diminution de l'expression de ce gène est observée dans le cas de sa combinaison avec la cobalamine (0.07 ± 0.001). Cependant, cette diminution est similaire à celle induite par la Cbl seule.

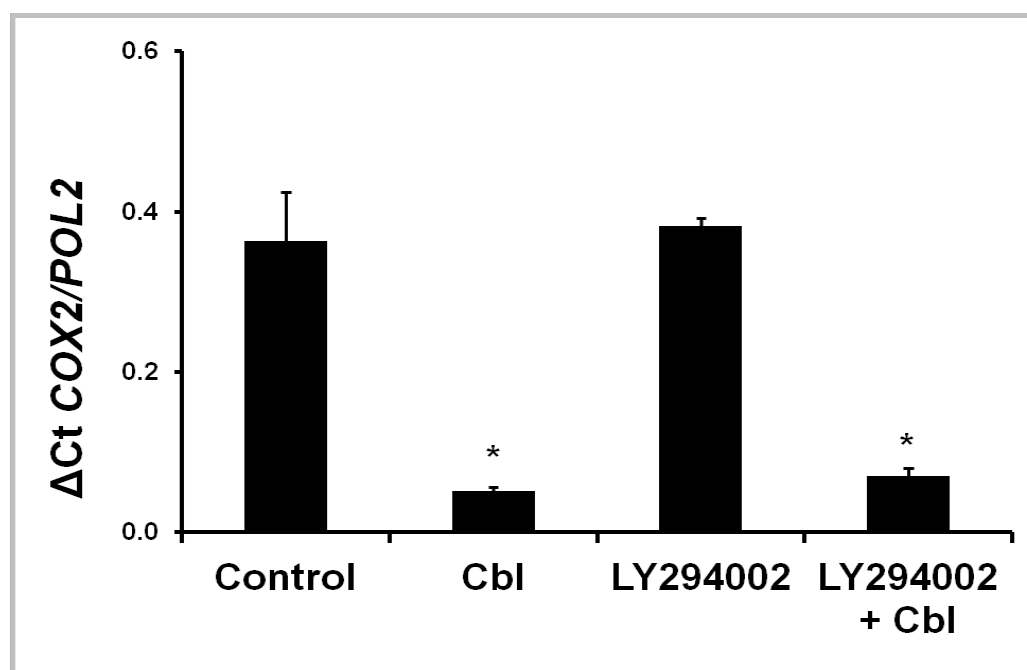


Figure 4.37: Action du LY294002, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μ M de LY294002; d'un mélange de 20 μ M de LY294002 et de 100 nM de cobalamine (LY294002 + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Dans le cas de l'utilisation du LY294002, l'expression du gène *Cox-2* n'est pas modifiée, alors que nous avons observé une diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Il

semblerait que l'inhibition de la voie Akt via une inhibition de la voie PI3K n'agisse pas sur le gène *Cox-2*. Ceci suggère que cette voie agirait différemment sur ces deux gènes par deux voies de régulation différentes.

Dans le cas de l'association du produit LY294002 à la Cbl, l'expression du gène *Cox-2* diminue au même niveau que dans le cas d'une utilisation de la Cbl seule. Encore une fois, la Cbl semble agir de façon indépendante et son influence ne passerait pas par la voie PI3K pour agir sur l'expression du gène *Cox-2*. Ce constat a aussi été réalisé concernant l'expression du gène *MDR-1*. Il semble que l'hypothèse, qu'une voie commune existe, par laquelle la Cbl agit sur ces deux gènes, soit encore une fois favorisée. Et que cette voie ne dépende pas de la PI3K.

Lorsque nous utilisons la wortmannine pour étudier l'expression du gène *Cox-2*, nous constatons que lorsqu'elle est ajoutée seule, elle provoque une augmentation de l'expression du gène (1.08 ± 0.06), effet que ici aussi est partiellement contrebalancé par la Cbl (0.41 ± 0.001), qui ramène son expression au niveau du témoin (Fig.4.38).

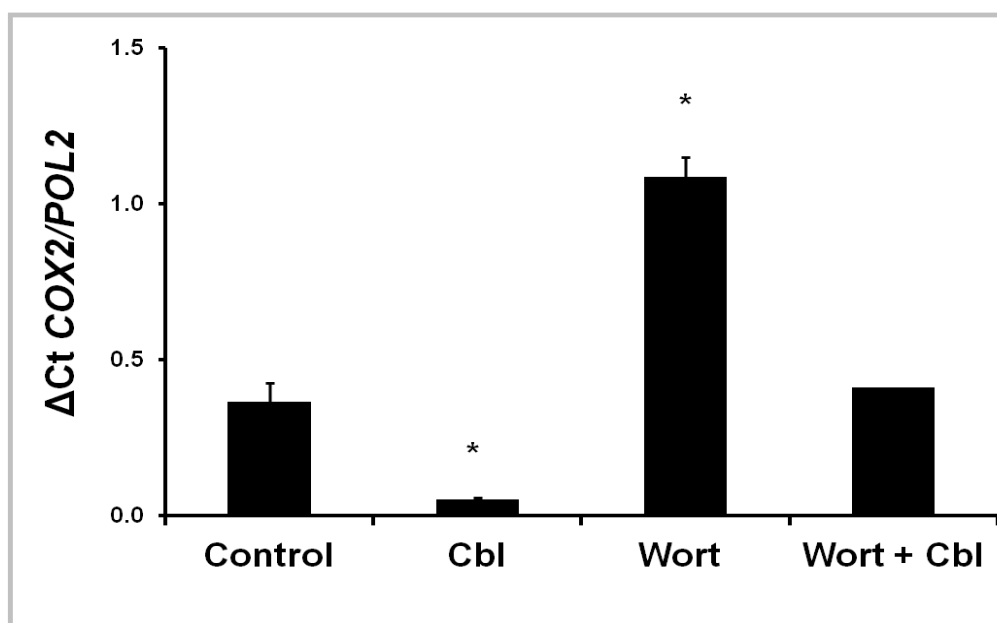


Figure 4.38: Action de la wortmannine, inhibiteur de PI3K, sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 100nM de Wortmannine (Wort); d'un mélange de 100nM de Wortmannine et de 100 nM de cobalamine (Wort + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

La wortmannine conduit à une augmentation de l'expression du gène *Cox-2* comparable à celle observée dans le cas de l'expression du gène *MDR-1*. Ici aussi nous émettons la même hypothèse, à savoir que ce que nous observons ici c'est l'effet inhibiteur de la wortmannine sur la PLD, qui serait responsable de l'effet observé ici. Une inhibition de la PLD par la wortmannine conduit à une augmentation de l'expression du gène *MDR-1* et probablement à celle de l'expression du gène *Cox-2*.

Ce dernier résultat suggère aussi que, comme c'est le cas pour l'expression du gène *MDR-1*, l'expression du gène *Cox-2* est régulé par la PLD. Nous rappelons que la voie Akt est influencée par les effecteurs, acide oléique et n-Butanol, de la PLD. Ainsi, nous pourrions penser qu'elle agit sur *Cox-2* et *MDR-1* en aval de la voie PLD. Si nous maintenons notre hypothèse que la voie Akt est celle qui agit sur *Cox-2* et *MDR-1*, dans la voie de signalisation que nous mettons en évidence, elle pourrait constituer un lien entre la PLD et *Cox-2*.

La question qui émerge à cette étape du travail est la suivante :

3.6. Comment le gène *Cox-2* est-il influencé par la PLD ?

L'inhibiteur et l'activateur de la PLD, le n-Butanol et l'acide oléique, respectivement, ont été utilisés, afin de fournir certains éléments de réponse à cette question. Ces deux composés ont été utilisés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour l'étude de l'expression du gène *MDR-1*. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 4.39 et 4.40.

L'expression du gène *Cox-2* diminue considérablement en présence d'acide oléique associé (0.07 ± 0.001) ou non (0.03 ± 0.001) à la Cbl (Fig.4.39). Cet effet est similaire à celui obtenu quand nous utilisons la Cbl seule. Une activation de la PLD emble conduire à la diminution de l'expression du gène *Cox-2*, comme c'est le cas pour l'expression du gène *MDR-1*.

Dans le cas de l'utilisation du n-Butanol (Fig.4.40), nous observons une importante augmentation (7.7 ± 4.6) de l'expression de *Cox-2* par rapport au control (0.36 ± 0.06). Cette augmentation nous rappelle aussi celle observée sur le gène *MDR-1*. Notons qu'ici aussi le tert-Butanol n'exerce aucune action sur l'expression du gène *Cox-2*, puisque comme nous

avons déjà indiqué, l'action du n-But repose sur le fait que ça soit un alcool primaire, alors que le tert-But est un alcool tertiaire.

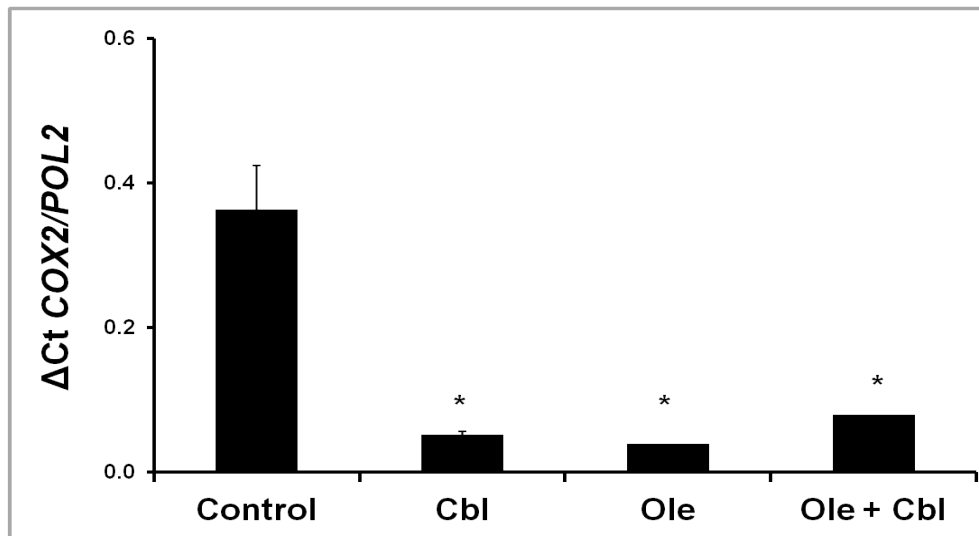


Figure 4.39: Action de l'acide oléique, activateur de la PLD, sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 20 μM d'acide oléique (Ole); d'un mélange de 20 μM d'acide oléique et 100 nM de cobalamine (Ole + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

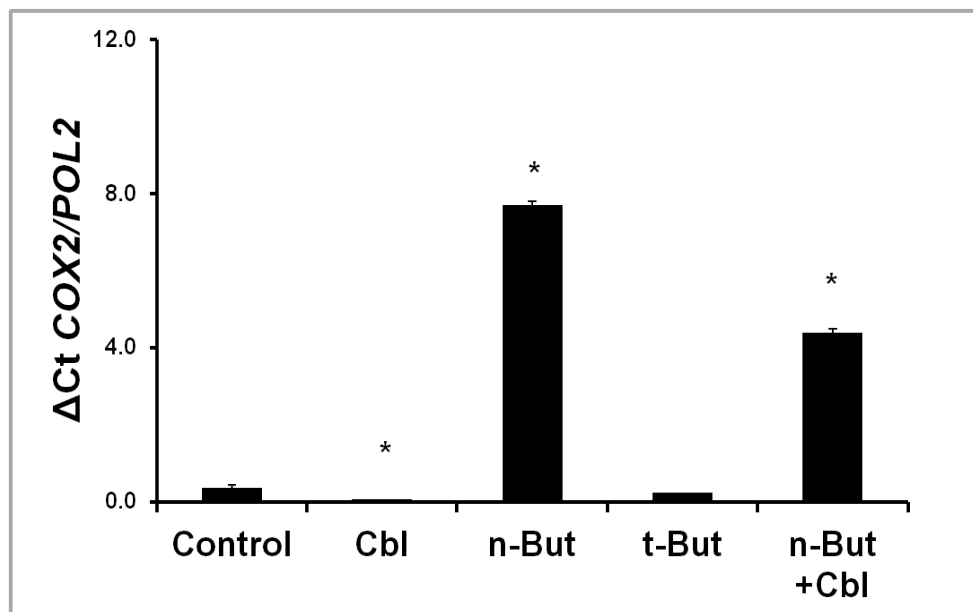


Figure 4.40: Action du n-Butanol, inhibiteur de la PLD, sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100 nM de cobalamine (Cbl); de 135mM de n-Butanol (n-But); d'un mélange de 135mM de n-Butanol et de 100 nM de cobalamine (n-But + Cbl). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

L'illustration présentée dans la figure 4.41 résume ces derniers résultats. La Cbl active la phospholipase D. L'activité de cette enzyme est aussi augmentée grâce à son activateur, l'acide oléique. Toute cette voie semble conduire à une diminution de l'expression du gène Cox-2.

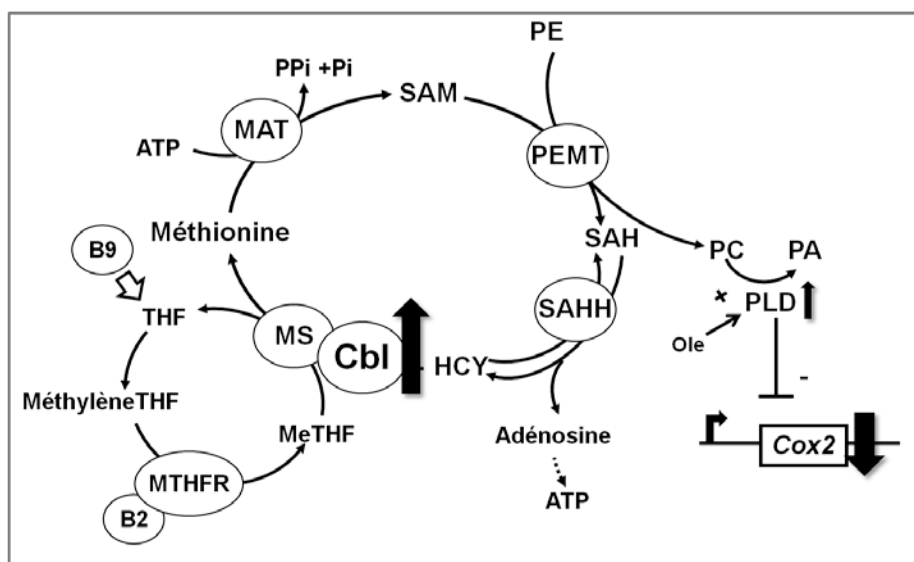


Figure 4.41: Influence de l'expression de Cox-2 par la cobalamine et la PLD. La cobalamine diminue l'expression du gène Cox-2. Cette diminution est également obtenue par une activation de la phospholipase D par la cobalamine ou par son activateur, l'acide oléique.

3.7. Influence des inhibiteurs de Cox-2 sur l'expression du gène MDR-1.

Dans cette partie de notre travail nous nous sommes attachés à explorer le lien entre la PLD et l'expression de Cox-2. Il y a un grand nombre d'études phénoménologiques montrant un lien entre la PLD et Cox, mais les études mécanistiques sont bien moindres et peu claires. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet sur l'expression du gène Cox-2, de trois inhibiteurs de Cox-2. Le nimésulide (Nime), est un anti-inflammatoire-non-stéroïdien (AINS), qui inhibe de façon sélective Cox-2. L'acide acétylsalicylique (ASA), un AINS, qui inhibe la production des prostaglandines et de tromboxanes (produits cox) par réaction d'acétylation irréversible des Cox-2 et Cox-1. Enfin le carprofen, un AINS, qui inhibe la Cox-2.

Les cellules HepG2 expriment constitutivement Cox-2, et lorsque nous ajoutons chacun de ces trois inhibiteurs, nous observons une baisse importante de l'expression du gène Cox-2 (Fig.4.42 ; Fig.4.43 et Fig.4.44). Le niveau de d'expression est alors inférieur au seuil de détection e la technique. Ceci indique que l'expression du gène Cox-2 est ici dépendante de l'activité de la protéine COX-2.

Nous avons vu que le n-But, inhibiteur de la PLD, augmentait l'expression du gène Cox-2. Nous associons les trois inhibiteurs de Cox-2 cités plus haut, au n-But et nous

regardons s'ils annulent son effet. Une inhibition de l'expression du gène *Cox-2* a été obtenue, de l'ordre de 66% pour n-But+Nime, de 75% pour n-But+ASA et de 100% pour n-But+carpofen, par rapport à celle observée quand nous utilisons le n-But seul (Fig.4.42 ; Fig.4.43 et Fig.4.44). Nous pouvons penser, ainsi, que la PLD agit *en amont* de la voie *Cox-2*, car une inhibition de la PLD se répercute sur l'expression du gène *Cox-2*. Le fait que les trois inhibiteurs diminuent d'ordement l'augmentation de l'expression du gène *Cox-2* induite par le n-But étayent fortement cette hypothèse.

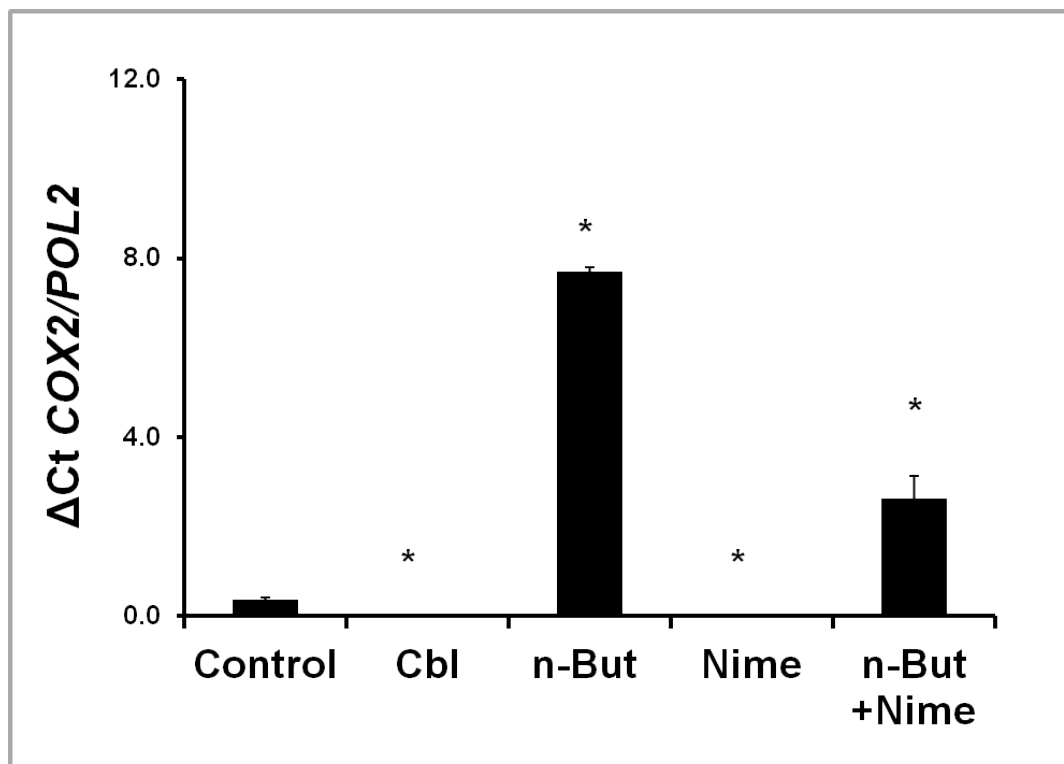


Figure 4.42: Action du nimésulide, inhibiteur de *Cox-2*, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène *Cox-2*. Étude de l'expression du gène *Cox-2*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10μM de nimésulide (Nime). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

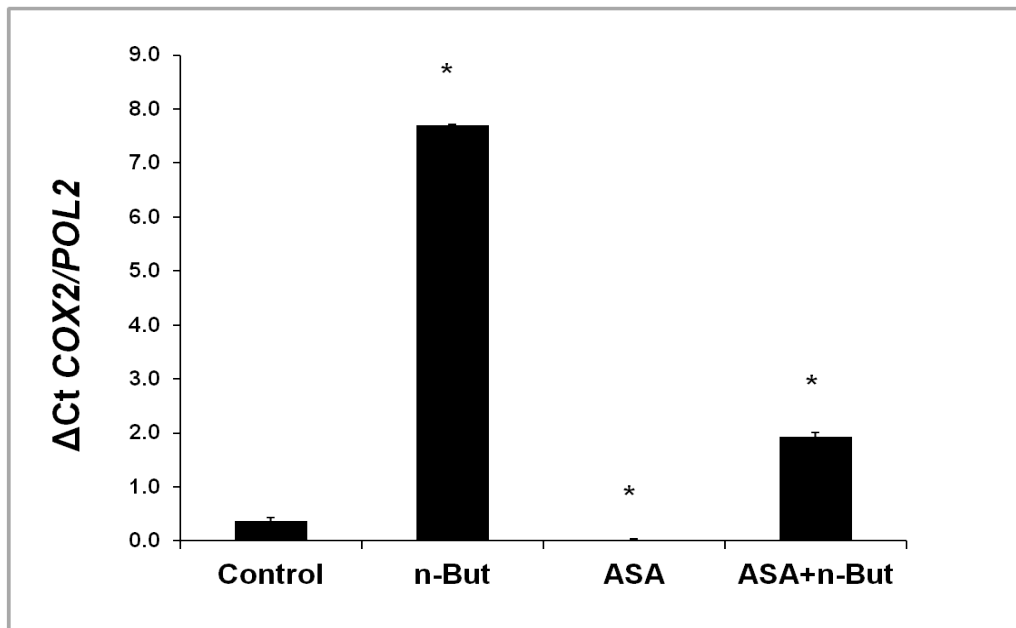


Figure 4.43: Action de l'ASA, inhibiteur de Cox-2, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou non de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10 μ M d'acide acétylsalicylique (ASA). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

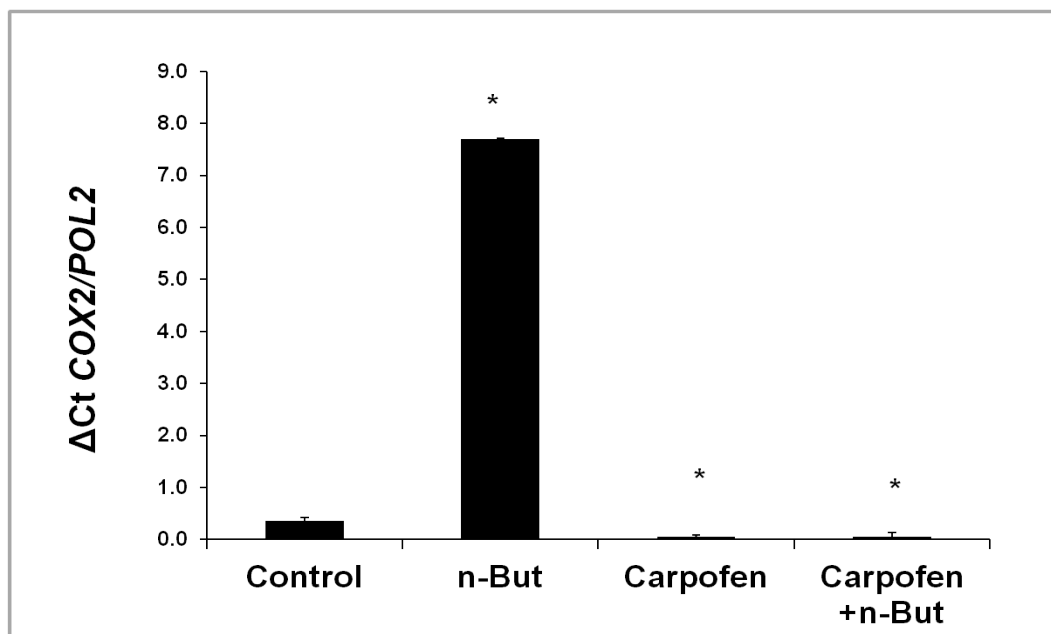


Figure 4.44: Action du carprofen, inhibiteur de Cox-2, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène Cox-2. Étude de l'expression du gène Cox-2, par qRT-PCR, en présence ou en absence de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10 μ M de Carprofen. *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control).

$p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Nous avons montré précédemment, que la Cbl influençait l'expression du gène *MDR-1* via la PLD. Nous venons de voir que la PLD influençait aussi l'expression du gène *Cox-2*. Il serait intéressant de déterminer si les inhibiteurs de *Cox-2* sont capables aussi de moduler l'expression du gène *MDR-1*. Les trois inhibiteurs de *Cox-2* sont utilisés, associés ou non à l'inhibiteur de la PLD, n-But et, cette fois-ci, l'expression du gène *MDR-1* a été recherchée. A l'exception du nimésulide, qui seul ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du gène *MDR-1*, l'ASA et le carprofen conduisent à une nette diminution de l'expression de ce gène (100% de diminution) (Fig.4.45 ; Fig.4.46 et Fig.4.47). Ceci semble indiquer que l'expression du gène *MDR-1* est dépendante, au moins en partie, de la fonction de la protéine *COX-2*.

Le n-Butanol, comme nous avons déjà vu, conduit à une augmentation de l'expression du gène *MDR-1*. Les trois inhibiteurs de *Cox-2* sont capables de diminuer, partiellement (nime de 75% ; ASA de 60%) ou complètement (carprofen de 100%), l'augmentation de l'expression de *MDR-1* (Fig.4.45 ; Fig.4.46 et Fig.4.47) induite par le n-Butanol.

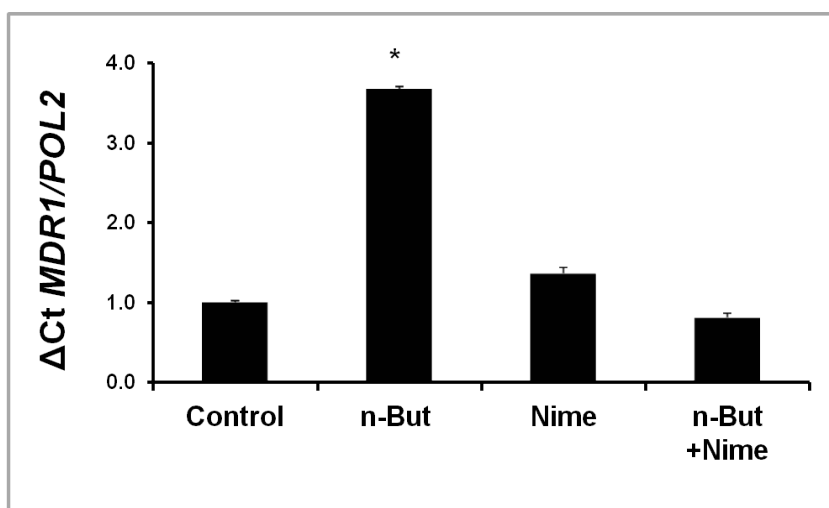


Figure 4.45: Action du nimésulide, inhibiteur de *Cox-2*, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène *MDR-1*. Étude de l'expression du gène *MDR-1*, par qRT-PCR, en présence ou absence de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10 μ M de nimésulide (Nime). * : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 9 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

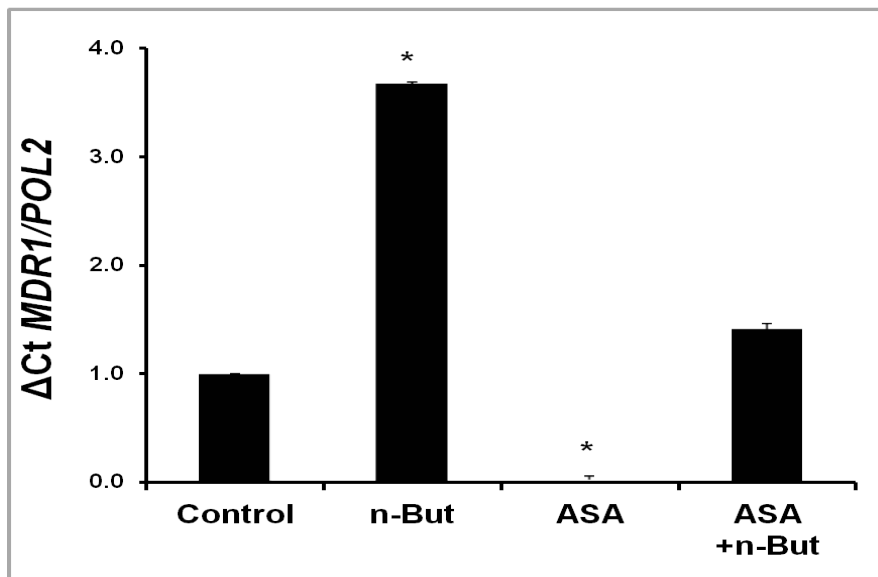


Figure 4.46: Action de l'ASA, inhibiteur de Cox-2, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène MDR-1. Étude de l'expression du gène MDR-1, par qRT-PCR, en présence ou absence de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10 μ M d'acide acétylsalicylique (ASA). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

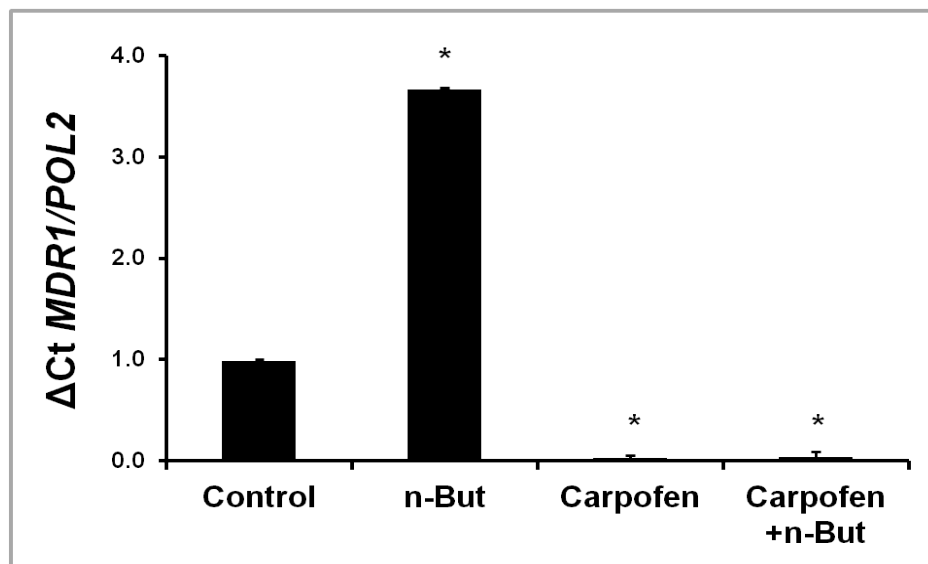


Figure 4.47: Action du carprofen, inhibiteur de Cox-2, sur l'influence du n-Butanol sur l'expression du gène MDR-1. Étude de l'expression du gène MDR-1, par qRT-PCR, en présence ou absence de 135mM de n-Butanol (n-But) associée ou non à 10 μ M de Carprofen.

* : $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Nous pouvons en conclure que *COX-2* agit sur l'expression du gène *MDR-1*, puisque une inhibition de *COX-2* conduit à une diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Nous montrons aussi que l'activité de la PLD influence de manière similaire l'expression des gènes *Cox-2* et *MDR-1*. Nous pouvons suggérer l'idée que la PLD influence l'expression du gène *Cox-2*, modulant en conséquence l'activité de la protéine *COX-2* qui en retour influencera l'expression du gène *MDR-1*. Cette hypothèse peut rendre compte des résultats obtenus. Cette hypothèse considère aussi que le gène *Cox-2* agirait alors en amont du gène *MDR-1*. D'autre part, le fait que l'inhibition de *Cox-2* contrebalance ou annule l'effet de la voie PLD sur l'expression du gène *MDR-1*, indique que le gène *Cox-2* agisse en aval de la PLD.

3.8. Influence de la PGE2, produit de *Cox-2*, sur l'expression du gène *MDR-1*.

Si cette hypothèse est correcte cela veut dire que les produits de la *COX-2* (dont la plus connue est la PGE2) devraient être capables d'influencer l'expression du gène *MDR-1*. Les cellules HepG2 ont été incubées avec de la prostaglandine E2 (PGE2), en présence ou non de Cbl. Nous avons étudié l'expression du gène *MDR-1*, afin de constater l'effet du produit de la protéine *COX-2* sur *MDR-1*. Une augmentation importante de l'expression du gène *MDR-1* a été observée (4.18 ± 0.48). Cette augmentation est très amoindrie lorsque de la Cbl est ajoutée en combinaison à la PGE2 (1.23 ± 0.01) (Fig.4.48).

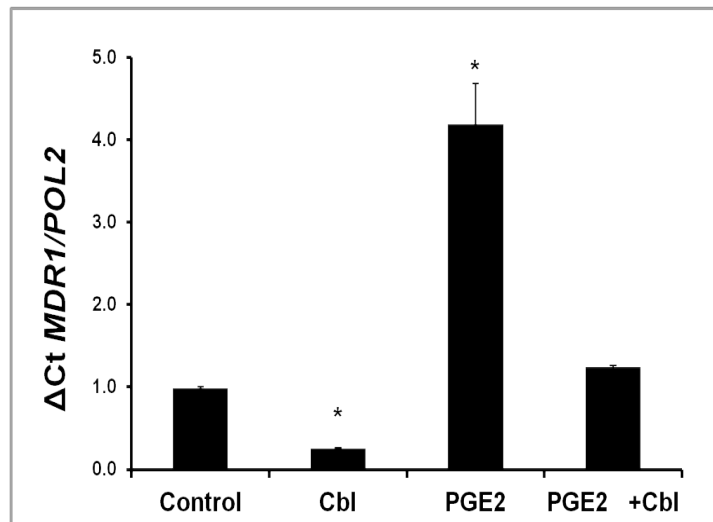


Figure 4.48: Action de la PGE2, produit de Cox-2, sur l'expression du gène MDR-1. Étude de l'expression du gène MDR-1, par qRT-PCR, en présence ou absence de 100nM de cobalamine (Cbl) associée ou non à 10 μ M de Prostaglandine E2 (PGE2). *: $p < 0.01$ par rapport au témoin (control). Cette figure est représentative de 3 expériences différentes. (Fiche technique n°18).

Une quantité élevée de PGE2 dans la cellule mime une augmentation de l'activité de COX-2. Ceci résulte en une augmentation de l'expression du gène MDR-1. Nous avons constaté que lorsque nous agissons sur les voies PP2A/Akt ou PLD, des variations similaires de l'expression des deux gènes Cox-2 et MDR-1 sont observées. Ceci indique que ces voies sont situées en amont de l'expression de ces deux gènes. Le fait que l'expression et la fonction de Cox-2 influence l'expression du gène MDR-1 semble indiquer que Cox-2 puisse être l'intermédiaire entre la PLD et PP2A/Akt et l'expression du gène MDR-1.

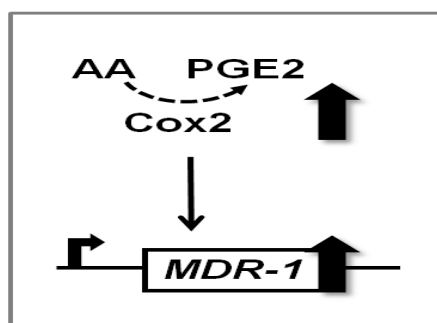


Figure 4.49: Augmentation de l'expression du gène *MDR-1* provoquée par le produit de *Cox-2*, la *PGE2*. Une augmentation de l'activité de *Cox-2* provoque une augmentation de la production de la prostaglandine *E2*. Ceci peut influencer l'expression du gène *MDR-1*, provoquant aussi son augmentation.

Il a été montré que l'expression de *MDR-1* est modulée par la *Cox-2* (Patel *et al.*, 2002), l'enzyme limitant la vitesse dans la conversion de l'acide arachidonique en prostanoïdes. Dans la plupart des tissus, la *Cox-2* est presque indétectable et est fortement induite en réponse à l'activation par les hormones, les cytokines inflammatoires, facteurs de croissance, des promoteurs de tumeurs, des bactéries et des virus (Vane *et al.*, 1998). Dans le foie, la *Cox-2* est régulée à la hausse par des cytokines comme l'interleukine-6. Des études récentes ont suggéré que la surexpression de *Cox-2* pourrait être l'un des principaux facteurs de carcinogenèse hépatique (Koga *et al.*, 1999).

En outre, de nombreuses tumeurs sécrètent des niveaux élevés de *PGE2* (Soslow *et al.*, 2000). Bien que ces observations soient cohérentes avec l'hypothèse que la *Cox-2* contribue à l'apparition et la progression tumorale, le mécanisme précis pour cette relation reste incertain. À l'appui de l'effet expérimental cancérigène de la *Cox-2* et de la *PGE2*, les études épidémiologiques ont démontré que l'absorption régulière d'AINS est associée à une diminution de l'incidence des cancers de l'œsophage, colorectal et gastrique (Thun *et al.*, 2002).

Notre étude souligne pour la première fois une relation entre la PLD, la voie PP2A/Akt, *Cox-2* et *MDR-1*. En présence d'un alcool comme le n-butanol, l'activité PLD est inhibée et la production de PA est abaissée (Van Dijk *et al.*, 1997). Nous montrons que, dans ces conditions, l'activation de la *Cox-2* et *MDR-1* semble être séquentielle. L'inhibition de la PLD semble activer l'expression du gène *Cox-2*, ce qui à son tour activerait le gène *MDR-1* grâce à la sécrétion de *PGE2*.

La régulation de l'expression du gène *Cox-2* est peut être due à une diminution de la génération PLD-dépendante de l'acide phosphatidique. Les raisons pour lesquelles le PA est capable d'influencer l'expression du gène *Cox-2* ne sont pas encore claires. Il est connu que le PA est capable d'activer le facteur de transcription NFkB (Liu *et al.*, 1999 ; Wong *et al.*, 1998). Cependant, l'activité PLD a été principalement étudiée en réponse à différents stimuli tels que le LPS (Lee *et al.*, 2003), IL1 β (Park *et al.*, 2002), la sphingosine-1-phosphate (Desai *et al.*, 1992), l'angiotensine II (Frias *et al.*, 2003), l'épigallocatechine-gallate (Kim *et al.*, 2004), et ainsi de suite. Dans toutes ces études, l'inhibition de la PLD par le n-butanol conduit à une diminution de l'expression des stimuli induits par la *Cox-2*. On peut donc penser que la PLD puisse moduler et / ou participer à la réponse de la cellule avec d'autres différents systèmes de seconds messagers impliqués par ces stimuli et que l'effet du PA peut être différent en fonction des stimuli.

Il est également possible que l'exposition à long terme à n-butanol (24 h dans notre cas) puisse conduire à une réponse différente de celle d'un temps d'exposition court.

En résumé...

Dans cette troisième partie du travail, nous avons montré que la Cbl et la SAM sont responsables de la diminution de l'expression du gène *Cox2*. Une activation de la PLD, ainsi qu'une désactivation de la voie Akt, par l'intermédiaire de la PP2A, conduit aussi à une diminution de l'expression de ce gène. *Cox2* serait le lien entre ces voies et l'expression du gène *MDR-1*. Les deux gènes semblent être co-régulés et la liaison entre les deux se ferait *via* le produit de *Cox2*, la PEG2 (Fig.4.50).

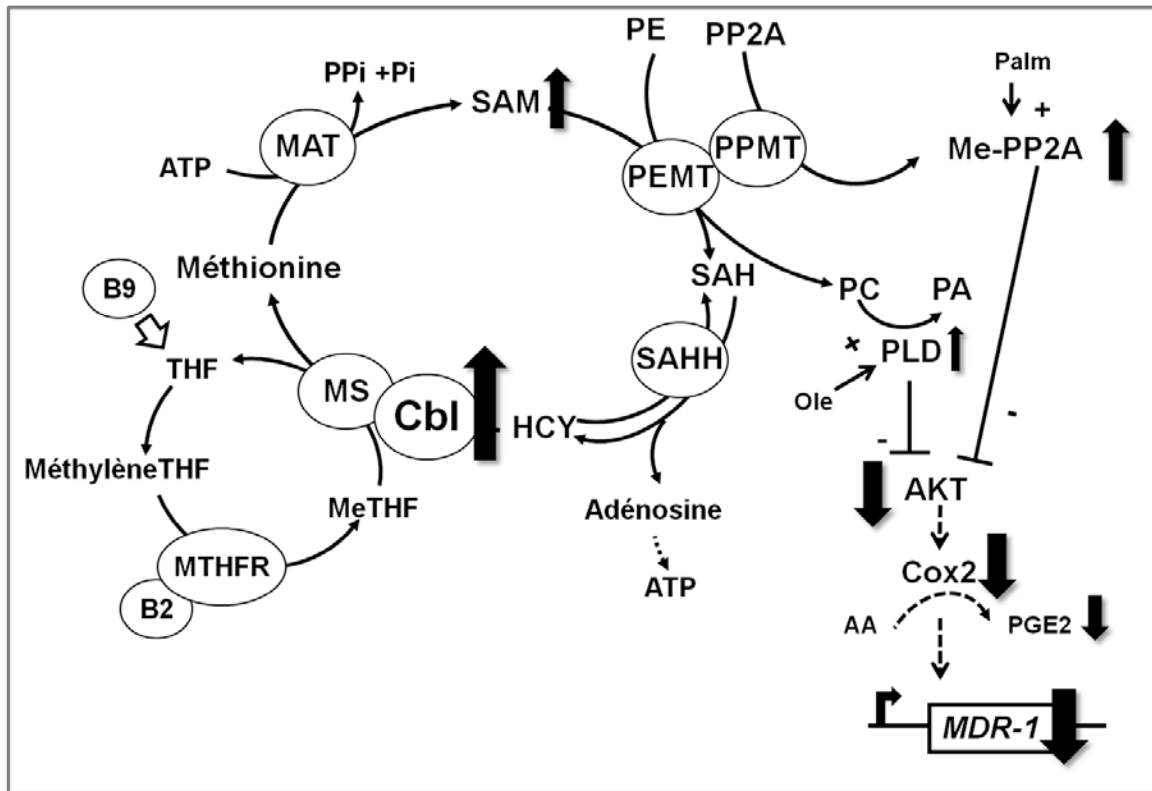


Figure 4.50: Influence de l'expression du gène MDR-1 par une voie Cox-2 dépendante. La Cble et/ou la SAM provoquent l'inhibition d'Akt à travers une activation de la PLD (aussi activée par l'acide oléique) et de la Me-PP2A (aussi activée par l'acide palmitique). Cette inhibition d'Akt est accompagnée par une diminution de l'expression du gène Cox-2 et de l'activité de la protéine Cox-2 (diminution de la PGE2). Ceci conduira à une diminution de l'expression du gène MDR-1.

L'exposition de ce travail expérimental se termine ici. Nous avons réussi à éclaircir la voie conduisant de la cobalamine au gène *MDR-1*. Il y a peut être certains points qui doivent encore être élucidés, mais nous pouvons conclure que les voies PLD, Akt et Cox-2 jouent un rôle majeur dans le chemin métabolique étudié.

Perspectives et Conclusion

Perspectives et Conclusion

Le point d'initiation de cette étude expérimentale a été l'observation, par l'équipe, de la diminution de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine. L'importance de cette découverte revêt deux aspects : 1) Au niveau de la recherche fondamentale, puisque cela renforce la compréhension de voies de signalisation cellulaire et 2) Au niveau de la recherche appliquée, car elle pourrait constituer le point d'initiation d'applications pharmaceutiques potentielles.

Notre objectif était d'explorer et d'étudier la relation entre la cobalamine et l'expression du gène *MDR-1*. Nous avons montré ici une implication de la phospholipase D, de la protéine Akt et du gène *Cox-2*, dans la voie de signalisation étudiée.

Dans la littérature, il y a des études mettant en évidence un lien entre certains des acteurs que nous avons étudié. C'est sur ces études que nous nous sommes basés pour bâtir l'hypothèse que la cobalamine pourrait influencer l'expression du gène *MDR-1* par l'intermédiaire des voies PLD, Akt et Cox. La liaison de ces acteurs dans une même voie de régulation, chez la lignée cellulaire HepG2, n'avait auparavant jamais été proposée et soutenue par des travaux. Nous avons réussi à éclairer une voie inconnue jusqu'à présent. Nous avons relié ces différents éléments, de façon à pouvoir proposer un schéma de signalisation (Fig. 5.1) original.

La Cbl active le cycle de la méthionine. Cette activation se traduit par une augmentation de la production de la SAM. La SAM a un effet similaire à celui de la Cbl sur l'expression du gène *MDR-1*. Elle conduit à une diminution de son expression.

La production de la PC est également augmentée, en présence de Cbl. Nous montrons aussi que la Cbl augmente l'activité de la PLD, ce qui aussi conduit aussi à une diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Il est intéressant de noter ici que la Cbl active l'enzyme PLD et aussi la génération de son substrat.

Une activation de la PLD semble diminuer l'expression de la protéine P-Akt. D'autre part, la Cbl a le même effet. L'activation de la voie PP2A, qui inhibe celle d'Akt, diminue également l'expression de *MDR-1*.

Le gène *Cox-2* est régulé de façon similaire à celle du gène *MDR-1*. De plus, sa diminution d'expression diminue également l'expression du gène *MDR-1*. Le produit de *Cox-2*, la PGE2, provoque une augmentation de l'expression du gène *MDR-1*, ce qui constitue encore une indication de leur co-régulation.

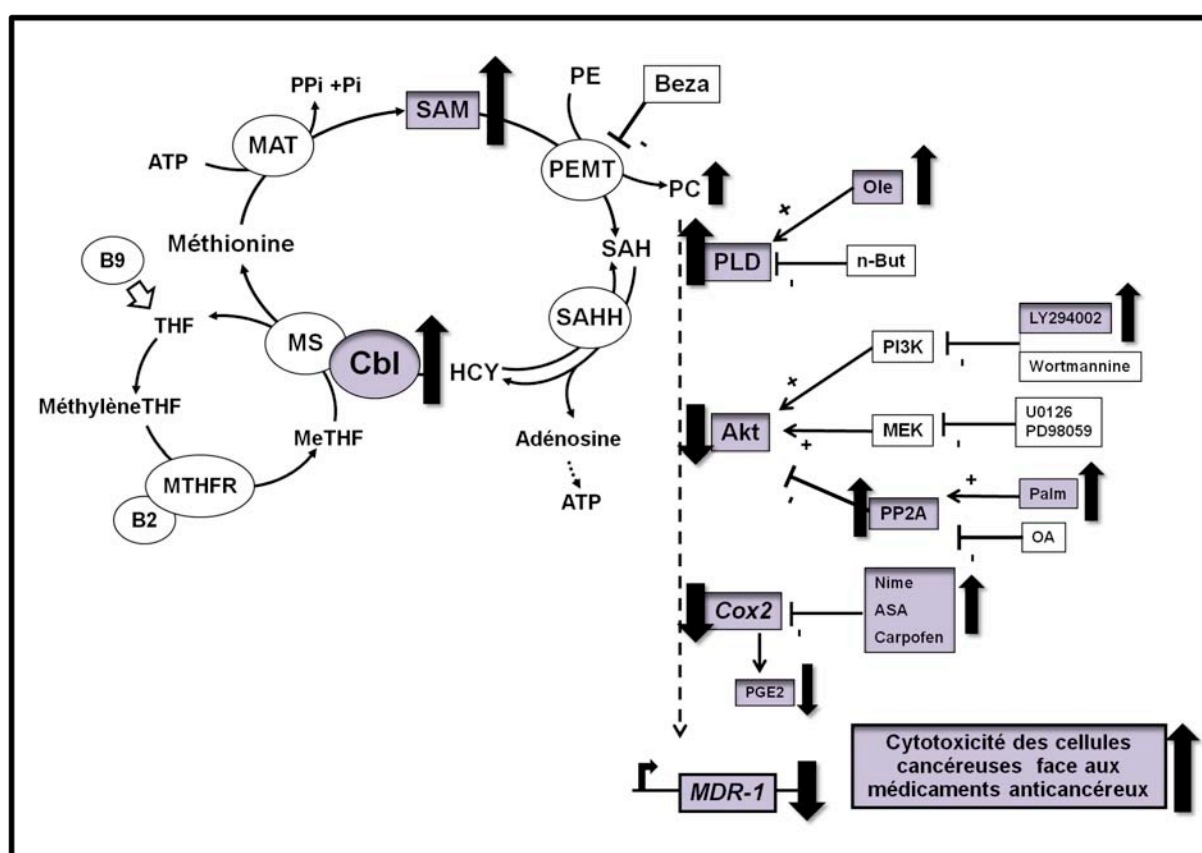


Figure 5.1 : Schéma récapitulatif général des résultats de l'étude. La cobalamine active le cycle de la méthionine en augmentant la production de la SAM. La production de la PC est également augmentée, en présence de Cbl. La Cbl active aussi la PLD. Une activation de la PLD par l'acide oléique, ainsi que la Cbl semblent diminuer l'expression de la protéine P-Akt. La méthylation de PP2A ou son activation par l'acide palmitique, conduisent à une diminution par déphosphorylation de P-Akt. Le même effet est observé avec l'inhibiteur de PI3K, LY294002. Les inhibiteurs de COX-2 conduisent à une diminution de l'expression du

gène Cox-2 et ainsi à la diminution de la production de PGE2. L'ensemble de ces actions conduisent à la diminution de l'expression du gène MDR-1.

Nous avons constaté que la voie étudiée est très riche et complexe. L'intérêt fondamental de cette étude repose, d'une part, sur les résultats obtenus et, d'autre part, sur les questions que ces résultats génèrent.

Même si notre travail a éclairci la voie métabolique située entre le cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1*, il subsiste encore de nombreux points qui restent encore inconnus :

- Quelle est la liaison exacte entre le cycle de la méthionine et la phospholipase D ?
- Est-ce que le produit de la PLD, l'acide phosphatidique, agit sur la voie Akt/PP2A, et de quelle manière ?
- Comment la protéine Akt influence la voie *Cox-2* ?
- Comment la PGE2 active l'expression du gène *MDR-1* ?

Nous ne pouvons actuellement ne fournir que quelques éléments de réponse et ne présenter que des hypothèses pour essayer de répondre à ces questions. Le fait que cette étude suscite une analyse approfondie de cette voie métabolique constitue une vraie dynamique et appuie son intérêt.

- Nous avons évoqué plusieurs fois, pendant la discussion des résultats, la possibilité que la voie PPAR puisse être impliquée dans la cascade de signalisation que nous avons mise en évidence. Plus particulièrement, nous avons souligné le fait que le bézafibrate, qui a été utilisé dans notre étude pour son action d'inhibition sur la phosphatidyléthanolamine méthyltransférase (PEMT), est également un activateur de PPAR α .

Le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) est une protéine de la famille des récepteurs nucléaires liant

naturellement les lipides et agissant comme facteur de transcription des gènes cibles impliqués notamment dans le métabolisme et l'adipogenèse. Les PPARs jouent un rôle important dans le métabolisme des acides gras et l'inflammation. Les formes PPAR α et PPAR γ sont exprimées dans le foie, les reins, le cœur, les muscles et le tissu adipeux. Des activateurs connus des PPARs sont le rosiglitazone et le pioglitazone.

Le fait que PPAR α soit exprimé dans le foie, qu'il soit impliqué dans le métabolisme des lipides (incluant la voie PLD ?) et qu'en plus il soit impliqué dans l'inflammation (implication de la voie Cox), rend la voie PPAR un très bon candidat pour compléter la cascade de signalisation que nous avons analysée.

Ceci est d'autant plus vraisemblable qu'il a été trouvé que la pioglitazone stimule l'apolipoprotéine I (Apo-I) des cellules hépatiques HepG2 (Qin *et al.*, 2007) et que le troglitazone, activateur de la voie PPAR γ inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose des cellules HepG2 *via* une diminution de l'expression de Cox-2 (Li *et al.*, 2003). Il a également été rapporté une régulation de la voie PPAR par des anti-inflammatoires-non-stéroïdiens, qui sont des inhibiteurs de Cox (Gupta *et al.*, 2001). Il a également été prouvé que la synthèse des lipides endogènes génère une espèce de phosphatidylcholine la 1-palmitoyl 2-oléyl phosphatidylcholine, qui sert de ligand endogène de PPAR α (Lamazière *et al.*, 2010). Cette PC pourrait être le substrat de la PLD oléate sensible, qui semble être impliquée dans la voie de signalisation que nous avons proposée. Il sera bien d'analyser précisément l'espèce chimique PC générée par l'ajout de la Cbl aux cellules HepG2 en culture.

Il serait aussi intéressant d'utiliser des effecteurs de cette voie des PPARs, tels que les activateurs rosiglitazone et pioglitazone, et de mettre en évidence leur effet sur l'expression des protéines et des gènes que nous avons étudiés. L'association de ces produits avec la Cbl pourrait ainsi nous renseigner sur une éventuelle implication de la voie PPAR dans l'influence de la Cbl sur l'expression du gène *MDR-1*.

- Notre objectif qui est de mieux connaître la voie de régulation du gène *MDR-1* par la Cbl nous a fait utiliser des effecteurs pharmacologiques particuliers. Certains manquent à l'évidence de spécificité. Il existe d'autres molécules commercialisées par des fournisseurs qui présentent une bien meilleure spécificité. Cependant beaucoup de ces molécules ne sont pas utilisées en clinique. Nous avons préféré utiliser majoritairement des molécules qui sont utilisées en

clinique, afin de pouvoir proposer leur utilisation si des données intéressantes découlaient de notre travail.

- Tout au long de cette étude nous avons effectué une supplémentation du milieu de culture cellulaire en vitamine B12/cobalamine afin d'observer son effet sur l'expression des gènes et des protéines étudiés. Cette supplémentation ouvre la porte à des applications éventuelles de ce travail, puisqu'elle pourrait être combinée à des effecteurs des voies étudiées et potentialiser leur effet.
- Une autre alternative serait aussi intéressante pour encore mieux connaître l'impact de cette cobalamine et par conséquent du cycle de la méthionine sur l'expression du gène *MDR-1*, nous pourrions proposer l'utilisation d'un modèle de carence en vitamine B12. Il serait possible d'utiliser des siRNA dirigés contre le transporteur de la cobalamine TCblR/CD320, afin d'inhiber l'internalisation cellulaire de la Cbl (Lai *et al.*, 2011). Pour le modèle animal, l'utilisation d'anticorps anti-TCblR/CD320 serait une approche intéressante (Jiang *et al.*, 2011). En cas de carence, nous devrions nous attendre à une expression plus importante du gène *MDR-1*. En extrapolant, on pourrait se demander si les personnes carencées en Cbl sont moins sujettes à l'action tumorigène des carcinogènes, substrats de la P-gp, ou encore si les patients cancéreux déficients en Cbl sont moins sensibles à la chimiothérapie.
- mTOR (mammalian target of rapamycin) est une enzyme de la famille des sérine/thréonine kinase qui régule la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, la mobilité cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la transcription.

Cette voie pourrait être intéressante à étudier puisqu'elle semble en interaction avec les acteurs de la voie que nous avons proposée. Il a été trouvé que l'activité PLD élevée dans les cellules MDA-MB-231 conduit aussi à une résistance à la rapamycine (Chen *et al.*, 2002), ce qui indique que mTOR est affectée par l'activité PLD dans ces cellules. De plus, une activation par phosphorylation de la protéine Akt est obtenue grâce à une activation PLD1-dépendante, des complexes mTORC1 et mTORC2 dans le cas des myoblastes en différenciation (Jaafar *et al.*, 2011). Les inhibiteurs de mTOR, analogues de la rapamycine, tels que le temsirolimus, l'everolimus et le ridaforolimus constituent des moyens de thérapie pour certains cancers.

Nous pourrions suggérer que mTOR pourrait alors peut être intervenir dans la cascade de signalisation proposée dans notre travail et il pourrait constituer une cible pharmaceutique très intéressante en combinaison avec la Cbl.

- Il existe une autre voie que nous n'avons pas explorée dans notre travail et qui aurait mérité une attention. La régulation de la P-gp peut aussi passer par des voies telles que la c-Jun. c-Jun et c-Fos forment le facteur de transcription AP-1. Il a été montré que l'activité JNK est corrélée avec le niveau de la P-gp dans des cellules cancéreuses pancréatiques et gastriques (Zhou *et al.*, 2006) et une répression du gène *MDR-1* conduit à une accumulation des agents cytotoxiques dans les cellules tumorales. Ainsi les cellules sont rendues plus sensibles au traitement. Cette voie pourrait être d'autant plus intéressante si son effet était potentialisé par un des effecteurs de la voie que nous avons étudiée dans ce travail de thèse.

L'objectif de ce travail de thèse concernant l'application des ses résultats, serait de proposer une voie de signalisation, qui pourrait être utilisée en tant que cible pharmacologique, dans le but de limiter le phénomène de chimiorésistance, lors de la chimiothérapie. Un des acteurs principaux de la chimiorésistance étant le gène *MDR-1*, codant pour la protéine P-gp, il paraît logique que les approches thérapeutiques le visent.

Nous avons mis en évidence une voie composée de plusieurs intervenants. Pour chacun d'entre eux il est possible d'utiliser un effecteur, qui influence l'expression du gène *MDR-1*. Il serait ainsi possible d'intervenir à chaque étape de cette cascade, que nous avons étudiée, pour cibler le gène *MDR-1*. Nous avons vu que l'utilisation de certains d'entre eux, associés à la Cbl, conduisait à une diminution plus forte de l'expression du gène *MDR-1*. C'est le cas d'une association de la SAM+Cbl, de l'acide oléique+Cbl, de l'acide palmitique+Cbl et du LY294002+Cbl.

La logique de notre proposition, pour limiter le phénomène de chimiorésistance, serait d'intervenir sur des composantes clés de la voie (le cycle de la méthionine, la voie de la phospholipase D, la voie Akt, la voie Cox), que nous avons mise en évidence, afin d'essayer de provoquer une diminution de l'expression du gène *MDR-1*, et ce en combinaison avec des agents utilisés en chimiothérapie.

Nous pourrions aussi nous demander si des activités différentes du cycle de la méthionine pourraient conduire à des susceptibilités différentes à la tumorigénèse. En effet, il existe des polymorphismes sur les différentes enzymes du cycle de la méthionine. Celles-ci sont décrites dans la partie introductive de ce mémoire. Ces polymorphismes sont susceptibles de générer des activités différentes des méthyltransférases et en conséquence, de l'expression du gène *MDR-1*. Physiologiquement, la P-gp sert à évacuer les xénobiotiques, dont certains sont connus pour leurs effets cancérigènes. On pourrait se demander si des polymorphismes particuliers ou encore si le statut vitaminique de la population ne pourrait pas être liée à des susceptibilités différentes aux agents cancérigènes *via* l'expression du gène *MDR-1*. Des études statistiques de population pourraient être entreprises pour évaluer cette hypothèse.

La méthionine dépendance est l'incapacité des cellules à proliférer quand la méthionine est remplacée par de l'homocystéine, de la vitamine B12 et des folates. Cette méthionine dépendance est souvent considérée comme une caractéristique des cellules cancéreuses ou transformées (Halpern *et al.*, 1974). Il a été montré que des xénogreffes de cancers humains chez des souris *nude* sont méthionine dépendantes *in vivo* mais qu'en plus la croissance de la tumeur était très inhibée par un régime alimentaire privé de méthionine (Hoshiya *et al.*, 1995). Des méthodes d'utilisation d'une enzyme qui métabolise la méthionine, sans la régénérer par le cycle de la méthionine, ont été proposées, afin d'obtenir une régression des tumeurs. Cette enzyme est la méthioninase (L-méthionine- α -déamino- γ -mercaptométhane-lyase), qui permet la transformation de la méthionine en méthanethiol, NH_3 et α -cétobutyrate. La croissance des cellules de leucémie lymphoblastique méthionine dépendante en présence d'homocystéine et de méthioninase est complètement inhibée contrairement à celle de fibroblastes normaux de poumons. De plus, il a été montré que la méthioninase ralentissait la croissance des tumeurs plus rapidement qu'une diète en méthionine sans perte de poids (Kreis *et al.*, 1973)

Un régime carencé en méthionine ou le traitement avec la méthioninase sans adjonction d'anticancéreux, permettent une régression de la croissance tumorale avec un allongement de la vie mais pas une éradication de la tumeur. Si nous combinions cet effet à

celui de la cobalamine et d'un agent anticancéreux, nous pourrions éventuellement obtenir des résultats plus intéressants.

De nombreuses équipes proposent l'utilisation d'inhibiteurs pour « cibler » les cellules cancéreuses et sinon les détruire, au moins limiter leur prolifération. Des inhibiteurs de la PLD, de Akt, de mTOR, de la PI3K, de Cox-2, ... sont proposés dans la thérapie anticancéreuse. Les effets de ces composés restent malgré tout limités. Des combinaisons de ces inhibiteurs pourraient alors être proposées. Nous pouvons penser que des combinaisons de ces molécules avec des vinca-alcaloïdes ou des agents anticancéreux, substrats de la P-gp, ne seront pas ou peu efficaces. Pour nous il ne s'agit pas d'utiliser des effecteurs pour chercher des effets additifs mais de rechercher des effecteurs qui potentialisent un agent anticancéreux. Ce type d'approche est différent, et semble même être à l'encontre des stratégies habituelles. Il s'agit d'un autre type d'approche, qui mériterait d'être considérée.

- La SAM, étant un métabolite du cycle de la méthionine, il peut être utilisé comme cible de notre voie d'étude. Des produits tels que la SAM et la cynarine ont été utilisés simultanément, afin d'étudier l'inhibition de la P-gp (Angelini *et al.*, 2012). Les auteurs ont trouvé que la SAM améliorait les effets de la doxorubicine. Bien que l'utilisation de ces agents naturels et hépatoprotecteurs soit une stratégie très intéressante pour l'amélioration de la chimiothérapie, il serait aussi nécessaire de connaître précisément leur mode d'action sur l'expression du gène *MDR-1*, afin d'élucider les mécanismes de contrôle de ce gène. La SAM a été montré d'inhiber l'expression du gène *MDR-1* de la même façon que la cobalamine. Ces deux composés pourraient être utilisés dans une stratégie de supplémentation alimentaire, pour éviter le phénomène de chimiorésistance, puisque tous les deux peuvent être pris par voie orale. La cobalamine est une vitamine et la SAM est également un supplément alimentaire. La SAM a été aussi montrée comme ayant des vertus contre la dépression et les maladies hépatiques.
- Ces dernières années, différentes approches ont été envisagées et testées, ciblant le gène *MDR-1* et/ou la protéine P-gp, comme par exemple l'administration de peptides à haute affinité pour la P-gp et d'anticorps dirigés contre ce transporteur, le développement d'agents

anticancéreux court-circuitant l'efflux par la P-gp et la diminution de l'expression du gène *MDR-1*. Dans un premier temps, des inhibiteurs directs de la P-glycoprotéine ont été utilisés, tels que des inhibiteurs calciques (par ex. le vérapamil, la nifédipine ou la dextniguldipine), des antagonistes de la calmoduline (par ex. la trifluopérazine et la chlorpromazine), des antipaludiques (par ex. la quinine), des antiarythmiques (par ex. la quinidine et l'amiodarone) et un immunosuppresseur, la cyclosporine A (Sharom, 1996). Le plus souvent, l'inefficacité et la toxicité engendrée par ces substrats a été un facteur important pour abandonner leur application clinique.

Des analogues moins toxiques de ces produits ont été aussi utilisés, tels que le dexvérapamil (énantiomère R du vérapamil) et le PSC-833 (Valspodar), analogue de la cyclosporine D, qui antagonisent l'activité de la P-gp sans présenter, des effets bloquant les canaux calciques ni des propriétés immunosuppressives (Szakacs *et al.*, 2006). A des petites doses, ces produits semblent inefficaces et une augmentation de leur dose serait aussi toxique. Des peptides hydrophobes ayant une très grande affinité pour la P-gp sont également utilisés afin d'éviter une chimiorésistance. Certains d'entre eux correspondent à des segments transmembranaires de la P-gp et agissent comme des inhibiteurs puissants et spécifiques de la P-gp (Tarasova *et al.*, 2005). Des anticorps dirigés contre la protéine P-gp ont aussi fait partie des stratégies d'inhibition de la chimiorésistance. Certains se sont avérés efficaces dans l'inhibition de l'efflux des médicaments substrats de cette protéine (Mechetner *et al.*, 1992).

Nous pouvons comprendre la complexité de la régulation du gène *MDR-1*, par une observation des séquences de son promoteur, des facteurs de transcription qui y sont liés et des polymorphismes, qui peuvent être générés. Le polymorphisme génétique de *MDR-1* peut jouer un rôle important à cause de l'impact qu'ils peuvent avoir sur la protéine P-gp. La P-gp étant modifiée, elle peut avoir un rôle modifié sur le transport des médicaments anticancéreux toxiques et ainsi modifier leur capacité de cytotoxicité (Robert *et al.*, 2005). Le phénotype cellulaire MDR peut également être modulé grâce à un ciblage de la région MED-1 (Multiple start site Element Downstream 1) du promoteur du gène *MDR-1* (Marthinet *et al.*, 2000).

La régulation de l'expression de la P-gp est très complexe et le problème principal survenu lors de sa manipulation est l'apparition des effets secondaires. L'objectif d'une thérapie est d'essayer d'éliminer toutes les cellules cancéreuses sans pour autant détruire les cellules saines. La régulation de l'expression du gène *MDR-1* semble être pour cette raison un

terrain intéressant, elle permettait aussi de réduire les doses efficaces de ces substances et, de manière conjointe lutter plus efficacement contre le cancer. Le rôle des voies PLD, Akt et Cox, dans l'inhibition de l'expression du gène *MDR-1* par la cobalamine, s'est avéré important. Le ciblage de ces voies pourrait être un moyen très efficace de limiter phénomène de chimiorésistance et ainsi, d'améliorer des traitements chimiothérapeutiques.

- L'effet *in vitro* de l'inhibition de la Cox-2 sur la voie de signalisation ERK/MAPK et l'effet de la combinaison des inhibiteurs de MEK (MAPK kinase) (U0126) et de Cox-2 (NS398) a été étudié dans l'hépatocarcinome humain. En dépit d'une signalisation différente dans les cellules HepG2 et Hep3B, l'effet de la combinaison de l'inhibiteur de la Cox-2 NS398 et de l'inhibiteur de MEK U0126 conduit à des actions antitumorales améliorées. Cette nouvelle combinaison pourrait peut être utile pour des études *in vivo* sur le carcinome hépatocellulaire. (Schmidt *et al.*,2003). Nous pourrions peut-être aussi proposer leur utilisation en combinaison avec de la Cbl et/ou un vinca-alcaloïde.

Il y a un certain nombre de travaux de la littérature qui font état de résultats qui semblent contradictoires aux nôtres. Parmi eux, ceux relatifs à l'étude des mécanismes d'action du LPS sont intéressants. Les lipopolysaccharides (LPS) augmentent l'expression de la cyclo-oxygénase 2 dans les macrophages et stimulent la production de prostaglandines, composantes majeures de l'inflammation. Dans un effort pour identifier des nouvelles stratégies pour réduire l'expression LPS-inductible de Cox-2, les inhibiteurs de phospholipases impliqués dans la surexpression de la Cox-2 ont été étudiés. Le LPS augmente l'expression de l'ARNm de la Cox-2 et de la protéine par l'activation séquentielle de la phosphatidylcholine-spécifique phospholipase C (PC-PLC), de la protéine kinase C (PKC) et aussi de la phosphatidylcholine-spécifique phospholipase D (PC-PLD). Le LPS stimulera donc la production d'acide phosphatidique (PA), qui augmentera l'expression de l'ARNm du gène Cox-2 et de sa protéine. L'inhibition de la PC-PLC par le D609 (tricyclodecanoyl xanthogénate), et de la PC-PLD par le n-Butanol, réduit la production de PA LPS-dépendante et supprime l'augmentation de l'ARNm du gène Cox-2 et de sa protéine. Ces résultats suggèrent que les inhibiteurs de la PC-PLC, de la PKC et de la PC-PLD, pourraient être utiles dans la gestion d'une surproduction de prostaglandines par le LPS et d'un dysfonctionnement vasculaire dans inflammation (Lee *et al.*,2003). Il pourrait sembler étrange que ces auteurs trouvent que l'activation de la PLD active l'expression du gène Cox-2 alors que nous, nous trouvons que l'activation de la PLD inhibe l'expression du gène Cox-2. Il faut cependant se

rappeler que cette étude porte sur le choc septique, ce qui signifie que des doses massives de LPS sont ajoutées aux cellules et que donc les voies de signalisation mobilisées le sont de manière intensive et surement différentes que lorsque des doses modérées sont étudiées. D'autre part, ce ne sont pas les mêmes voies de signalisation qui sont mobilisées, le LPS agissant sur des recepneur Toll qui vont mobiliser de nombreux seconds messagers d'une manière complexe. Il est logique de penser que des agents, drogues, hormones, ligands qui vont générer des seconds messagers vont peut-être moduler les voies que nous avons mises en évidence dans notre travail. Quoi qu'il en soit, ce travail montre aussi que les voies PLD et Cox-2 sont bien reliées même si nous n'obtenons pas les mêmes résultats.

Il avait été mis en évidence par l'équipe que la Cbl et la diminuait l'expression du gène *MDR-1* (Marguerite *et al.*, 2007). La cascade de signalisation reliant le cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1* a été explorée en partie. Cette cascade contient la voie des phospholipases et notamment la phospholipase D (Marguerite, Gkikopoulou *et al.*, 2012), les voies de régulation, telles que la PP2A, la protéine Akt et la voie des cyclo-oxygénases, ou son produit, la PGE2 (ce travail de thèse). En conséquence, la diminution de l'expression du gène *MDR-1* est accompagnée par une diminution de l'expression de la protéine P-gp et aussi une diminution de sa fonctionnalité. Les cellules HepG2 deviennent plus sensibles *vis-à-vis* de la vinblastine, médicament anticancéreux cytotoxique, quand elles sont incubées avec la Cbl associée ou pas avec des effecteurs des voies que nous avons mises en évidence, tels que l'acide oléique. Une combinaison de la Cbl ou/et d'un des effecteurs d'une des voies étudiées dans ce travail en combinaison avec un produit utilisé en chimiothérapie serait intéressante à être évaluée. Ce type de combinaison qui, en plus, serait facile à utiliser, pourrait s'avérer être une méthode de prévention ou d'opposition au phénomène de la chimiorésistance. Les résultats de ce travail pourraient éventuellement épauler les efforts d'amélioration de la chimiothérapie.

Conclusion générale

Ce travail aura été, je l'espère, une petite pierre ajoutée à un édifice qui permettra de mieux comprendre certains mécanismes cellulaires et qui pourrait peut-être apporter de nouvelles idées, qui pourraient peut-être avoir une certaine utilité dans la lutte contre le cancer.

Il est certain que plusieurs questions dérivent de ce travail. Je pense que la force d'un travail est non seulement de répondre à des questions (ce que j'ai essayé de faire de mon mieux...) mais aussi d'ouvrir des perspectives nouvelles vers des chemins non explorés, ou vers de voies qui nécessitent une

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- ABOLHODA A., WILSON A.E., ROSS H., DANENBERG P.V., BURTM., SCOTTO K.W. Rapid Activation of *MDR1* Gene Expression in Human Metastatic Sarcoma after *in Vivo* Exposure to Doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 1999; 5: 3352–3356
- AHUJA R., YAMMANI R. Interactions of cubilin with megalin and the product of the amnionless gene (AMN): effect on its stability. *Biochem. J.* 2008;410: 301-8
- AKESSON B., FEHLING C., JÄGERSTAD M. Effect of vitamin B12 deficiency on phosphatidylethanolamine methylation in rat liver. *Br.J.Nutr.* 1978;40: 521-27
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. BAD phosphorylation by Akt. *Mol. Biol. cell.* 2002 figure 15-60
- ALLEN R. H., SEETHARAM B. Effect of proteolytic enzymes on the binding of cobalamin to R protein and intrinsic factor. In vitro evidence that a failure to partially degrade R protein is responsible for cobalamin malabsorption in pancreatic insufficiency. *J. Clin. Invest.* 1978;61: 47-54
- ALVAREZ-BRECKENRIDGE C.A., WAITE K.A., ENG C. PTEN regulates phospholipase D and phospholipase C. *Hum. Mol. Genet.* 2007;16:1157-63
- AMBUDKAR S.V., DEY S., HRYCYNIA C.A., RAMACHANDRA M., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999;39: 361-98
- ANDRABI S., GJOERUP O.V., KEAN J.A., ROBERTS T.M., SCHAFFHAUSEN B. Protein phosphatase 2A regulates life and death decisions via Akt in a context-dependent manner. *PNAS.* 2007; 104: 19011–19016
- ANDRESEN B.T., RIZZO M.A., SHOME K., ROMERO G. The role of phosphatidic acid in the regulation of the Ras/MEK/Erk signaling cascade. *FEBS Lett.* 2002;531: 65-8
- ANGELINI A., DI PIETRO R., CENTURIONE L., CASTELLANI M.L., CONTI P., PORRECA E., CUCCURULLO F. Inhibition of p-glycoprotein-mediated transport by s-adenosylmethionine and cynarin in multidrug-resistant human uterine sarcoma MES-SA/Dx5 cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 2012;26:495-504
- APPLEBY S.B., RISTIMAKI A., NEILSON K., NARKO K., HLA T. Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem. J.* 1994 ;66 :723-727
- ARIAS IM., GATMAITAN Z., MAZZANTI R., SHU H., KUMAMOTO Y. Structure and function of P-glycoprotein in the normal liver and intestine. *Princess Takamatsu Symp.* 1990;21: 229-39
- AUVINEN M., PAASINEN A., ANDERSSON L.C., HÖLTÄ E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature.* 1992;360:355-8
- AVILA M. A., BERASAIN C. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2000; 33: 907-14
- AVILA M.A., GARCIA-TREVIJANO E.R., MARTINEZ-CHANTAR M.L., LATASA M.U. PEREZ-MATO, MARTINEZ-CRUZ L.A. DEL PINO M.M., CORRALES F.J., MATO J.M. S-Adenosylmethionine revisited: its essential role in the regulation of liver function. *Alcohol.* 2002; 27: 163-7. Review.
- BANERJEE R., VLASIE M. Controlling the reactivity of radical intermediates by coenzyme B(12)-dependent methylmalonyl-CoA mutase. *Biochem. Soc. Trans.* 2002;30:621-4
- BANNO Y., TAKUWA Y., YAMADA M., TAKUWA N., OHGUCHI K., HARA A., NOZAWA Y. Involvement of phospholipase D in insulinlike growth factor-I-induced activation of extracellular signal regulated kinase, but not phosphoinositide 3-kinase or Akt, in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 2003;369: 363–368
- BARANČÍK M., BOHÁCOVÁ V., SEDLÁK J., SULO VÁ Z., BREIER A. LY294002, a specific inhibitor of PI3K/Akt kinase pathway, antagonizes P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006;29: 426-34
- BARBET J.L., SNOOK T., GAY J.M., MEALEY K.L. ABCB1-1 Delta (MDR1-1 Delta) genotype is associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime for generalized demodicosis. *Vet. Dermatol.* 2009; 20:111–114

Références Bibliographiques

- BATTAGLIA-HSU S.F., AKCHICHE N., NOEL N., ALBERTO J.M., JEANNESSON E., OROZCO-BARRIOS C.E., MARTINEZ-FONG D., DAVAL J.L., GUEANT J.L. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *PNAS*. 2009;106: 21930–21935
- BEGUM N., RAGOLIA L. cAMP counter-regulates insulin-mediated protein phosphatase-2A inactivation in rat skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 1996;271:31166-31171
- BEGUM N., RAGOLIA L. Role of janus kinase-2 in insulin-mediated phosphorylation and inactivation of protein phosphatase-2A and its impact on upstream insulin signalling components. *Biochem. J.* 1999;344:895-901
- BEYER I., CAO H., PERSSON J., SONG H., RICHTER M., FENG Q., YUMUL R., VAN RENSBURG R., LI Z., BERENSON R., CARTER D., ROFFLER S., DRESCHER C., LIEBER A. Co-administration of epithelial junction opener JO-1 improves the efficacy and safety of chemotherapeutic drugs. *Clin. Cancer Res.* 2012;18:3340-51
- BILLINGS R.E., NOKER P.E., TEPHLY T.R. The role of methionine in regulating folate-dependent reactions in isolated rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1981;208:108-20
- BLIGH EG., DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959;37: 911-17
- BODOR M., KELLY E.J., HO R.J. Characterization of the Human *MDR1* Gene. *The AAPS Journal* 2005;7: Article 1
- BOSCH I., DUNUSSI-JOANNOPOULOS K., WU RL., FURLONG ST., CROOP J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 1997;36: 5685-94
- BOSE S., SEETHARAM S. Membrane expression and interactions of human transcobalamin II receptor. *J. Biol. Chem.* 1995;270: 8152-7
- BOTTIGLIERI T. Homocysteine and folate metabolism in depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2005;29: 1103-12
- BOUALI S., CHRÉTIEN A.S., RAMACCI C., ROUYER M., BECUWE P., MERLIN J.L. PTEN expression controls cellular response to cetuximab by mediating PI3K/AKT and RAS/RAF/MAPK downstream signaling in KRAS wild-type, hormone refractory prostate cancer cells. *Oncol. Rep.* 2009;21:731-5
- BRIZUELA L., RABANO M., GANGOITI P., NARBONA N., MACARULLA J.M., TRUEBA M., GOMEZ-MUNOZ A. Sphingosine-1-phosphate stimulates aldosterone secretion through a mechanism involving the PI3K/PKB and MEK/ERK 1/2 pathways. *J. Lipid Res.* 2007;48: 2264-2274
- BROSNAN J.T., JACOBS J.M., STEAD L.M., BROSNAN M.E. Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. *Acta Biochim. Pol.* 2004; 51: 405-13
- BRUNAUD .L, ALBERTO J.M., AYAV A., GÉRARD P., NAMOUR F., ANTUNES L., BRAUN M., BRONOWICKI J.P., BRESLER L., GUÉANT J.L. Vitamin B12 is a strong determinant of low methionine synthase activity and DNA hypomethylation in gastrectomized rats. *Digestion.* 2003;68:133-40
- CADWALLADER K.A., UDDIN M., CONDLIFFE A.M., COWBURN A.S., WHITE J.F., SKEPPER J.N., KRISTAKIS N.T., CHILVERS E.R. Effect of priming on activation and localisation of phospholipase D-1 in human neutrophils. *Eur.J.Biochem.*, 2004, 271:2755-2764
- CANTLEY L.C., NEEL B.G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999;96:4240-4245
- CARRASCO-MARIN E., ALVAREZ-DOMINGUEZ C., LEYVA-COBIAN F. Wortmannin, an inhibitor of phospholipase D activation, selectively blocks major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation. *Eur. J. Immunol.* 1994;24:2031-9
- CASTLE P.E., HILLIER S.L., RABE L.K., HILDESHEIM A., HERRERO R., BRATTI M.C., SHERMAN M.E., BURK R.D., RODRIGUEZ A.C., ALFARO M., HUTCHINSON M.L., MORALES J., SCHIFFMAN M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 2001;10:1021-7
- CAVUOTO P., FENECH MF. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer. Treat. Rev.* 2012;38: 726-36
- CERVELLO M., MONTALTO G. Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2006;12:5113-5121

- CHEN C.J., CHIN J.E., UEDA K., CLARK D.P., PASTAN I., GOTTESMAN M.M., RONINSON I.B. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*. 1986;47:381-9
- CHEN J., GIOVANNUCCI E., HANKINSON S.E., MA J., WILLETT W.C., SPIEGELMAN D., KELSEY K.T., HUNTER D.J. A prospective study of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase gene polymorphisms, and risk of colorectal adenoma. *Carcinogenesis*. 1998;19:2129-32
- CHEN J. AND FANG Y. A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem. Pharmacol.* 2002;64: 1071 – 1077
- CHEN J., MARTIN B.L., BRAUTIGAN D.L. Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosinephosphorylation. *Science* 1992;257:1261-1264
- CHEN L. H., LIU M. L. Human methionine synthase. cDNA cloning, gene localization, and expression. *J. Biol. Chem.* 1997;272: 3628-34
- CHEN M., PEYRIN-BIROULET L., GEORGE A., COSTE F., BRESSENOT A., BOSSENMEYER-POURIE C., ALBERTO J.M., XIA B., NAMOUR B., GUÉANT J.L. Methyl deficient diet aggravates experimental colitis in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 2011;15: 2486-2497
- CHEN J., SOMANATH P.R., RAZORENOVA O., CHEN W.S., HAY N., BORNSTEIN P., BYZOVA T.V. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat. Med.* 2005;11:1188-96
- CHEN PS., TORIBARA TY., WARNER H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* 1956;28: 1756-58
- CHENG A.S., CHAN H.L., LEUNG W.K., WONG N., JOHNSON P.J., SUNG J.J. Specific COX-2 inhibitor, NS-398, suppresses cellular proliferation and induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* 2003;23:113-9
- CHIN K.V., UEDA K., PASTAN I., GOTTESMAN M.M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*. 1992 ; 255: 459-462
- CHOU M.M., BLENIS J. The 70 kDa S6 kinase: regulation of a kinase with multiple roles in mitogenic signalling. *CURR. OPIN. CELL. BIOL.* 1995;7:806-814
- CHRISTENSEN EL., ARBOUR L., TRAN P., LECLERC D., SABBAGHIAN N., PLAN R., GILFIX B.M, ROSENBLAN D.S., GRAVE1 R.A., FORBES P., ROZEN R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am. J. Med. Genet.* 1999;84: 15 1-7
- CHRISTOPHER S.A., DIEGELMAN P., PORTER C.W., KRUGER W.D. Methylthioadenosine phosphorylase, a gene frequently codeleted with p16(*cdkN2a/ARF*), acts as a tumor suppressor in a breast cancer cell line. *Cancer Res.* 2002;62:6639-44
- CORNWELL M.M. The Human Multidrug Resistance Gene: Sequences Upstream and Downstream of the Initiation Site Influence Transcription. *Cell Growth Differ.* 1990;1: 607-615
- COWLEY S., PATERSON H., KEMP P., MARSHALL C.J. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*. 1994;77:841-52
- CREWS C.M., ALESSANDRINI A., ERIKSON R.L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science*. 1992;258:478-80
- CURNIS F., SACCHI A., CORTI A. Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J. Clin. Invest.* 2002;110: 475-482
- CZARNY M., LAVIE Y., FIUCCI G., LISCOVITCH M. Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J. Biol. Chem.* 1999;274: 2717-24
- DART R. Hydroxocobalamin for Acute Cyanide Poisoning. *Clin. Toxicol.* 2006; 44, 1-3
- DAUM G., LEES N. D., BARD M., DICKSON R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1998 ;14 :1471–1510

Références Bibliographiques

- DAWSON P.A., COCHRAN D.A., EMMERSON B.T., KRAUS J.P., DUDMAN N.P., GORDON R.B. Variable hyperhomocysteinaemia phenotype in heterozygotes for the Gly307Ser mutation in cystathionine beta-synthase. *Aust. N. Z. J. Med.* 1996;26: 180-5
- DEAN M., RZHETSKY A., ALLIKMETS R. The human ATP-Binding Cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.*, 2001;11: 1156-1166
- DEAN M., HAMON Y., CHIMINI G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid. Res.* 2001;42: 1007-17
- DE BAERE I., DERUA R., JANSSENS V., VAN HOOFF C., WAELEKENS E., MERLEVEDE W., GORIS J. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase and cloning of the human homologue. *Biochemistry.* 1999; 38:16539-47
- DENIZOT F., LANG R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 1986;89:271-7
- DESAI N., HONG Z., OLIVERA A., MATTIE M.E., SPIEGEL S. Sphingosine-1-phosphate, a metabolite of sphingosine, increases phosphatidic acid levels by phospholipase D activation. *J. Biol. Chem.* 1992;32:23122-23128
- DOBRYNSKA I., SZACHOWICZ-PETELSKA B., SULKOWSKI S., FIGASZEWSKI Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;276: 113-19
- ELLA K.M., MEIER G.P., BRADSHAW C.D., HUFFMAN K.M., SPIVEY E.C., MEIER K.E. A fluorescent assay for agonist-activated phospholipase D in mammalian cell extracts. *Anal. Biochem.*, 1994;218: 136-42
- ENDICOTT J.A., LING V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 1989;58:137-71
- ENOKIDA H., DAHIYA R. CpG Hypermethylation of *MDR1* Gene Contributes to the Pathogenesis and Progression of Human Prostate Cancer. *Cancer Res.* 2004;64: 5956–5962
- ERNEST S., BELLO-REUSS E.. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999;10: 2306-13
- EXTON JH. Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur. J. Biochem.* 1997;243: 10-20
- EXTON JH. Phospholipase D-structure, regulation and function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2002;144: 1-94
- EXTON J.H. Regulation of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999;1439: 121- 133
- EYSTER K.M. The membrane and lipids as integral participants in signal transduction: lipid signal transduction for the non-lipid biochemist. *Adv. Physiol. Educ.* 2007;31:5-16
- FAISSNER A., HECK N., DOBBERTIN A., GARWOOD J. DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2006;557:25-53
- FERLAY J., SHIN H.R., BRAY F., FORMAN D., MATHERS C., PARKIN D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer.* 2010;127 :2893–2917
- FINKELSTEIN J. D., HARRIS B. J. Regulation of hepatic betaine-homocysteine methyltransferase by dietary methionine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982;108:344-8
- FINKELSTEIN J. D., MARTIN J. J. Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J. Biol. Chem.* 1984;259: 9508-13
- FIUCCI G., CZARNY M., LAVIE Y., ZHAO D., BERSE B., BLUSZTAJN JK., LISCOVITCH M. Changes in phospholipase D isoform activity and expression in multidrug-resistant human cancer cells. *Int. J. Cancer.* 2000;85: 882-88
- FOJO A. T., UEDA K., SLAMON D.J., POPLACK D.G., GOTTESMAN M.M., PASTAN I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 265-269
- FONG C.Y., PANG L., HOLLAND E., KNOX A.J. TGF-beta1 stimulates IL-8 release, COX-2 expression and PGE2 release in human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000; 279 : 201-7

- Fontecave M., Atta M., Mulliez E. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* 2004;29:243-9
- Foster DA. Targeting Phospholipase D-mediated Survival Signals in Cancer. *Curr. Signal. Transd. T* 2006;1: 295-303
- Franke T.F., Kaplan DR, Cantley L.C. PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis. *Cell.* 1997;88: 435–437
- Franke T.F., Kaplan D.R., Cantley L.C., Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* 1997;275:665-668
- Frias M.A., Dubouloz F., Rebsamen M.C., Lang U. Prostacyclin production in rat aortic smooth muscle cells: role of protein kinase C, phospholipase D and cyclooxygenase-2 expression. *Cardiovasc. Res.* 2003;60:438-446
- Fung K.L., Gottesman M.M. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim. Biophys. Acta* 2009;1794:860–871
- Funk C.D., Funk L.B., Kennedy M.E., Pong A.S., Fitzgerald G.A. Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* 1991;5:2304-12
- Garcia-Tevejano E. R., Berasain C. Hyperhomocysteinemia in liver cirrhosis: mechanisms and role in vascular and hepatic fibrosis. *Hypertension* 2001; 38: 1217-21
- Garofalo R.S., Orena S.J., Rafidi K., Torchia A.J., Stock J.L., Hildebrandt A.L., Coskran T., Black S.C., Brees D.J., Wicks J.R., McNeish J.D., Coleman K.G. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β . *J.Clin.Invest.* 2003;112(2):197-208
- Gaustadnes M., Rudiger N., Rasmussen K., Ingerslev J. Familial thrombophilia associated with homozygosity for the cystathionine beta-synthase 833T→C mutation. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 2000;20: 1392-5
- Glynn S.A., Prueitt R.L., Ridnour L.A., Boersma B.J., Dorsey T.M., Wink D.A., Goodman J.E., Yfantis H.G., Lee D.H., Ambs S. COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer. *B.M.C. Cancer.* 2010;10:626
- Goldstein L.J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S.L., Gazdar A. Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *J.Natl.Cancer Inst.*, 1989, 81:116-124
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates E.S. Multidrug resistance in cancer:role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2: 48-58
- Graves L.M., Guy H.I., Kozlowski P., Huang M., Lazarowski E., Pope R.M., Collins M.A., Dahlstrand E.N., Earp H.S., 3rd, Evans D.R. Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 2000;403:328-332
- Grzelakowska-Sztabert B., Landman-Balińska M. Regulation of methionine synthetase in L-cells by vitamin B-12, folate and methionine. *Biochem. Soc. Trans.* 1976;4:922-5
- Gueant J.L., Champigneulle B., Gaucher P., Nicolas J.P. Malabsorption of vitamin B12 in pancreatic insufficiency of the adult and of the child. *Pancreas.* 1990;5:559-67
- Gueant J.L., Gueant-Rodriguez R.M., Anello G., Bosco P., Brunaud L., Romano C., Ferri R., Romano A., Candito M., Namour B. Genetic determinants of folate and vitamin B12 metabolism: a common pathway in neural tube defect and Down syndrome? *Clin. Chem. Lab. Med.* 2003;41:1473-7
- Guéant J.L. AND Namour F.. Vitamin B12: Absorption, Metabolism and Deficiency. *Encyclopedia of Gastroenterology Elsevier (USA).* 2004
- Guéant-Rodriguez R.M., Juillié Y., Candito M., Adjalla C.E., Gibelin P., Herbeth B., Van Obberghen E., Gueant J.L. Association of MTRRA66G polymorphism (but not of MTHFR C677T and A1298C, MTR2756G, TCN C776G) with homocysteine and coronary artery disease in the French population. *Thromb. Haemost.* 2005;94:510-5
- Guénin S., Schwartz L., Morvan D., Steyaert J.M., Poignet A., Madelmont J.C., Demidem A. PP2A activity is controlled by methylation and regulates oncoprotein expression in melanoma cells: a mechanism which participates in growth inhibition induced by chloroethylnitrosourea treatment. *Int. J. Oncol.* 2008;32:49-57

Références Bibliographiques

- GULATI S., BRODY L.C., BANERJEE R. Posttranscriptional regulation of mammalian methionine synthase by B12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;259:436-42
- GUPTA R.A., DUBOIS R.N. Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nature Reviews Cancer* 2001;1:11-21
- HAMADA A., MIYANO H., WATANABE H., SAITO H. Interaction of Imatinib Mesilate with Human P-Glycoprotein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003;307: 824–828
- HA K.S., EXTON J.H. Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 1993;268:10534-9
- HALPERN B.C., CLARK B.R., HARDY D.N., HALPERN R.M., SMITH R.A. The effect of replacement of methionine by homocystine on survival of malignant and normal adult mammalian cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1974;71:1133-6
- HEMPEL S.L., MONICK M.M., HUNNINGHAKE G.W. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J. Clin. Invest.* 1994;93:391-6
- HILL B.A., BROWN P.C., PREISEGGER K.H., SILVERMAN J.A. Regulation of *mdr1b* gene expression in Fischer, Wistar and Sprague-Dawley rats in vivo and in vitro. *Carcinogenesis.* 1996;17:451-7
- HIRATA F., TOYOSHIMA S., AXELROD J., WAXDAL M.J. Phospholipid methylation: a biochemical signal modulating lymphocyte mitogenesis. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A.* 1980;77:862-5
- HOGENKAMP H.P.C., COLLINS D.A., GRISSOM C.B., WEST F.G. Diagnostic and therapeutic analogues of cobalamin. *Chem. Biochem. of B12.* Wiley-Interscience. 1999 ; 385-410
- HOSHIYA Y., GUO H., KUBOTA T., INADA T., ASANUMA F., YAMADA Y., KOH J., KITAJIMA M., HOFFMAN R.M. Human tumors are methionine dependent in vivo. *Anticancer. Res.* 1995;15:717-8
- HSIEH H.L., WU C.B., SUN C.C., LIAO C.H., LAU Y.T., YANG C.M. Sphingosine-1-phosphate induces COX-2 expression via PI3K/Akt and p42/p44 MAPK pathways in rat vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.* 2006;207:757-66
- HU Z., JIN S., SCOTTO K.W. Transcriptional Activation of the MDR1 Gene by UV Irradiation ROLE OF NF-Y AND Sp1. *J. Biol. Chem.* 2000;275: 2979–2985
- HU X.F., LI J., YANG E., VANDERVALK S., XING P.X. Anti-Cripto Mab inhibit tumour growth and overcome MDR in a human leukaemia MDR cell line by inhibition of Akt and activation of JNK/SAPK and bad death pathways. *Br. J. Cancer.* 2007;96:918-27
- HUANG D.S., SHEN K.Z., WEI J.F., LIANG T.B., ZHENG S.S., XIE H.Y. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World. J. Gastroenterol.* 2005;11:204-7
- HUENNEKENS FM, DIGIROLAMO PM, FUJII K, JACOBSEN DW, VITOLS KS. B12 -- dependent methionine synthetase as a potential target for cancer chemotherapy. *Adv. Enzyme Regul.* 1976; 14:187–205
- JAAFAR R., ZEILLER C., PIROLA L., DI GRAZIA A., NARO F., VIDAL H., LEFAI E., NÉMOZ G. Phospholipase D regulates myogenic differentiation through the activation of both mTORC1 and mTORC2 complexes. *J Biol Chem.* 2011;286:22609-21
- JACOBS R., STEAD L., DEVLIN C., TABAS I., BROSNAN M., BROSNAN J., AND VANCE D. Physiological Regulation of Phospholipid Methylation Alters Plasma Homocysteine in Mice. *J. Biol. Chem.* 2005 ;280 : 28299–28305
- JAKUBOWSKI H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J. Nutr.* 2006;136 : 1741S-1749S
- JAMES S.J., POGRIBNY I.P., POGRIBNA M., MILLER B.J., JERNIGAN S., MELNYK S. Mechanisms of DNA Damage, DNA Hypomethylation, and Tumor Progression in the Folate/Methyl-Deficient Rat Model of Hepatocarcinogenesis. 2003; *J. Nutr.* 133: 3740S–3747S
- JANSEN G., PIETERS R. The role of impaired transport in (pre)clinical resistance to methotrexate: insights on new antifolates. *Drug Resist. Updates.* 1998;1: 211-218
- JIANG W., NAKAYAMA Y., SEQUEIRA J.M., QUADROS E.V. Characterizing monoclonal antibodies to antigenic domains of TCbIR/CD320, the receptor for cellular uptake of transcobalamin-bound cobalamin. *Drug. Deliv.* 2011;18:74-8.

- JIRALERSPONG S., PALLA S.L., GIORDANO S.H., MERIC-BERNSTAM F., LIEDTKE C., BARNETT C.M., HSU L., HUNG M.C., HORTOBAGYI G.N., GONZALEZ-ANGULO A.M. Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009 ;27: 3297-3302
- JOSEPH T., BRYANT A., FRANKEL P., WOODEN R., KERKHOFF E., RAPP U. R., AND FOSTER D. A. Phospholipase D overcomes cell cycle arrest induced by highintensity Raf signaling. *Oncogene*, 2002;21: 3651 – 3658
- KANDEL E.S., SKEEN J., MAJEWSKI N., DI CRISTOFANO A., PANDOLFI P.P., FELICIANO C.S., GARTEL A., HAY N. Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:7831-41
- KARS M.D., ISERI O.D., GUNDUZ U., URAL A.U., ARPACI F., MOLNAR J. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res.* 2006;26: 4559-68
- KAZAMA H., YONEHARA S. Oncogenic K-Ras and basic fibroblast growth factor prevent Fas-mediated apoptosis in fibroblasts through activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Cell. Biol.* 2000;148:557-566
- KENNEDY E. P., WEISS S. B. The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 1956;222: 193–214
- KENT C., CARMAN G.M. Interactions among pathways for phosphatidylcholine metabolism, CTP synthesis and secretion through the Golgi apparatus. *Trends Biochem. Sci.* 1999;24:146-50
- KENYON S.H., NICOLAOU A., AST T., GIBBONS W.A. Stimulation in vitro of vitamin B12-dependent methionine synthase by polyamines. *Biochem. J.* 1996; 316: 661-665
- KIM S.Y., AHN B.H., MIN K.J., LEE Y.H., JOE E.H., MIN D.S. Phospholipase D isozymes mediate epigallocatechin gallate-induced cyclooxygenase-2 expression in astrocyte cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279:38125-33
- KIM, K. O., LEE, K. H., KIM, Y. H., PARK, S. K., AND HAN, J. S. Antiapoptotic role of phospholipase D isozymes in the glutamate-induced cell death. *Exp. Mol. Med.*, 2003 ;35: 38 – 45
- KIM S.H., LEE S.H., KWAK N.H., KANG C.D., CHUNG B.S. Effect of the activated Raf protein kinase on the human multidrug resistance 1 (MDR1) gene promoter. *Cancer Lett.* 1996;98:199-205
- KIM S.Y., AHN B.H., MIN K.J., LEE Y.H., JOE E.H., MIN D.S. Phospholipase D isozymes mediate epigallocatechin gallate-induced cyclooxygenase-2 expression in astrocyte cells. *J. Biol. Chem.* 2004;279: 38125-33
- KIS B., SNIPES J.A., BUSIJA D.W. Acetaminophen and the cyclooxygenase-3 puzzle: sorting out facts, fictions, and uncertainties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;315:1-7
- KOGA H., SAKISAKA S., OHISHI M., KAWAGUCHI T., TANIGUCHI E., SASATOMI K., HARADA M., KUSABA T., TANAKA M., KIMURA R., NAKASHIMA Y., NAKASHIMA O., KOJIRO M., KUROHJI T., SATA M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology.* 1999;29:688-690
- KRAEMER S.A., MEADE E.A., DEWITT D.L. Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure : identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992 ;293 :391-400
- KREDICH N.M., HERSHFELD M.S. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1979;76:2450-4
- KREDICH N.M., MARTIN D.V. JR. Role of S-adenosylhomocysteine in adenosinemediated toxicity in cultured mouse T lymphoma cells. *Cell.* 1977;12:931-8
- KREIS W., HESSION C. Biological effects of enzymatic deprivation of L-methionine in cell culture and an experimental tumor. *Cancer Res.* 1973;33:1866-9
- KUTZBACH C., STOKSTAD E.L. Mammalian Methylenetetrahydrofolate reductase. Partial purification, properties and inhibition by S-adenosylmethionine. *Bioch. Biophys. Acta* 1971;250 :459-477
- LAI S.C., NAKAYAMA Y., SEQUEIRA J.M., QUADROS E.V. Down-regulation of transcobalamin receptor TCblR/CD320 by siRNA inhibits cobalamin uptake and proliferation of cells in culture. *Exp. Cell. Res.* 2011;317:1603-7
- LAMAZIERE A., WOLF C. Phosphatidylcholine and PPARalpha: a relevant connection in liver disease? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2010;34:250-1

Références Bibliographiques

- LAPORTE J.D., MOORE P.E., LAHIRI T., SCHWARTZMAN I.N., PANETTIERI R.A. JR., SHORE S.A. p38 MAP kinase regulates IL-1 beta responses in cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2000;279:L932-41
- LAVIE Y., FIUCCI G., LISCOVITCH M. Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001;49:317-23
- LAVOIE J.N., L'ALLEMAIN G., BRUNET A., MULLER R., POUYSSEGUR J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 1996;271:20608-20616
- LARAQUI A., ALLAMI A. Relation between plasma homocysteine, gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes, and angiographically proven coronary artery disease. *Eur. J. Intern. Med.* 2007;18: 474-483
- LEAL N.A., OLTEANU H., BANERJEE R., BOBIK T.A. Human ATP:Cob(I)alamin adenosyltransferase and its interaction with methionine synthase reductase. *J. Biol. Chem.* 2004;279:47536-42
- LEE G., PIQUETTE-MILLER M. Influence of IL-6 on MDR and MRP-mediated multidrug resistance in human hepatoma cells. *Can. J. Physiol.Pharmacol.* 2001; 79 : 876-884
- LEE S.C., HAN J.S., SEO J.K., CHA Y.N. Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide, *Mol. Cells.* 2003;15:320-6
- LEE Y., SONG S.M., PARK H.S., KIM S., KOH E.H., CHOI M.S., CHOI M.U. Elevation of oleate-activated phospholipase D activity during thymic atrophy. *Immunology*, 2002, 107(4):435-43
- LEE J.T. JR., STEELMAN L.S., MCCUBREY J.A. Phosphatidylinositol 3'-kinase activation leads to multidrug resistance protein-1 expression and subsequent chemoresistance in advanced prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004;64:8397-404
- LEE Y.H., SUZUKI Y.J., GRIFFIN A.J., DAY R.M. Hepatocyte growth factor regulates cyclooxygenase-2 expression via beta-catenin, Akt, and p42/p44 MAPK in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2008;294:L778-86
- LEVINE J. S., NAKANE P. K. Immunocytochemical localization of human intrinsic factor: the nonstimulated stomach. *Gastroenterology* 1980;79: 493-502
- LEVINE J. S., NAKANE P. K. Human intrinsic factor secretion: immunocytochemical demonstration of membrane-associated vesicular transport in parietal cells. *J. Cell. Biol.* 1981;90: 644-55
- LI G., CHEN X., WANG Q., XU Z., ZHANG W., YE L. The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 2007;27:173-5
- LI M.Y., DENG H., ZHAO J.M., DAI D., TAN X.Y. PPARgamma pathway activation results in apoptosis and COX-2 inhibition in HepG2 cells. *World. J. Gastroenterol.* 2003;9:1220-6
- LI Y.N., GULATI S., BAKER P.J., BRODY L.C., BANERJEE R., KRUGER W.D. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5: 185 1-8
- LI L., WEI X.H., PAN Y.P., LI H.C., YANG H., HE Q.H., PANG Y., SHAN Y., XIONG F.X., SHAO G.Z., ZHOU R.L. LAPTM4B: a novel cancer-associated gene motivates multidrug resistance through efflux and activating PI3K/AKT signaling. *Oncogene.* 2010;29: 5785-95
- LIN S.S., BASSIK M.C., SUH H., NISHINO M., ARROYO J.D., HAHN W.C., KORSMEYER S.J., ROBERTS T.M. PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 2006;281:23003-12
- LIN X.H., WALTER J., SCHEIDTMANN K., OHST K., NEWPORT J., WALTER G. Protein phosphatase 2A is required for the initiation of chromosomal DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998;95:14693-14698
- LINARDI R.L., NATALINI C.C. Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Ciência Rural* 2006;36: 336-341
- LINN S.C., PINEDO H.M., VAN ARK-OTTE J., VAN DER VALK P., HOEKMAN K., HONKOOP A.H., VERMORKEN J.B., GIACCONE G. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy. *Int. J. Cancer:* 1997;71:787-795

- LIU S.F., YE X., MALIK A.B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of pro-inflammatory genes. *Circulation*. 1999;100: 1330-1337
- LIU W., AKHAND A.A., TAKEDA K., KAWAMOTO Y., ITOIGAWA M., KATO M., SUZUKI H., ISHIKAWA N., NAKASHIMA I. Protein phosphatase 2A-linked and -unlinked caspase-dependent pathways for downregulation of Akt kinase triggered by 4-hydroxynonenal. *Cell Differ. Dev.* 2003;10: 772–781
- LODISH H., BERK A., ZIPURSKY L.S., MATSUDAIRA P., BALTIMORE D., DARNELL J. BAD interaction with Bcl-2. *Mol. cell biol.*1999;figure 23-50
- LOENEN W.A. S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem.Soc.Trans.*2006;34:330-3
- LOO T.W., BARTLETT M.C., CLARKE D.M. Substrate-induced Conformational Changes in the Transmembrane Segments of Human P-glycoprotein. *J. Biol.Chem.* 2003;278: 13603–13606
- LOO T.W., BARTLETT M.C., CLARKE D.M. Thapsigargin or curcumin does not promote maturation of processing mutants of the ABC transporters, CFTR, and P-glycoprotein. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 2004; 325: 580–585
- LOO T.W., BARTLETT M.C., CLARKE D.M. ATP hydrolysis promotes interactions between the extracellular ends of transmembrane segments 1 and 11 of human multidrug resistance P-glycoprotein. *Biochemistry*. 2005;44:10250-8
- LU S.C., ALVAREZ L., HUANG Z.Z., CHEN L., AN W., CORRALES F.J., AVILA M.A, KANEL G., MATO J.M. Methionine adenosyltransferase IA knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2001;98: 5560-5
- MARGUERITE V., BERI-DEXHEIMER M., ORTIOU S., GUEANT J.L., MERTEN M. Cobalamin potentializes vinblastin cytotoxicity through downregulation of *MDR-1* gene expression in HepG2 cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2007, 20:967-976
- MARGUERITE V., GIKOPOULOU E., ALBERTO J.M., GUEANT J.L., MERTEN M. Phospholipase D activation mediates cobalamin-induced downregulation of Multidrug Resistance-1 gene and increase in sensitivity to vinblastine in HepG2 cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012 Sep 29. pii: S1357-2725(12)00329-9. doi: 10.1016/j.biocel.2012.09.018. [Epub ahead of print]
- MARIE J.P. P-glycoprotein in adult hematologic malignancies. *Hematol.Oncol.Clin.North.Am.* 1995;9:239-249
- MARTHINET E., DIVITA G., BERNAUD J., RIGAL D., BAGGETTO L.G. Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. *Gene Ther.* 2000;7:1224-33
- MARTIN Y. N., SALAVAGGIONE O. E. Human methylenetetrahydrofolate reductase pharmacogenomics: gene resequencing and functional genomics. *Pharmacogenet. Genomics* 2006;16: 265-77
- MARZOLINI C., PAUS E., BUCLIN T., KIM R.B. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004;75:13-33
- MATO J.M., ALVAREZ L., ORTIZ P., PAJARES M.A. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications. *Pharmacol Ther*, 1997;73: 265-280
- MATO J.M., CORRALES F.J., LU S.C., AVILA M.A. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *FASEB J.* 2002;16:15-26. Review.
- MATO J. M. AND LU S. C. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* 2007;45: 1306-12
- MATO J.M., MARTINEZ-CHANTAR M.L., LU S.C. Methionine Metabolism and Liver Disease. *Annu. Rev. Nutr.* 2008;28:273-293
- MAHON F.X., BELLOC F., LAGARDE V., CHOLLETC., MOREAU-GAUDRY F., REIFFERS J., GOLDMAN J.M., MELO J.V. *MDR1* gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *BLOOD*, 2003;101: 2368-2373
- MAZOKOPAKIS E.E., STARAKIS I.K. Recommendations for diagnosis and management of metformin-induced vitamin B12 (Cbl) deficiency. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2012;97:359-67
- McCULLY K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am. J. Pathol.* 1969;56:111-28

Références Bibliographiques

- McDERMOTT M., WAKELAM M.J., MORRIS A.J. Phospholipase D. *Biochem Cell Biol.*, 2004;82: 225-53
- McGINTY A., CHANG Y.W., SOROKIN A., BOKEMEYER D., DUNN M.J. Cyclooxygenase-2 expression inhibits trophic withdrawal apoptosis in nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275:12095-101
- McLEAN G.R., QUADROS E.V., ROTHENBERG S.P., MORGAN A.C., SCHRADER J.W., ZILTENER H.J. Antibodies to transcobalamin II block in vitro proliferation of leukemic cells. *Blood.* 1997; 89:235–242
- MECHETNER E.B., RONINSON I.B. Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1992;89:5824-8
- MEGOSH L., GILMOUR S.K., ROSSON D., SOLER A.P., BLESSING M., SAWICKI J.A., O'BRIEN T.G. Increased frequency of spontaneous skin tumors in transgenic mice which overexpress ornithine decarboxylase. *Cancer Res.* 1995;55:4205-9
- MEYER K., FREDRIKSEN A. High-level multiplex genotyping of polymorphisms involved in folate or homocysteine metabolism by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin. Chem.* 2004;50: 391-402
- MILLER B., PATEL V.A., SOROKIN A. Cyclooxygenase-2 Rescues Rat Mesangial Cells from Apoptosis Induced by Adriamycin via Upregulation of Multidrug Resistance Protein 1 (P-Glycoprotein). *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006;17: 977–985
- MILTENBERGER R.J., FARNHAM P.J., SMITH D.E., STOMMEL J.M., CORNWELL M.M. v-Raf activates transcription of growth-responsive promoters via GC-rich sequences that bind the transcription factor Sp1. *Cell Growth Differ.* 1995;6 :549-556
- MIN D. S., KWON T. K., PARK W. S., CHANG J. S., PARK S. K., AHN B. H., RYOO Z. Y., LEE Y. H., LEE, Y. S., RHIE D. J., YOON S. H., HAHN S. J., KIM M. S., AND JO Y. H. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with overexpression of phospholipase D isozymes in cultured murine fibroblasts. *Carcinogenesis* 2001;22: 1641 – 1647
- MISRA S., GHATAK S., TOOLE B.P. Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2. *J. Biol. Chem.* 2005;280:20310-5
- MITSUHASHI S., SHIMA H., TANUMA N., SASA S., ONOE K., UBUKATA M., KIKUCHI K. Protein phosphatase type 2A, PP2A, is involved in degradation of gp130. *Mol. Cell Biochem.* 2005;269:183-7
- MOESTRUP S. K., BIRN H. Megalin-mediated endocytosis of transcobalamin- B12 complexes suggests a role of the receptor in vitamin-B12 homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1996;93: 8612-7
- MOOLENAAR W.H. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.* 1995 ;270 :12949-52
- MUDD S.H., FINKELSTEIN I.D., REFSUM H., UELAND P.M., MALINOW M.R., LENTZ S.R., JACOBSEN D.W., BRATTSTROM L., WILCKEN B., WILCKEN D.E., BLOM H.J., STABLER S.P., ALLEN R.H., SELHUB J., ROSENBERG I.H. Homocysteine and its disulfide derivatives: a suggested consensus terminology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20: 1704-6. Review.
- MULLER C., GOUBIN F., FERRANDIS E., CORNIL-SCHARWITZ I., BAILLY J.D., BORDIER C., BÉNARD J., SIKIC B.I., LAURENT G. Evidence for transcriptional control of human mdr1 gene expression by verapamil in multidrug-resistant leukemic cells. *Mol Pharmacol.* 1995;47:51-6
- NAMOUR F., GUY M., AIMONE-GASTIN I., DE NONANCOURT M., MRABET N., GUÉANT J.L. Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoproteins related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998;251:769-74
- NAMOUR F., HELFER A.C., QUADROS E.V., ALBERTO J.M., BIBI H.M., ORNING L., ROSENBLATT D.S., GUÉANT J.L. Transcobalamin deficiency due to activation of an intra exonic cryptic splice site. *Br. J. Haematol.* 2003;123:915-20
- NAMOUR F., OLIVIER J., ABDELMOUTTALEB I., ADJALLA C., DEBARD R., SALVAT C., GUÉANT J.L. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood.* 2001;97:1092-8
- NAUMANN M., CRABTREE J.E. Helicobacter pylori-induced epithelial cell signalling in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol.* 2004;12:29-36

- NISHIMAKI-MOGAMI T, SUZUKI K, OKOCHI E, TAKAHASHI A. Bezafibrate and clofibrac acid are novel inhibitors of phosphatidylcholine synthesis via the methylation of phosphatidylethanolamine. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996;1304:11-20
- NOZAWA Y. Roles of phospholipase D in apoptosis and pro-survival. *Biochim. Biophys. Acta* 2002 ;1585: 77 – 86
- NYGARD O., VOLLSET S.E., REFSUM H., BRATTSTROM L., UELAND P.M. Total homocysteine and cardiovascular disease. *J.Intern.Med.* 1999;246 : 425-54
- OH R., BROWN D.L. Vitamin B12 deficiency. *Am. Fam. Physician.* 2003;67:979-86
- OKAMURA S., YAMASHITA S. Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J. Biol. Chem.* 1994;269:31207-13
- OLTEAN S., BANERJEE R. Nutritional modulation of gene expression and homocysteine utilization by vitamin B12. *J. Biol. Chem.* 2003;278:20778-84
- OTTO J.C., DEWITT D.L., SMITH W.L. N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.*1993;268:18234-18242
- OZAWA S., SOYAMA A., SAWADA J. Ethnic differences in genetic polymorphisms of CYP2D6, CYP2C19, CYP3As and MDR1/ABCB1. *Drug Metab. Pharmacokin.* 2004; 19: 83-95
- PAJEVA I., TODOROV DK., SEYDEL J. Membrane effects of the antitumor drugs doxorubicin and thaliblastine: comparison to multidrug resistance modulators verapamil and trans-flupentixol. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004;21: 243-50
- PARK D.W., BAE Y.S., NAM J.O., KIM J.H., LEE Y.G., PARK Y.K., RYU S.H., BAEK S.H. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by phospholipase D in human in amnion-derived WISH cells. *Mol. Pharmacol.* 2002;61: 614-619
- PASTAN I., GOTTESMAN M. Multiple-Drug Resistance in Human Cancer. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316:1388-1393
- PATEL V.A., DUNN M.J., SOROKIN A. Regulation of *MDR-1* (P-glycoprotein) by Cyclooxygenase-2. *J. Biol.Chem.* 2002; 277: 38915-38920
- PECKER F., AMADOU A., MAGNE S., PAVOINE C. Le rôle messager de l'acide arachidonique dans le cardiomyocyte. *Méd./Sci.* 1998;14: 1009-16
- PELLANDA H., NAMOUR F., FOFOU-CAILLIEREZ M., BRESSENOT A., ALBERTO J.M., CHÉRY C., AYAV A., BRONOWICKI J.P., GUÉANT J.L., FORGES T. A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012;44: 385-92
- PETERS N.T., LOGAN K.O., MILLER A.C., KROPF D.L. Phospholipase D Signaling Regulates Microtubule Organization in the Fucoid Alga *Silvetia compressa*. *Plant Cell Physiol.* 2007;48: 1764-1774
- PLO I., LAUTIER D., LEVADE T., SEKOURI H., JAFFREZOU J.P., LAURENT G., BETTAIEB A. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and phospholipase D are respectively implicated in mitogen-activated protein kinase and nuclear factor κ B activation in tumour-necrosis-factor- α -treated immature acute-myeloid-leukaemia cells. *Biochem. J.* 2000 ;351 :459-467
- PUHLMANN U., ZIEMANN C., RUEDELL G., VORWERK H., SCHAEFER D., LANGEBRAKE C., SCHUERMANN P., CREUTZIG U., REINHARDT D. Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;312:346-54
- QIN S., LIU T., KAMANNA V.S., KASHYAP M.L. Pioglitazone stimulates apolipoprotein A-I production without affecting HDL removal in HepG2 cells: involvement of PPAR- α . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:2428-34
- QUADROS E.V., ROTHENBERG S.P., MCLOUGHLIN P. Characterization of monoclonal antibodies to epitopes of human transcobalamin II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 222:149–154
- QUADROS E.V., ROTHENBERG S.P. PAN Y.E. STEIN S. Purification and Molecular Characterization of Human Transcobalamin II. *J.Biol.Chem.*1986; 261: 15455-15460
- QUADROS E.V., SAI P., ROTHENBERG S.P. Characterization of the Human Placental Membrane Receptor for Transcobalamin II-Cobalamin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994 ; 308: 192-199

Références Bibliographiques

- RAGGERS R.J., POMORSKI T., HOLTHUIS J.C., KALIN N., VAN MEER G. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* 2000;1: 226-34
- RAMASWAMY S., NAKAMURA N., VAZQUEZ F., BATT D.B., PERERA S., ROBERTS T.M., SELLERS W.R. Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1999;96:2110-5
- RAUGHT B., GINGRAS A.C. eIF4E activity is regulated at multiple levels. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1999;31:43-57
- REO N.V., ADINEHZADEH M., FOY B.D. Kinetic analyses of liver phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine biosynthesis using (13)C NMR spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta* 2002;1580:171-88
- RIORDAN J.R., LING V. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. *Pharmacol.Therapeut.* 1985;28: 51-75
- RIZZO M. A., SHOME K., VASUDEVAN C., STOLZ D. B., SUNG T. C., FROHMAN M. A., WATKINS S. C., AND ROMERO G. Phospholipase D and its product, phosphatidic acid, mediate agonist-dependent raf-1 translocation to the plasma membrane and the activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*1999;274: 1131 – 1139
- ROBERT J., MORVAN V.L., SMITH D., POURQUIER P., BONNET J. Predicting drug response and toxicity based on gene polymorphisms. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2005;54:171-96
- ROBINSON J.P., VANBROCKLIN M.W., GUILBEAULT A.R., SIGNORELLI D.L., BRANDNER S., HOLMEN S.L. Activated BRAF induces gliomas in mice when combined with Ink4a/Arf loss or Akt activation. *Oncogene*. 2010;29: 335-44
- ROBLIN X., POFELSKI J. Steatosis, chronic hepatitis virus C infection and homocysteine. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 2007;31: 415-20
- ROUSER G., FKEISCHER S., YAMAMOTO A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970;5: 494-96
- ROY K.R., REDDY G.V., MAITREYI L., AGARWAL S., ACHARI C., VALI S., REDDANNA P. Celecoxib inhibits MDR1 expression through COX-2-dependent mechanism in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 2010;65:903-11
- SACHS K., PEREZ O., PE'ER D., LAUFFENBURGER D.A., NOLAN G.P. Causal protein-signaling networks derived from multiparameter single-cell data. *Science*. 2005;308:523-9
- SAUNA Z., AMBUDKAR S. Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein.
- SCHINKEL A.H., SMIT J.J., VAN TELLINGEN O., BEIJNEN J.H., WAGENAAR E., VAN DEEMTER L. Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell*. 1994;77: 491-502
- SCHMELZLE T., HALL M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000;103:253-262
- SCHMIDT C.M., WANG Y., WIESENAUER C. Novel combination of cyclooxygenase-2 and MEK inhibitors in human hepatocellular carcinoma provides a synergistic increase in apoptosis. *J. Gastrointest. Surg.* 2003;7:1024-33
- SCOTTO K.W., JOHNSON R.A. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. *Mol. Interv.* 2001;1: 117-25
- SEETHARAM B., ALPERS D.H. Absorption and transport of cobalamin (vitamin B12). *Annu. Rev. Nutr.* 1982;2:343-69
- SELHUB J. Homocysteine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 1999;19: 217-46
- SERRAJ K, VOGEL T, FEDERICI L, CIOBANU E, MECILI M, KALTENBACH G, ANDRÈS E. Food-cobalamin syndrome. *Presse Med.* 2009;38:55-62
- SHAROM J.F., YU X., CHU J.W.K., DOIGE C.A. Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* 1995;308: 381-390
- SHAROM F.J., YU X., DIDIODATO G., CHU J.W. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem. J.* 1996;320:421-8

- SHEU M.L., CHAO K.F., SUNG Y.J., LIN W.W., LIN-SHIAU S.Y., LIU S.H. Activation of phosphoinositide 3-kinase in response to inflammation and nitric oxide leads to the up-regulation of cyclooxygenase-2 expression and subsequent cell proliferation in mesangial cells. *Cell. Signal.* 2005;17:975-84
- SHI C.J., WANG F., REN M.F., MI Y.J., YAN Y.Y., TO K.K., DAI C.L., WANG Y.S., CHEN L.M., TONG X.Z., LIANG Y.J., FU L.W. Up-regulation of ABCB1/P-glycoprotein by escaping promoter hypermethylation indicates poor prognosis in hematologic malignancy patients with and without bone marrow transplantation. *Leuk. Res.* 2011;35:73-9
- SHIEH S.Y., IKEDA M., TAYA Y., PRIVES C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997;91:325-334
- SHIRAKI N., HAMADA A., OHMURA T., TOKUNAGA J., OYAMA N., NAKANO M. Increase in Doxorubicin Cytotoxicity by Inhibition of P-glycoprotein Activity with Lomerizine *Biol. Pharm. Bull.* 2001;24: 555-557
- SILVERMAN J.A., SCHRENK D. Hepatic canalicular membrane 4: expression of the multidrug resistance genes in the liver. *FASEB J.* 1997;11: 308-13
- SINHA P., CLEMENTS V.K., FULTON A.M., OSTRAND-ROSENBERG S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67:4507-13
- SONG J.G., PFEFFER L.M., FOSTER D.A. v-Src increases diacylglycerol levels via a type D phospholipase-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Mol. Cell. Biol.* 1991;11 :4903-8
- SOSLOW R.A., DANNENBERG A.J., RUSH D., WOERNER B.M., KHAN K.N., MASFERRER J., KOKI A.T. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer.* 2000;89:2637-45
- STAAL S.P., HARTLEY J.W., ROWE W.P. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1977;74(7):3065-7
- STEEGERS-THEUNISSEN R.P., BOERS G.H., TRIJBELS F.J., ESKES T.K. Neural-tube defects and derangement of homocysteine metabolism. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:199-200
- ST-GERMAIN M.E., GAGNON V., MATHIEU I., PARENT S., ASSELIN E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2004;24:1311-24
- SUBHI A.L., DIEGELMAN P., PORTER C.W., TANG B., LU Z.J., MARKHAM G.D., KRUGER W.D. Methylthioadenosine phosphorylase regulates ornithine decarboxylase by production of downstream metabolites. *J. Biol. Chem.* 2003;278:49868-73
- SUN M., PACIGA J.E., FELDMAN R.I., YUAN Z., COPPOLA D., LU Y.Y., SHELLEY S.A., NICOSIA S.V., CHENG J.Q. Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res.* 2001;61:5985-5991
- SUNDEN, S. L., RENDUCHINTALA M. S. Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 345: 171-4
- SUROWIAK P., MATERNA V., MATKOWSKI R., SZCZURASZEK K., KORNAFEL J., WOJNAR A., PUDELKO M., DIETEL M., DENKERT C., ZABEL M., LAGE H. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast. Cancer. Res.* 2005;7:R862-70
- SZAKÁCS G., PATERSON J.K., LUDWIG J.A., BOOTH-GENTHE C., GOTTESMAN M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006;5:219-34
- TADA Y., WADA M., KUROIWA K., KINUGAWA N., HARADA T., NAGAYAMA J., NAKAGAWA M., NAITO S., KUWANO M. MDR1 Gene Overexpression and Altered Degree of Methylation at the Promoter Region in Bladder Cancer During Chemotherapeutic Treatment. *Clinical Cancer Research*, 2000;6: 4618-4627
- TANG D., WU D., HIRAO A., LAHTI J.M., LIU L., MAZZA B., KIDD V.J., MAK T.W., INGRAM A.J. ERK activation mediates cell cycle arrest and apoptosis after DNA damage independently of p53. *J. Biol. Chem.* 2002;277:12710-12717
- TANNER S. M., LI Z. Genetically heterogeneous selective intestinal malabsorption of vitamin B12: founder effects, consanguinity, and high clinical awareness explain aggregations in Scandinavia and the Middle East. *Hum. Mutat.* 2004;23: 327-33
- TARASOVA N.I., SETH R., TARASOV S.G., KOSAKOWSKA-CHOLODY T., HRYCYNIA C.A., GOTTESMAN M.M., MICHEJDA C.J. Transmembrane inhibitors of P-glycoprotein, an ABC transporter. *J. Med. Chem.* 2005;48:3768-75

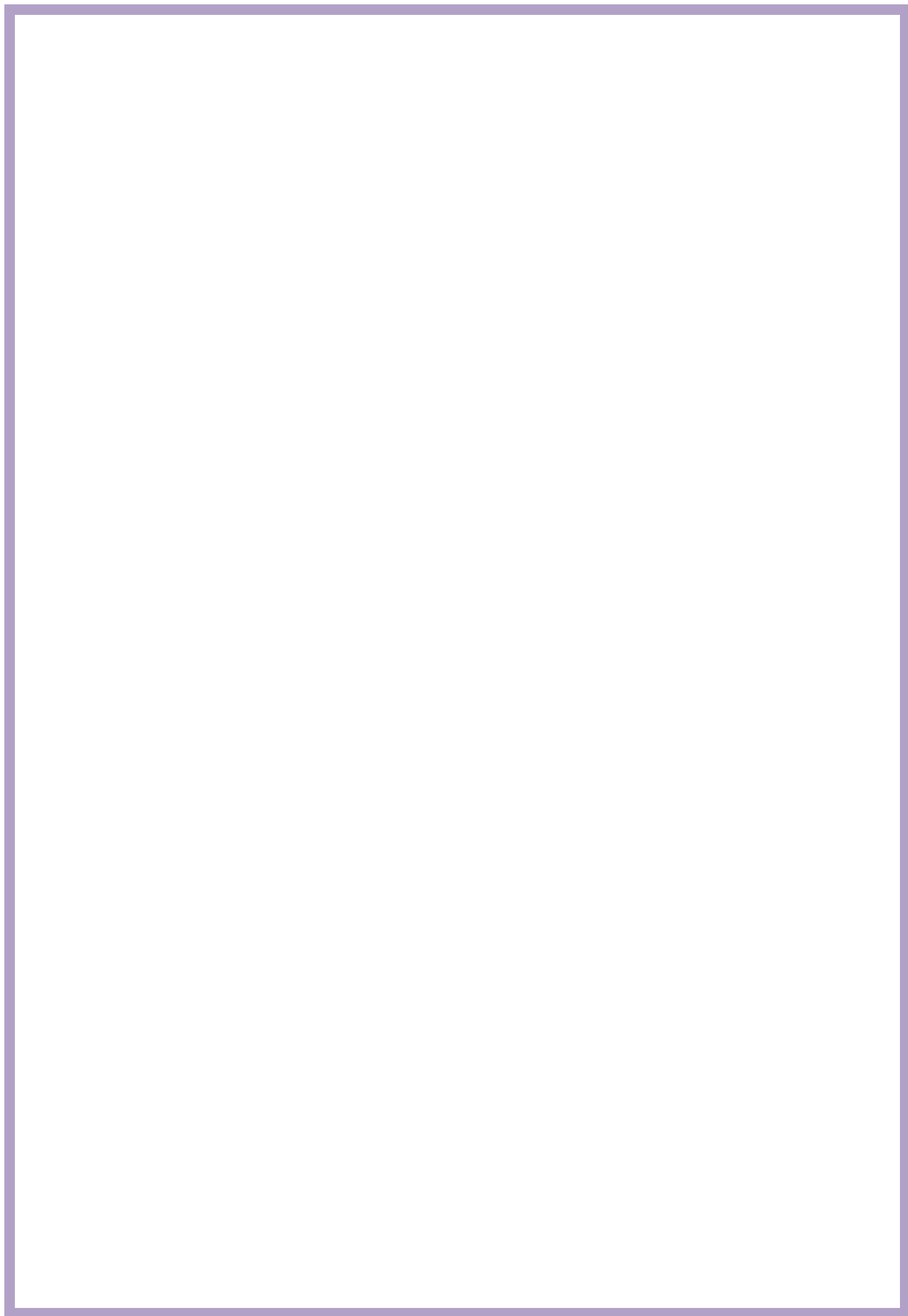
Références Bibliographiques

- TAUTT J., MAJ S., CHŁOPKIEWICZ B., KOZIOROWSKA J. Effect of lack of exogenous methionine on protein synthesis in normal and leukemic leukocytes cultured in vitro. *Acta Haematol. Pol.* 1981;12:69-75
- TAY A., SQUIRE J.A., GOLDBERG H., SKORECKI K. Assignment of the human prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to 1q25 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1994;23:718-9
- THIEBAUT F., TSURUO T., HAMADA H., GOTTESMAN M.M., PASTAN I., WILLINGHAM M.C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987;84: 7735-7738
- THOMAS T., THOMAS T.J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life. Sci.* 2001;58:244-58
- THORNBERRY N.A. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chem. Biol.* 1998;5:R97-103
- THUN M.J., HENLEY S.J., PATRONO C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002;94:252-266
- TISMAN G., GARCIA A. Control of prostate cancer associated with withdrawal of a supplement containing folic acid, L-methyltetrahydrofolate and vitamin B12: a case Report. *JMCR* 2011;5:413-19
- TSUJII M., KAWANO S., TSUJI S., SAWAOKA H., HORI M., DUBOIS R.N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93:705-16
- UCHIDA, N., OKAMURA, S., AND KUWANO, H. Phospholipase D activity in human gastric carcinoma. *Anticancer Res.* 1999;19: 671 – 675
- UMBENHAUER D.R., LANKAS G.R., PIPPERT T.R., WISE L.D., CARTWRIGHT M.E., HALL S.J., BEARE C.M. Identification of a P-glycoprotein-deficient subpopulation in the CF-1 mouse strain using a restriction fragment length polymorphism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 146:88–94
- VAN DIJK M.C., MURIANA F.J., DE WIDT J., HILKMANN H., VAN BLITTERSWIJK W.J. Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 1997;272:11011-11016
- VANCE D. E., LI Z., JACOBS R. L. Hepatic phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, unexpected roles in animal biochemistry and physiology. *J. Biol. Chem.* 2007;282: 33237–33241
- VANCE D. E., VANCE J. E. Physiological consequences of disruption of mammalian phospholipid biosynthetic genes. *J. Lipid Res.* 2009;50: S132–S137
- VANE J.R., BAKHLE Y.S., BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998;38:97-120
- VAN HELVOORT A., SMITH A.J., SPRONG H., FRITZSCHE I., SCHINKEL A.H., BORST P., VAN MEER G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 1996;87: 507-17
- VIVANCO I. AND SAWYERS C. L. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2002;2: 489 – 501
- VLAHOS C. J., MATTER W. F., HUI K. Y., BROWN R. F. A specific inhibitor of PI-3K, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1 benzopyran-4-one (LY 294002). *J. Biol. Chem.* 1994;269: 5241–5248
- VOORHOEVE P.M., HIJMANS E.M., BERNARDS R. Functional interaction between a novel protein phosphatase 2A regulatory subunit, PR59, and the retinoblastoma-related p107 protein. *Oncogene* 1999;18:515-524
- WAGNER C., BRIGGS W. T. Inhibition of glycine N-methyltransferase activity by folate derivatives: implications for regulation of methyl group metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985;127: 746-52
- WAGNER C., DECHA-UMPHAI W., CORBIN J. Phosphorylation modulates the activity of glycine N-methyltransferase, a folate binding protein. In vitro phosphorylation is inhibited by the natural folate ligand. *J. Biol. Chem.* 1989;264:9638-42
- WANG X., DEVAIAH S.P., ZHANG W., WELTI R. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog. Lipid. Res.* 2006;45: 250-78

- WEI H., ASHBY D.G., MORENO C.S., OGRIS E., YEONG F.M., CORBETT A.H., PALLAS D.C. Carboxymethylation of the PP2A catalytic subunit in *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient interaction with the Btype subunits Cdc55p and Rts1p. *J. Biol. Chem.* 2001;276:1570-1577
- WELSH C.J., YE H. G.C., PHANG J.M. Increased phospholipase D activity in multidrug resistant breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994;202: 211-17
- WENDELL L.K., WILSON L., JORDAN M.A. Mitotic block in HeLa cells by vinblastine:ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J.Cell Sci.* 1993;104: 261-274
- WIEN T.N., PIKE E., WISLØFF T., STAFF A., SMELAND S., KLEMP M. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2012;2:e000653
- WONG S.C., FUKUCHI M., MELNYK P., RODGER I., GIAID A. Induction of cyclooxygenase-2 and activation of nuclear factor-kappaB in myocardium of patients with congestive heart failure. *Circulation.* 1998; 98:100-3
- WORM J., GULDBERG P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral. Pathol. Med.* 2002;31:443-9
- WU W., SILBAJORIS R.A., WHANG Y.E., GRAVES L.M., BROMBERG P.A., SAMET J.M. p38 and EGF receptor kinase-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway is required for Zn²⁺-induced cyclooxygenase-2 expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2005;289:L883-9
- WU Y., SONG P., XU J., ZHANG M., ZOU M.H. Activation of protein phosphatase 2A by palmitate inhibits AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 2007;282:9777-88
- WYMAN M.P., PIROLA L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1998;1436:127-150
- XU D., KANG H., FISHER M., JULIANO R.L. Strategies for Inhibition of MDR1 Gene Expression. *Mol.Pharmacol.* 2004;66:268–275
- XU Z., WILLIAMS B.R. The B56alpha regulatory subunit of protein phosphatase 2A is a target for regulation by double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR. *Mol. Cell. Biol.* 2000;20:5285-5299
- YAMADA Y., HAMAJIMA N., KATO T., IWATA H., YAMAMURA Y., SHINODA M., SUYAMA M., MITSUDOMI T., TAJIMA K., KUSAKABE S., YOSHIDA H., BANNO Y., AKAO Y., TANAKA M., AND NOZAWA Y. Association of a polymorphism of the phospholipase D2 gene with the prevalence of colorectal cancer. *J. Mol. Med.* 2003;81: 126 – 131
- YAMADA K., KAWATA T., WADA M., ISSHIKI T., ONODA J., KAWANISHI T., KUNOU A., TADOKORO T., TOBIMATSU T., MAEKAWA A., TORAYA T. Extremely low activity of methionine synthase in vitamin B-12-deficient rats may be related to effects on coenzyme stabilization rather than to changes in coenzyme induction. *J. Nutr.* 2000;130:1894-900
- YANG S.F., FREER S., BENSON A.A. Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 1967;242: 477-84
- YANG Z.Z., TSCHOPP O., BAUDRY A., DUMMLER B., HYNX D., HEMMINGS B.A. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem.Soc.Trans.*2004;32(2):350-4
- YANO H., NAKANISHI S., KIMURA K. Inhibition of histamine secretion by wortmannin through the blockade of PI-3K in RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* 1993;268: 25846–25856
- YEH P.Y., CHUANG S.E., YEH K.H., SONG Y.C., CHANG L.L., CHENG A.L. Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. *Oncogene* 2004;23:3580-3588
- YEH J.H., HSU S.C., HAN S.H., LAI M.Z. Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized fas-associated deathdomain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 1998;188:1795-1802
- YOUNGDAHL-TURNER P., ROSENBERG L. E. Binding and uptake of transcobalamin II by human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 1978;61: 133-41
- YU C., KRYSTAL G., VARTICOVKSI L., MCKINSTRY R., RAHMANI M., DENT P., GRANT S. Pharmacologic mitogenactivated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer. Res.* 2002;62:188-199

Références Bibliographiques

- YU D.S., SUN G.H., MA C.P., CHANG S.Y. Verapamil modulation of multidrug resistance in renal cell carcinoma. *J. Formos. Med. Assoc.* 2000;99:311-6
- YUAN J., YANKNER B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000;407:802-809
- ZALCBERG J., HU X.F., SLATER A., PARISOT J., EL-OSTA S., KANTHARIDIS P., CHOU S.T., PARKIN J.D. MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000;3: 66-75
- ZAPPIA V., ZYDEK-CWICK R., SCHLENK F. The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 1969;244:4499-509
- ZETTERBERG H. Methylenetetrahydrofolate reductase and transcobalamin genetic polymorphisms in human spontaneous abortion: biological and clinical implications. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2004;17:3-7. Review.
- ZHANG J., CHEN S., ZHANG S., LU Z., YANG H., WANG H. Over-expression of phospholipase D3 inhibits Akt phosphorylation in C2C12 myoblasts. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2009;25:1524-31
- ZHANG X.D., BORROW J.M., ZHANG X.Y., NGUYEN T., HERSEY P. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene* 2003;22:2869-2881
- ZHAO Y., EHARA H., AKAO Y., SHAMOTO M., NAKAGAWA Y., BANNO Y., DEGUCHI T., OHISHI N., YAGI K., AND NOZAWA Y. Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;278: 140 – 143
- ZHONG M., SHEN Y., ZHENG Y., JOSEPH T., JACKSON D., FOSTER D.A. Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;302: 615-19
- ZHOU J., LIU M., ANEJA R., CHANDRA R., LAGE H., JOSHI H.C. Reversal of P-glycoprotein–Mediated Multidrug Resistance in Cancer Cells by the c-Jun NH2-Terminal Kinase. *Cancer Res.* 2006; 66: 445-452



Annexes

Annexes

Annexe I : Fiches techniques

Fiche Technique n° 1

Lignée cellulaire et conditions de culture

La lignée cellulaire HepG2 a été obtenue chez ATCC® (numéro HB-8065). Elle est issue d'un carcinome hépatique humain. Les cellules ont les caractéristiques des cellules épithéliales et elles se développent en adhérant sur leur support. Les cellules sont décongelées comme décrit plus loin (Fiche 5). Elles sont mises en culture dans des flacons de culture Falcon/ Dikintou. Le milieu utilisé dans notre travail est le DMEM 4,5 g/L de glucose (voir composition ci-dessous). Il est supplémenté avec 10% de SVF et 1% de mélange d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine). Les cellules sont incubées avec les différents agents testés quand elles atteignent 80% de confluence.

Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine. Quand elles arrivent à forte confluence elles peuvent former des multicouches. Elles ne peuvent pas survivre très longtemps dans cet état, même si le milieu est renouvelé, et elles se décollent. Il est donc nécessaire de les repiquer une fois par semaine (Fiche 3). Un test de mycoplasme est réalisé fréquemment (une fois par trimestre) afin de s'assurer de l'absence de contaminations.

-
- DMEM high glucose (12491-015), Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
 - Plastiques stériles à usage unique, Falcon, Dutscher, Brumath, France
 - Penicillin-Streptomycin, Liquid (15070-063), Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France
 - SVF, Sérum de veau foetal non décomplémenté, Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Composition du milieu DMEM

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	37.5	0.5
L-Alanine		8.9	∞
L-Arginine hydrochloride		84	∞
L-Asparagine		13.2	∞
L-Aspartic acid		13.3	∞
L-Cystine 2HCl		63	∞
L-Glutamic Acid		14.7	∞
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O		42	∞
L-Isoleucine		105	∞
L-Leucine		105	∞
L-Lysine hydrochloride		146	∞
L-Methionine		30	∞
L-Phenylalanine		66	∞
L-Proline		11.5	∞
L-Serine		52.5	∞
L-Threonine		95	∞
L-Tryptophan		16	∞
L-Tyrosine disodium salt dihydrate		104	∞
L-Valine		94	∞
Vitamins			
Ascorbic Acid phosphate		2.5	∞
Choline chloride		4	∞
D-Calcium pantothenate	477	4	0.00839
Folic Acid	441	4	0.00907
Niacinamide		4	∞
Pyridoxine hydrochloride		4	∞
Riboflavin		0.4	∞
Thiamine hydrochloride		4	∞
i-Inositol		7.2	∞
Inorganic Salts			
Calcium Chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	111	200	1.8
Ferric Nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)		0.1	∞
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)		97.67	∞
Potassium Chloride (KCl)		400	∞
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)		3700	∞
Sodium Chloride (NaCl)		6400	∞
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O)		125	∞
Proteins			

AlbuMAX® II		400	∞
Human Transferrin (Holo)		7.5	∞
Insulin Recombinant Full Chain		10	∞
Trace Elements			
Ammonium Metavanadate		0.0003	∞
Cupric Sulfate		0.00125	∞
Manganous Chloride		0.00005	∞
Sodium Selenite		0.005	∞
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)		4500	∞
Ethanolamine		1.9	∞
Glutathione (reduced)	307	1	0.00326
Phenol Red		15	∞
Sodium Pyruvate		110	∞

Fiche Technique n° 2

Décomplémentation du Sérum de Veau Fœtal (SVF)

Principe/Intérêt :

La décomplémentation du SVF permet d'inactiver le complément. Cette inactivation est nécessaire car le complément pourrait se lier à des anticorps du SVF pouvant reconnaître les cellules cultivées et finalement les détruire (activation de la voie biochimique classique du complément faisant partie du système immunitaire). La décomplémentation permet également d'inactiver, dans une certaine mesure, des contaminants, comme des mycoplasmes ou certains agents infectieux, comme des virus transmissibles à l'homme.

Protocole :

- Le SVF est fourni en flacon de 500 mL congelé à -20°C et conservé ainsi jusqu'à sa décomplémentation.
- Décongeler le flacon au réfrigérateur.
- Placer le flacon au bain Marie pendant 30 minutes à 56°C.
- Réaliser par la suite (facultatif) une centrifugation, à température ambiante, 5 minutes à 1100 rpm, afin d'éliminer les éventuelles protéines dénaturées qui ont précipité.
- Aliquoter en 50 mL de façon stérile.
- Les aliquots sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.
- Le flacon de SVF vide est éliminé dans la poubelle à incinérer.

- SVF, Sérum de veau foetal non décomplémenté, Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche Technique n° 3

Trypsination et Repiquage des cellules

Principe :

Décoller les cellules de leur support à l'aide d'un mélange trypsine/EDTA. Le succès de la technique repose sur l'élimination minutieuse du milieu de culture, donc de toute trace de sérum dans la boîte de culture qui inhiberaient l'enzyme. En effet, le serum contient de l'alpha-antitrypsine.

Protocole :

- Décongeler la trypsine. Aliquoter en tubes de 15 mL et recongeler (-20°C) jusqu'à utilisation.
- Éliminer le milieu de culture.
- Rincer deux fois le tapis cellulaire avec du PBS 1x stérile
- Incuber les cellules avec un fin film de trypsine à 37°C pendant 5 minutes. Environ 0,3 ml par boîte de 75 cm² et 1 ml / boîte de 75 cm².
- Vérifier au microscope que les cellules s'arrondissent et se décollent.
- Inhiber l'action de la trypsine par ajout de SVF (10 x le volume de trypsine).
- Agitation mécanique à la pipette afin de décoller toutes les cellules.
- Transfert de la suspension cellulaire dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger les cellules à 1000 *rpm* pendant 5 min.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 à 10 mL de milieu de culture correspondant au volume de milieu dans lequel les cellules serontensemencées.
- Compter les cellules sur 2 grilles d'une cellule de Thoma (3)
- Faire la moyenne des 2 grilles, le nombre trouvé correspond à N.10⁴ cellules/mL
- Pour l'entretien des cellules, ensemer à 1,5.10⁴ cellule par cm²

- 3 Cellule de Thoma : VWR international, Fontenay-sous-Bois, France

- PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

- Trypsine-EDTA trypsine 0.05% : Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France

Fiche Technique n° 4

Congélation des cellules

Protocole : toutes les opérations décrites ci-dessous doivent être réalisées dans de la glace pilée et avec des solutions refroidies.

Dans du DMSO (7% DMSO, 36%SVF, QSP avec du DMEM) :

- Les cellules adhérentes contenues dans une boîte de culture ou une boîte de Pétri sont trypsinées.
- Une centrifugation de 5 minutes à température ambiante à 1100 rpm permet d'éliminer toute trace de trypsine.
- Le culot cellulaire est ensuite repris dans 400 µL de milieu de culture utilisé pour ce type cellulaire.
- A cette suspension est ajouté goutte à goutte un mélange de 600 µL (530 µL de SVF et 70 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO)).
- Le mélange final est ensuite déposé dans un cryotube de 1 mL.
- Le cryotube est par la suite disposé dans une boîte de congélation permettant une diminution de la température de 1°C.min⁻¹ jusqu'à -80°C.
- Plus de 24 heures après le cryotube est placé dans l'azote liquide (-196°C) et répertorié dans le cahier correspondant.

Dans du glycérol (10% glycérol, 30% SVF, 60% DMEM) :

- Préparer une solution stérile de glycérol à l'autoclave
- Préparer le milieu de congélation : 1 mL de glycérol, 2 mL de SVF, 2 mL de milieu de culture
- Préparer une suspension cellulaire de densité 4.10⁶ cellules/mL dans le milieu de culture
- Déposer 0,5 mL de cette suspension dans des cryotubes¹. Soit 2.10⁶ cellules /tube
- Ajouter 0,5 mL de milieu de congélation en agitant un peu le tube
- Placer les tubes dans la boîte de congélation²
- Placer cette boîte 24h à -80°C. Puis transférer les tubes dans l'azote liquide

Référencer les tubes congelés dans les registres de cultures cellulaires !

-
- Boîte de congélation : Nalgène Cryo (VWR international, Fontenay-sous-Bois, France)
dans laquelle l'alcool isopropylique permet une congélation progressive
 - Cryotube : Nalgène ; VWR international, Fontenay-sous-Bois, France
 - DMSO (Diméthylsulfoxyde) : Gibco/ Invitrogen ; Cergy-Pontoise, France

Fiche Technique n° 5

Décongélation des cellules

Protocole :

- Un cryotube de 1 mL, contenant des cellules stockées dans l'azote liquide, est rapidement décongelé par friction entre les mains ou sous un robinet d'eau tiède.
- Après stérilisation externe du cryotube à l'éthanol 70% (v/v), la suspension cellulaire est diluée dans 12 mL de milieu de culture adapté à ce type cellulaire.
- L'ensemble est agité délicatement, puis centrifugé, à température ambiante, 5 min à 1100 *rpm*.
- Le surnageant est éliminé (élimination du DMSO cytotoxique).
- Les cellules seront mises en suspension dans du milieu de culture adapté, qui sera contenu dans une bête de culture ou une boîte de Pétri, placée dans l'incubateur.

Référencer les tubes décongelés dans les registres de cultures cellulaires !

Fiche Technique n° 6

Test de viabilité/toxicité cellulaire (Réduction mitochondriale du MTT)

D'après Denizot et Lang (1986)

Principe :

Le MTT est un sel de tétrazolium soluble dans l'eau formant une solution jaunâtre quand il est préparé dans du milieu de culture DMEM. Il est converti dans les cellules en formazan par clivage du cycle tétrazolium grâce à l'action des déshydrogénases mitochondriales. Le formazan présente une couleur pourpre. Il est insoluble dans l'eau, mais soluble dans le DMSO.

Protocole :

- Ensemencer les cellules sur des plaques de 96 puits à une densité de 3.10^5 cellules par puit.
- Quand les cellules atteignent environ 80 % de confluence, elles sont incubées, à concentration constante, avec les différents agents à tester, pendant 24 heures.
- Au bout de 24 heures, le milieu est renouvelé, comprenant l'agent d'intérêt, ainsi que, cette fois-ci des concentrations croissantes de vinblastine (le cytotoxique à tester), une concentration différente par colonne des puits (donc 8 puits/concentration testée). La colonne ne comprenant pas de vinblastine correspond à 100 % de viabilité. Dans une colonne, on ajoutera du milieu contenant 1 % d'azide de sodium et correspondra à 0 % de viabilité cellulaire.
- Les cellules sont incubées ainsi pendant 48 heures, afin de permettre l'action de la vinblastine.
- Au bout de 48 heures, le milieu est éliminé et les cellules sont incubées avec une solution contenant 5mg de MTT / mL de PBS dilués au 50^{ème} dans du DMEM, pendant 1 à 2 heures à 37°C.
- Le milieu est enlevé délicatement quand un tapis bleu/violet apparaît (qui apparaît généralement au bout de 30 min).
- Ajouter 150 µL de DMSO par puit, afin de dissoudre les cristaux de formazan.
- La lecture des densités optiques est réalisée avec un lecteur de microplaques à 570 nm.

- (Denizot et Lang ,1986) : J. Immunol. Methods

- MTT, 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide conservé à 4°C :

Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

- Lecteur de plaques Victor3 Wallac Multilabel, Perkin Elmer

Fiche Technique n° 7

Extraction des protéines cytosoliques

- Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri (100 mm) jusqu'à 80 % de confluence et ensuite en présence des agents d'intérêt pendant 24 heures.

Les manipulations suivantes seront réalisées exclusivement sur glace pilée.

- Le tapis cellulaire est lavé 3 fois avec du PBS 1x froid.
- Aspirer soigneusement le dernier rinçage pour bien assécher la surface cellulaire (il est possible alors de congeler les boîtes à -80°C jusqu'au jour de l'extraction).
- Mettre 150 à 200 µL de tampon RIPA froid et bien remuer la boîte pour l'étaler sur toute la surface.
- Incuber 10 minutes sur glace, puis secouer dans tous les sens pour bien décoller le tapis cellulaire.
- Homogénéiser par 10-20 inspirations-expirations avec une seringue de 1 mL.
- Récupérer le lysat dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL.
- Effectuer 2 cycles de congélation-décongélation (Azote liquide-bain marie à 37°C).
- Centrifuger 30 minutes à 12000 g à 4°C.
- Récupérer le surnageant, puis stocker à -80°C ou réaliser un dosage des protéines.

Tampon RIPA :

NaCl 8g/L, Na₂HPO₄ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, Nonidet P40 1 %, Deoxycholate de Na 0,5 %, SDS 0,1 %, pH 7,4.

À ce tampon sont rajoutés :

10 µL PMSF (10 mg/mL d'éthanol) / mL de RIPA

10 µL Na₃VO₄ (100 mM ou 18,39 mg/mL dH₂O) / mL de RIPA

14 µL de Cocktail antiprotéase (Sigma, ref P-8340) / 10 mL de RIPA

Fiche Technique n° 8

Extraction des protéines membranaires

- Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri (100 mm) jusqu'à 80 % de confluence et ensuite en présence des agents d'intérêt pendant 24 heures.

Les manipulations suivantes seront réalisées exclusivement sur glace pilée.

- Les tapis cellulaires sont lavés 2 fois au PBS 1x froid et les boîtes sont ensuite posées sur glace pilée.

- Récupérer les cellules, en grattant le tapis cellulaire, dans 1,5 mL de PBS 1x supplémenté avec 1,4 µL d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Sigma P-8340).

- Récupérer dans des tubes et centrifuger 5 minutes à 1000 g à 4°C.

- Résuspendre le culot dans du tampon de lyse (1 mL/ boîte).

- Incuber dans la glace pendant 10 minutes.

- Lyser les cellules en utilisant l'appareil d'homogénéisation cellulaire Dounce (8-10 fois). Ne pas insister plus car ceci résulte en la cassure des noyau. Contrôler la lyse en utilisant le bleu trypan au microscope. Un pourcentage de 80 % de lyse est idéal.

- Ajouter un volume équivalent de tampon de sucrose et répéter la lyse.

- Centrifuger à 6000 g pendant 10 minutes à 4°C, afin de mettre en culot les débris cellulaires et les organites.

- Récupérer le surnageant et le centrifuger à 100000 g pendant 30 minutes à 4°C pour récupérer les membranes.

- Résuspendre le culot membranaire dans le tampon RIPA décrit dans la Fiche 7.

- Afin d'obtenir des vésicules de taille uniforme une courte sonication peut être réalisée.

- Stocker à -80°C ou réaliser un dosage des protéines.

Tampon de lyse
10 mM HEPES pH 7,2
1 mM EDTA
1x solution d'inhibiteurs de protéases

Tampon de sucrose (filtrer de façon stérile, stocker à 4°C)
10 mM HEPES pH 7,2
500 mM Sucrose
1x solution d'inhibiteurs de protéases

1x solution d'inhibiteurs de protéases (stocker à -80°C)
1 µg/mL leupeptine
2 µg/mL aprotinine
50 µg/mL Pefabloc
121 µg/mL benzamidine
3,5 µg/mL E64

Fiche Technique n° 9

Dosage des protéines par la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA)

Principe :

Le principe de cette méthode repose sur la réaction de Biuret consistant en une réduction par les protéines des ions cuivriques (Cu^{2+}) en ions cuivreux (Cu^+) en milieu alcalin. Le complexe hydrosoluble formé par l'interaction de 2 molécules d'acide bicinchoninique avec un ion Cu^+ produit une coloration pourpre, absorbant fortement à 562 nm selon la loi Beer-Lambert. Ce dosage est réalisé à l'aide du kit Pierce BCA protein Reagent.

Protocole :

- Préparer une gamme étalon (0, 20, 100, 250, 500, 750, 1000 et 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en triple) à partir d'une solution stock de BSA, diluée dans le même tampon que les échantillons à doser.
- Préparer le réactif de travail en mélangeant 50 volumes de réactif A (BCA) à 1 volume de réactif B (CuSO_4).
- Distribuer 25 μL de dilution de BSA ou d'échantillon à doser sur une plaque de 96 puits, les échantillons à doser ainsi que les blancs (tampon de dilution) en duplicata.
- Ajouter 200 μL de réactif de travail par puit et agiter la plaque.
- Couvrir la plaque et la placer 30 minutes à 37°C.
- Laisser refroidir la plaque à température ambiante.
- Mesurer l'absorbance sur un lecteur de plaques à 570 nm.
- La droite de régression étalon est tracée et la concentration protéique des échantillons déduite.
- La concentration en protéines est déterminée à partir de la courbe étalon.

-
- Smith *et al.* (1985) *Anal. Biochem.*, 150 : 76-85
 - Ampoule contenant de la BSA à 2,0 mg/mL dans une solution de NaCl à 0,9% (p/v) et NaN_3 à 0,05% (p/v)
 - Réactif A : solution aqueuse contenant BCA- Na_2 1% (p/v), Na_2CO_3 2% (p/v), tartrate- Na_2 0,16%, NaOH 0,4% (p/v) et NaHCO_3 0,95% (p/v) (pH 11,25)
 - Réactif B : solution de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ à 4% (p/v) dans de l'eau déionisée
 - Pierce, Rockford, IL, USA kit BCA Protein Assay® Reagent (Pierce, Rockford, IL, USA)

Fiche Technique n° 10

Electrophorèse analytique des protéines sur gel dénaturant de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Cette opération est effectuée sur un appareillage Biorad

- Fixer les plaques de verre séparées par des espaceurs sur leur support et fixer l'ensemble sur le socle de coulage
- Couler le gel de séparation selon le entre les plaques de verre, recouvrir sa surface avec de l'isopropanol
- Laisser polymériser pendant 20 min à température ambiante
- Aspirer l'isopropanol et rincer abondamment la surface du gel avec de l'eau distillée
- Eliminer toutes traces d'eau et couler le gel de concentration
- Positionner le peigne en Téflon® en évitant de piéger des bulles au niveau des dents et laisser polymériser à nouveau 20 min. La hauteur du gel de concentration est de 1 cm à partir du bas des puits de dépôt
- Retirer le peigne et rincer soigneusement chaque puits avec une pissette d'eau distillée afin de supprimer l'acrylamide non polymérisé. Éliminer l'eau restant dans les puits.
- Former le réservoir de tampon cathodique en assemblant les 2 supports de gel sur le système central d'électrodes en forme de U.
- Remplir ce réservoir central avec du tampon de migration et contrôler l'étanchéité
- Aux échantillons (dans des tubes Eppendorf), ajouter 1 volume de tampon de dépôt pour 1 volume d'échantillon (20 µL final maximum)
- Chauffer les échantillons à 100°C pendant 5 min, dans un bloc chauffant
- Charger les puits du gel avec les échantillons et les standards dénaturés
- Brancher la cuve d'électrophorèse sur un générateur de courant continu. La migration débute à 50 V constant (~10 mA) le temps que les protéines pénètrent dans le gel de concentration puis 120 V (25mA) jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel

-
- Appareil d'électrophorèse Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Gel de séparation : 12% (p/v) acrylamide : bisacrylamide (29:1) (Bio-Rad Laboratories), tampon Tris-HCl 0,125M (pH 6,8) polymérisé avec persulfate d'ammonium 0,05% (p/v) et TEMED 0,05% (v/v) ; Euromedex (France) et SDS 0,1% (Bio-Rad Laboratories)
 - Tampon de migration : Tris 25 mM contenant glycine 192 mM et SDS 0,1% (p/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Tampon Laemmli X2 ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - Marqueurs de poids moléculaires : *Low Molecular Weight* ; LMW - Amersham Pharmacia, UK

Solution pour préparation des gels de concentration et de séparation
pour SDS-PAGE Tris/Glycine

<i>Gel de séparation</i>		5 ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
6%	H₂O MQ	2.7	5.3	8	10.6	13.3	15.9	21.1	26.5
	Acrylamide Mix 29:1	1	2	3	4	5	6	8	10
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8%	H₂O MQ	2.3	4.6	7	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	Acrylamide Mix 29:1	1.3	2.7	4	5.3	6.7	8	10.7	13.4
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10%	H₂O MQ	2	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.8	20
	Acrylamide Mix 29:1	1.7	3.3	5	6.7	8.3	10	13.3	16.6
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12%	H₂O MQ	1.7	3.3	5	6.6	8.3	9.9	13.2	16.4
	Acrylamide Mix 29:1	2	4	6	8	10	12	14	20
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15%	H₂O MQ	1.2	2.3	3.5	4.6	5.7	6.9	9.2	11.4
	Acrylamide Mix 29:1	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
	Tris 1.5M pH 8.8	1.3	2.5	3.8	5	6.3	7.5	10	12.5
	SDS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	APS 10%	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

<i>Gel de concentration</i>		1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Stacking	H ₂ O MQ	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
	Acrylamide	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	01/07/0
	Mix 29:1								9
	Tris 0.5M	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
	pH 6.8								
	SDS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	APS 10%	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
	TEMED	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

Fiche Technique n° 11

Coloration des protéines après électrophorèse sur gel de polyacrylamide

- **Coloration au bleu de Coomassie® R250**

- Dissoudre 2 g de bleu de Coomassie® R2501 dans 200 mL d'eau distillée et agiter pendant 5 à 10 min
- Filtrer la solution stock de colorant à 1% (p/v) sur filtre papier et ensuite sur filtre 0,45 µm et la stocker à température ambiante
- Pour la coloration d'un gel, préparer 50 mL une solution finale à 25% (p/v) en mélangeant 12,5 mL de solution stock à 5 mL d'acide acétique et à 25 mL de méthanol
- Incuber 15 à 20 min sous agitation légère et à température ambiante
- Enlever la solution de colorant et décolorer le gel avec un mélange méthanol / acide acétique / eau distillée (4:1:5, v/v/v) renouvelé régulièrement

- **Révélation au nitrate d'argent**

- Préparer toutes les solutions avec de l'eau ultra pure
- Agiter légèrement le gel au cours des différentes étapes de la coloration
- Fixer le gel dans un mélange méthanol/acide acétique/eau (4:1:5,v/v/v) pendant au moins 1 h
- Faire 3 lavages de 20 min chacun avec une solution d'éthanol à 30% (v/v)
- Incuber 1 min avec une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (p/v) (réduction)
- Laver 3 fois 20 sec le gel avec de l'eau ultra pure
- Incuber 20 min dans une solution de nitrate d'argent à 0,2% (p/v) et de formaldéhyde diluée extemporanément à 0,02% (v/v) à partir d'une solution stock à 37 %.
- Laver abondamment 3 fois 20 sec avec de l'eau ultra pure
- Développer le gel avec une solution de carbonate de sodium (Na₂CO₃) à 3% (p/v), formaldéhyde à 0,05% (v/v) et thiosulfate de sodium à 0,0005% (p/v) (mélange extemporané).
- Laver le gel abondamment 2 fois 30 sec avec de l'eau ultra pure
- Arrêter la réaction de développement avec une solution de glycine à 0,5% (p/v)
- Laver 2 fois 30 min le gel dans de l'eau ultra pure

- Bleu de Coomassie® R250 : Bio-Rad Laboratories (Marnes-la-Coquette, France)

- H₂O Milli-Q® : Millipore (67120 Molsheim,France)

Fiche Technique n° 12

Transfert des protéines sur membrane de PVDF

- **Électro-transfert semi-sec**

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert
- Couper la membrane PVDF à la dimension du gel et l'immerger dans du méthanol, puis la tremper en même temps que les papiers filtre dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la plate-forme anodique du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - un papier filtre Whatman® 3mm³
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre Whatman® 3 mm³
- Expulser les bulles d'air à l'aide d'un rouleau
- Éponger l'excédent de tampon autour du sandwich
- Placer la plaque cathodique au sommet du montage et refermer l'appareil avec son capot
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à une tension constante de 10V pendant 45 min
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane de PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau (0,1 % (w/v) dans 5% acide acétique) pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon. Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

-
- Tampon de transfert : Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20% (v/v) pH~8,3 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Membrane polyvinylidene difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Papier filtre Whatman ou blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))
 - Appareil de transfert électrophorétique semi-sec Trans-Blot® SD (Bio-Rad Laboratories)
 - Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

- **Électro-transfert « liquide »**

- Tremper le gel d'électrophorèse pendant 15 min dans le tampon de transfert à 4°C
- Couper la membrane de PVDF et les papiers filtres à la dimension du gel (~5×8 cm) et les immerger dans du tampon de transfert à 4°C pendant 15 min
- Superposer les différents éléments du sandwich sur la partie transparente de la cassette du système de transfert dans l'ordre suivant :
 - éponge
 - un papier filtre
 - la membrane de PVDF
 - le gel de polyacrylamide
 - un papier filtre
 - éponge
- Expulser les bulles d'air en faisant rouler une pipette plastique, cassée en deux, sur le sandwich
- Placer la cassette dans son socle en mettant bien la partie noire de la cassette contre la partie noire du socle et refermer l'appareil
- Placer le montage dans la cuve remplie de tampon de transfert
- Brancher l'appareil sur un générateur de courant continu et transférer à ampérage constant 250 mA pendant 1h
- Démonter le sandwich et récupérer la membrane PVDF
- Colorer la membrane avec une solution de rouge Ponceau S5 pendant 5 min, décolorer partiellement à l'eau distillée puis repérer les standards de poids moléculaires au crayon de papier.
- Poursuivre le rinçage jusqu'à décoloration complète de la membrane

-
- Appareil de transfert électrophorétique Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories)
 - Tampon de transfert : Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0,0375% (p/v) pH~9,2 (ne pas ajuster avec HCl)
 - Membrane polyvinylidène difluoride membrane, (PVDF), porosité 0,2 µm (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France)
 - Papier buvard d'épaisseur 1 mm (blotting paper, Sigma-Aldrich (St Louis, USA))
 - Solution filtrée de rouge Ponceau S à 0,5% (p/v) contenant acide acétique à 1% (v/v) : Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche Technique n° 13

Immunodétection par révélation en chimiluminescence de l'activité péroxidase

- Saturer les sites aspécifiques en incubant la membrane de nitrocellulose dans du tampon de blocage pendant 1 h à température ambiante sous agitation lente
- Incuber la membrane avec l'anticorps primaire (aux dilutions adéquates) dirigé contre une protéine donnée dans du tampon de blocage pendant 1 nuit à 4°C, sous agitation rotative lente, dans de petits sacs scellés (1ml/10 cm²).
- Laver la membrane PVDF 4 fois 10 min avec le tampon de lavage
- Incuber la membrane dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la péroxidase pendant 1 h sous agitation rotative lente à température ambiante (technique des sacs scellés, 1 ml/10 cm²)
- Laver 4 fois 10 min la membrane avec du tampon de lavage
- L'activité péroxidase est révélée par chimiluminescence
- Déposer la membrane (protéines vers le haut) sur un film plastique
- Appliquer le volume indiqué par le fournisseur de mélange réactionnel, puis recouvrir d'un film plastique
- Laisser incuber 5 min, puis sécher la membrane
- Disposer la membrane entre 2 films plastique
- Mettre en contact la membrane ainsi protégée avec un film autoradiographique pendant 1 à 5 min
- Révélation du film autoradiographique dans un bain de développement jusqu'à apparition des premières bandes (~30 s)
- Rinçage à l'eau
- Bain de fixation jusqu'à transparence du film (~2 min)

N.B. La révélation peut désormais se réaliser grâce à l'appareil FUSION FX7 7026WL/26MX
- les bandes obtenues sont analysées par le logiciel ImageJ 1.43u

-
- Tampon de blocage : Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), NaCl 0,15 M (TBS) contenant du Tween 20® à 0,3% (v/v) et 5% de lait en poudre écrémé
 - Tampon de lavage : TBS contenant Tween® 20 à 0,05% (v/v)
 - ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, UK) est basé sur la synthèse enzymatique d'un ester acridinique émettant une lumière intense
 - Saran®, filme plastique (Dow Chemical Company, Midland, MI, USA)
 - BIOMAX MR (Kodak Scientific Imaging Film, NY, USA)
 - Révélateur radio (LX24 – Kodak, France)
 - Fixateur radio (AL4 – Kodak, France)

Anticorps primaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps	Source	Dilution	Fournisseur
<i>P-gp mmAb [C219]</i>	souris	1/500	abcam, Paris, France
<i>Gapdh mmAb</i>	souris	1/1000	Millipore, Molsheim, France
<i>Akt (pan) (C67E7) rmAb</i>	lapin	1/1000	Cell signaling technology, Saint Quentin Yvelines, France
<i>P-Akt (Ser473) (D9E) rmAb</i>	lapin	1/1000	Cell signaling technology, Saint Quentin Yvelines, France
<i>PP2A, C subunit, clone 1D6 05-421, mmAb</i>	souris	1/1000	Millipore, Molsheim, France
<i>Methyl-PP2A, C Subunit, clone 2A10, mmAb</i>	souris	1/1000	Millipore, Molsheim, France

Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence indirecte

Anticorps	Source	Dilution	Fournisseur
<i>Horseradish peroxydaseconjugated anti-</i>	Souris	1/5000	Molecular Probes, Cergy- Pontoise (France)
	Lapin	1/5000	
	Chèvre	1/5000	

Fiche Technique n° 14

Extraction des ARN avec le Kit RNeasy

Ce kit est utilisé pour extraire les ARN servant à la RT-PCR. Avec la procédure RNeasy toutes les molécules d'ARN d'une taille supérieure à 200 nucléotides sont isolées. Par conséquent les ARNr 5,8S ; 5S, et les ARNt, sont exclus (15-20% des ARN totaux). Toutes les étapes du protocole RNeasy devront être accomplies à température ambiante. Pendant la procédure, il faut travailler rapidement. Toutes les étapes de centrifugation sont menées à 20-25°C. Ne pas utiliser la centrifugeuse si elle est en dessous de 20°C.

Mode opératoire :

- Lysér les cellules poussant sur des plaques de 6 puits (diamètre 3,5 cm) avec 350 µL de tampon RLT/β-mercaptoéthanol directement dans la plaque de culture après avoir aspiré complètement le milieu
- Récupérer le lysat cellulaire dans un tube de 1,5 mL
- Passer le lysat au moins 5 fois au travers d'une aiguille de 0,9 mm de diamètre adaptée à une seringue RNase-free. A cette étape, les échantillons peuvent être placés à -80°C et être utilisés après plusieurs mois. Pour traiter les lysats congelés, décongeler les échantillons pendant 15-20 min à 37°C dans un bain-marie pour diluer les sels. Si du matériel insoluble est visible, centrifuger pendant 5 min à 3000-5000 g. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter 1 volume d'éthanol 70% (RNase-free) et bien mélanger en pipetant. Ne pas centrifuger.
- Déposer jusqu'à 700 µl de l'échantillon sur une mini-colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat. Si le volume excède 700 µl, charger les aliquots successivement sur la colonne RNeasy et centrifuger comme ci-dessus. Jeter l'éluat après chaque étape de centrifugation.
- Laver avec 350 µL de tampon RW1, et centrifuger pendant 15 s à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Laver la colonne avec 500 µL de tampon RPE et centrifuger à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat.
- Ajouter encore 500 µL de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 min à ≥ 8000 g. Jeter l'éluat et ré-centrifuger 1 min pour sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 1,5 mL. Déposer 30-50 µL d'eau RNasefree sur la membrane. Centrifuger à ≥ 8000 g pour éluer.
- Si le taux d'ARN attendu est >30 µg, répéter l'étape d'élution avec un second volume d'eau. Éluer dans le même tube collecteur.

- Rneasy Mini Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France

- Préparer le volume à utiliser, à savoir 10 µl de β-mercaptoéthanol par ml de tampon RLT.

- Ajouter de l'éthanol au tampon RPE avant utilisation soit 44 ml d'éthanol 70% Rnase-free dans les 11 ml de tampon RPE

Fiche Technique n° 15

Test de qualité et de quantification de l'ARN extrait

Test de qualité

- Électrophorèse

On effectue une migration sur un gel d'agarose à 1%. Le gel est donc composé de 30 mL de tampon TBE 1x auquel on rajoute 0,3 g d'agarose. Porter à ébullition au micro-ondes. Après chauffage de ce mélange, nous rajoutons 1 goutte de BET (fluorescent toxique et mutagène qui s'intercale entre les différentes bases azotées de l'ADN), puis on laisse solidifier le tout dans le moule prévu à cet effet.

On effectue ensuite des dépôts de 12 µL, contenant chacun 1 µL d'ARN précédemment extrait, additionné de 9 µL d'eau ultra pure et de 2 µL de tampon de charge. Le gel est enfin soumis à un champ électrique de 80V, pendant 50 minutes.

Une révélation est effectuée sous U.V. à la suite de cette migration, afin d'obtenir les résultats. Si un « smear » des bandes apparaît, ceci indique que l'ARN extrait est dégradé !

- Spectrophotométrie

Un second test de qualité est réalisé sur les ARN extraits, et ce, grâce à la lecture de la densité optique aux longueurs d'ondes de 260 et 280 nm, après dilution des échantillons au 1/40^{ème}. Les valeurs obtenues permettent de conclure sur la pureté de l'ARN. Effectivement, nous calculons le rapport A260nm/A280nm, et celui-ci doit absolument être compris entre 1,6 et 2 pour conclure à une pureté de l'ARN extrait.

Notons que la présence d'un pic d'absorbance à 260 nm indique la présence d'acides nucléiques et que l'observation du même phénomène à 280 nm indique quant à elle la présence de protéines. Si le rapport est inférieur à 1,6, cela confirme une contamination par les protéines. A contrario, si le rapport est supérieur à 2, cela indique une dégradation des acides nucléiques.

Quantification de l'ARN

Pour pouvoir réaliser une transcription inverse et une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR), il faut avoir 1 µg d'ARN. Pour cela nous réalisons une dilution au 1/40^e.

Dans ce cas, on mélange 2 µL d'ARN obtenu précédemment à 78 µL d'eau ultra pure. La lecture de la densité optique à 260 nm par spectrophotométrie est effectuée, nous indiquant ainsi la concentration d'ARN dans l'échantillon en ng/µL (car 1 U.A. correspond à 40 µg/mL d'ARN).

Fiche Technique n° 16

Retro-transcription des ARN avec le kit Quantitect® Reverse Transcription

Produits utilisés :

- Tampon gDNA Wipeout, 7x : Pour l'élimination de l'ADN génomique.
- Quantiscript Reverse Transcriptase : Pour l'utilisation de la RT-PCR en deux étapes. Contient un mélange des produits Qiagen Omniscript Reverse Transcriptase et Sensiscript Reverse Transcriptase, deux enzymes hétérodimériques exprimées chez *E.coli*. Contient des inhibiteurs des RNases.
- Quantiscript RT Buffer, 5x : Pour l'optimisation de la reverse transcription, contient Mg^{2+} et dNTPs.
- RT Primer Mix : Mélange d'oligo-dT et de random primers dissouts dans l'eau.
- RNase-Free Water : Eau ultra pure

- Le protocole est optimisé pour 10 pg à 1 µg d'ARN. Toutes les étapes doivent être réalisées dans la glace pour éviter la dégradation des ARN.

- Avant de commencer, dissoudre éventuellement les précipités qui peuvent se former dans le tampon gDNA Wipeout en vortexant ou en chauffant rapidement à 37°C jusqu'à disparition des précipités.

Procédure :

- Décongeler les échantillons d'ARN dans la glace, ainsi que le tampon gDNA Wipeout, le tampon Quantiscript RT, le mix RT Primer et l'eau.
- Sortir l'enzyme RT au dernier moment

- Étape d'élimination de l'ADN génomique

Produit	Volume/réaction	Concentration finale
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl	1x
Template RNA	Variable (1 µg)	
RNase-free water	Variable	
Volume total	14 µl	

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger rapidement
- Mettre 9 min à 42°C au thermocycler
- Mettre les tubes rapidement dans la glace

- Étape de reverse transcription

Produit	Volume/réaction	Concentration finale
Reverse-transcription master mix		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 µl	
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 µl	1x
RT Primer Mix	1 µl	
ARN	14 µl	
Total volume	20 µl	

- Homogénéiser à la pipette et centrifuger
- Mettre 15 min à 42°C puis 3 min à 95°C au thermocycler
- Mettre les tubes dans la glace
- Aliquoter les échantillons 2x10 µL et conserver les ADNc à -20°C

-
- Quantitect® Reverse Transcription Kit : Qiagen, Courtaboeuf, France
 - Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin Elmer Biosystems, 91945 - Courtaboeuf cedex)

Fiche Technique n° 17

PCR semi quantitative

Produits utilisés :

- Platinum® Taq DNA polymerase
- Tampon de PCR, sans MgCl₂ 10X
- Magnésium Chloride 50 mM
- dNTP

- Décongeler les échantillons d'ADNc, ainsi que les réactifs de PCR : le tampon de PCR, le MgCl₂

- Préparer un « mix » de PCR contenant pour chaque tube : 0,2 µM d'amorce sens, 0,2 µM d'amorce antisens, 1 unité de Platinum® Taq DNA polymerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP et le tampon de PCR 1X concentré pour un volume final de 50 µL qsp eau ultra pure

- Distribuer 48 µL de mix dans les tubes de PCR et ajouter 2 µL de produits de RT pour chacun des échantillons

- Programmer le bloc thermostaté pour 35 (*MDR-1*) ou 22 (*POL2*) cycles avec 3 étapes par cycle :

- la dénaturation à 94°C pendant 30 s
- l'hybridation à 55°C pendant 30 s
- l'élongation à 72°C pendant 30 s

Au début de chaque cycle, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 120 sec et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min.

- Conserver les produits de PCR à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose.

Gène	Oligonucléotides	Taille du produit
<i>MDR-1</i>	sens: 5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' antisens: 5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3'	152 pb
<i>POL2</i>	sens: 5'- CTG CTT CTT CTG CTC CAA ACT GCT -3' antisens: 5'- TGT CCA TCT CCT CCC CAC CCT -3'	155pb

-
- Tous les produits sont fournis par Invitrogen ,Cergy-Pontoise, France
 - Thermocycler, Perkin Elmer

Fiche Technique n° 18

PCR quantitative en temps réel avec le kit Quantitect® SYBR®

Green PCR

Produits utilisés :

- HotStarTaq DNA Polymerase: forme modifiée de l'ADN polymerase recombinante (94kDa) isolée de *Thermus aquaticus* clonée chez *E.coli*. N'a pas d'activité enzymatique à température ambiante.
- QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: Contient : Tris·HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, pH 8.7 (20°C)
- dNTP mix : Contient dATP, dCTP, dGTP, et dTTP/dUTP
- Fluorescent dyes : le **SYBR Green I** émet de la fluorescence lorsqu'il se lie à l'ADN double brin (l'excitation du fluorophore s'effectue à 494 nm et l'émission à 521 nm et **ROX** émet la même fluorescence tout au long de la PCR, il sert de niveau de référence sur lequel tous les signaux fluorescents seront normalisés, il compense les différences de détection de fluorescence entre les puits dues aux faibles variations de volume réactionnel ou encore à la position des puits)
- RNase-free water : Eau ultra pure

Avant de commencer :

- La longueur de l'ADN à amplifier doit être idéalement comprise entre 100 et 150 pb
- Une étape initiale d'incubation de 15 min à 95°C est nécessaire pour activer l'ADN polymérase HotStar Taq
- Toujours commencer la réaction avec une concentration finale de MgCl₂ de 2,5 mM comme cela est fourni dans le tampon quantitect SYBR Green PCR Master Mix.

Procédure :

- Décongeler les échantillons dans la glace, le master mix, les amorces et l'eau
- Préparer un « mix » selon le tableau suivant :

	Par tube
SYBR-Green	10 μL
ADNc	1 μL
Amorces mix	1,2 μL (à 10μM)= 0.6sens+0.6AS
H2O Kit	7,8 μL
Volume total	20μL

- Dans les puits d'une plaque 96 puits, mettre 19 μ L de « mix »
- Ajouter 1 μ L d'ADNc de la dilution souhaitée soit pour la gamme étalon soit pour l'échantillon à quantifier relativement à la gamme
- Coller un film adhésif transparent sur la plaque en insistant bien sur les contours
- Programmer le bloc thermostaté pour un nombre de cycle compris entre 35 et 45 avec 3 étapes par cycle :
 - la dénaturation à 94°C pendant 30 s,
 - l'hybridation à 55-56°C (selon les amorces utilisées) pendant 30 s
 - l'élongation à 72°C pendant 30 s.
- Avant les 35-45 cycles, ajouter une étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 15 min et à la fin une élongation finale à 72°C pendant 7 min suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5s.
- Programmer ensuite la courbe de fusion en 50 cycles en augmentant la température de 65°C à 95°C à raison de 0,5°C par seconde.
- La plaque peut ensuite être conservée à -20°C pour la visualisation des ADN sur gel d'agarose

Gène	Oligonucléotides	Taille du produit
<i>MDR-1</i>	sens: 5'- CCA CAG AGG GGA TGG TCA GTG TT-3' antisens: 5'-AGC GAA TGT TTT CAG CTA TCG TGG T-3'	131 pb
<i>POL2</i>	sens: 5'- CTG CTT CTT CTG CTC CAA ACT GCT -3' antisens: 5'- TGT CCA TCT CCT CCC CAC CCT -3'	155pb
<i>Cox2</i>	sens: 5'- GCA TCC CCT TCT GCC TGA CAC C -3' antisens: 5'- CCT ACC ACC AGC AAC CCT GCC -3'	154pb

Fiche Technique n° 19

Analyse qualitative de l'ADN sur gel d'agarose

- Peser l'agarose afin de préparer un gel à 0,8-1% (p/v) selon la taille des ADN étudiés
- Dissoudre l'agarose dans du tampon TBE 1X (80-100 mL) par chauffage au four à micro-ondes jusqu'à un début d'ébullition puis laisser refroidir à ~50°C sur la paillasse
- Ajouter du bromure d'éthidium (BET) à une concentration finale de 0,5 µg/mL et homogénéiser
- Verser délicatement la solution chaude d'agarose dans le support de gel et laisser polymériser pendant 15 min à température ambiante.
- Retirer le peigne et la plaque de son support puis placer le gel dans la cuve d'électrophorèse horizontale remplie avec du tampon TBE 1X
- Déposer dans les puits du gel, 10 µL de produits de PCR mélangés à 2 µL de solution de dépôt ainsi que des marqueurs de taille
- Refermer la cuve avec son couvercle et relier les électrodes à un générateur de courant continu
- Faire migrer l'ADN sous une tension constante de 130 V pendant 50 min (18 V/cm)
- L'ADN contenu dans le gel est visualisé sur une plaque UV (312 nm) par Image MasterTM VDS.

-
- Agarose standard, Euromedex
 - Tampon TBE 10X: Tris 890 mM acide borique 890 mM, EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic acid) 20 mM (pH8,0) Wide Mini-SubTM Cell (Bio-Rad Laboratories)
 - Bromure d'éthidium (BET) : Eurobio
 - Solution de dépôt 6X : Bleu de bromophénol 0,05% (p/v), saccharose 40% (p/v), EDTA 0,1 mM (pH 8,0), SDS 0,5% (p/v), Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - Marqueurs de taille : φX174 RF DNA/*Hae*III Fragments : 72-1353 pb (11 bandes) (Gibco BRL, Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA)
 - pUC18/MspI : 26-501 (12 bandes) ; Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - 100 bp DNA Ladder : 100-1000 pb (11 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
 - 1 kb DNA Ladder : 250-10000 pb (14 bandes) (Promega Corporation, Madison, WI, USA)
 - SmartLadder : 200-10000 pb (14 bandes) marqueur de quantification (Eurogentec)

Fiche Technique n° 20

Mesure de la concentration des métabolites SAM, SAH à partir d'homogénats cellulaires par HPLC

- Préparation des solutions pour la phase mobile :

Tampon A (ajusté à pH 3,2 avec H₃PO₄ 85%)

NaH₂PO₄ à 50 Mm / Acide Heptansulfonique ,10 Mm/ Acétonitrile, 10%

Tampon B (ajusté à pH 3,2 avec H₃PO₄ 85%)

NaH₂PO₄ : 50 mM / Acide Heptansulfonique, 10 Mm/ Acétonitrile, 50%

- Procédure :
 - Extraction des protéines comme décrit dans la (*Fiche n°7*)
 - Supplémenter les échantillons avec 5% d'acide perchlorique
 - Centrifuger à 20.000 x *g* à 4°C pendant 20 min
 - Filtrer les surnageants sur un filtre de 0,45 µm
 - Injecter 60 µL dans des inserts
 - Placer les échantillons dans l'appareil à HPLC

Injecter l'échantillon (20 µL) dans un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) constitué d'une pompe à haute pression, d'un injecteur d'échantillon automatisé, une colonne contenant une résine de silice de 5 µm de granulométrie comportant des greffons hydrophobes (18 carbones), maintenu à 30°C dans un four à colonne, à un débit constant de 0,75 mL/min (générant environ une pression de 115 bar).

L'absorbance est mesurée à 254 nm (maximum d'absorbance des purines par un spectrophotomètre UV-visible).

N.B : L'ordre d'élution des différents métabolites est la SAH puis la SAM. En parallèle, des standards contenant différentes concentrations de SAH et SAM (8-6-4-2-1 et 0,5µM) sont passés pour obtenir une gamme étalon réalisée en mesurant l'aire sous le pic en fonction de la concentration de standards. Ceci permettra de déterminer la concentration des échantillons selon une droite d'équation $y=ax+b$

-
- Acide perchlorique 60% : BDH, VWR International, 94126 Fontenay sous bois, France
 - Loehrer FM, *et al. Atherosclerosis*, 2001
 - Tous les produits sont fournis par Sigma-Aldrich (St Louis, USA)
 - Acétonitrile, acide heptansulfonique, VWR Prolab
 - *Cell sonifier disruptor*, Branson®
 - Pompe à haute pression, SpectraSystem, P1000XR, TSP
 - Injecteur d'échantillon automatisé, AS100, TSP
 - Colonne K5OD2QS25, 250x4 mm, Lichrospher (Interchim)
 - Filtre PVDF de 4mm de diamètre et de porosité 0,45 µm : Nalgène, 67172 Brumath, France
 - Four à colonne, Waters
 - Spectrophotomètre, SpectraSeries UV100, TSP
 - Standards SAM et SAH, Sigma-Aldrich (St Louis, USA)

Fiche Technique n° 21

Dosage de l'activité PLD

Le test de dosage de l'activité PLD a été réalisée selon Ella *et al.*, 1994.

- Le tapis cellulaire est décollé par grattage, en utilisant des grattoirs spécifiques pour la culture cellulaire
- Les cellules sont récupérées dans du PBS_{1x}
- La suspension est soumise aux ultrasons pendant quelques secondes
- Un dosage des protéines est effectué selon la méthode décrite sur la fiche technique n° 9
- 50 µg de protéines totales sont utilisés pour le dosage de l'activité de la phospholipase
- Le volume réactionnel final est de 220 µL et il contient :
 - 0,1 mM BODIPY-phosphatidylcholine (B-PC)
 - 150 mM NaCl
 - 0,2 mM octylglycoside
 - 44 mM de tampon phosphate [pH 7,5]
 - 80 mM de bêta-glycérophosphate
 - 10 mM d'EGTA (Éthylène glycol tétra-acétique)
 - Dithiothréitol 5 mM
 - 1% de n-But (135 mM)
- Le mélange réactionnel est incubé avec l'extrait protéique à 37 ° C pendant 60 min
- Les produits ont été ensuite séparés par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant du chloroforme / méthanol / eau / acide acétique (44:44:10:2, v / v / v / v) et ont été révélés à la lumière UV

– BODIPY-phosphatidylcholine : 2-(4,4-Difluoro-5,7-Diméthyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Pentanoyl)-1-

Hexadecanoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine (β-BODIPY® FL C₅-HPC), Invitrogen/Molecular Probes, Saint Aubin ,France

Fiche Technique n° 22

Dosage des Phospholipides

- Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri.
- Le milieu de culture est ensuite enlevé et les cellules sont rincées au PBS_{1x} à température ambiante
- Elles sont ensuite récupérées par grattage dans du PBS et centrifugées pendant 5 min à 2500 rpm
- Le culot cellulaire est repris dans 1000 µl d'eau. (Un aliquot de ces échantillons est conservé dans des tubes Eppendorfs à -20°C pour le dosage des protéines)
- 2,5 ml de méthanol sont alors ajoutés puis les cellules sont soniquées pendant 1min
- Un volume de 1,25 ml de chloroforme est alors ajouté à chaque échantillon qui sont ensuite à nouveau soniqués pendant 1min
- Un mélange de 1,25 ml de chloroforme et 1,25 ml d'eau est ensuite ajouté
- Le mélange est centrifugé pendant 10 min à 2500 rpm
- Deux phases sont obtenues :
 - La phase supérieure contient la phase aqueuse avec les acides nucléiques et les protéines et
 - la phase inférieure le chloroforme et des lipides
- La phase organique est prélevée et évaporée sous vide
- Les lipides extraits sont ensuite repris avec 25 µl de chloroforme
- La quantité contenant 30 µg de lipides est déposée sur une plaque de chromatographie en couche mince (Bligh et Dyer, 1959) en silice
- La première dimension s'effectue avec une phase constituée de chloroforme, du méthanol, de l'ammoniaque et de l'eau (30/13,5/1/1,5 ; v/v/v/v), pendant 30 min
- La deuxième dimension s'effectue dans une phase constituée de chloroforme, du méthanol, d'acétone, d'acide acétique et d'eau (15/20/5/5/2,5 ; v/v/v/v/v)
- Une fois les plaques séchées, les phospholipides sont révélés par coloration à la Rhodamine B – les spots sont grattés et utilisés pour mesurer la composition en phosphate avec la méthode de Chen *et al.* (1956). (Rouser *et al.* 1970)

- Plaque de chromatographie en couche mince en silice, Merck, Darmstadt, Allemagne

Annexe II : Publications

Publications dans des revues internationales

- Marguerite V*, **Gkikopoulou E***, Alberto JM, Guéant JL, Merten M. (*contribution égale)
Phospholipase D activation mediates Cobalamin-induced downregulation of *MDR-1* gene and increase in sensitivity to vinblastine in HepG2 cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2012 [Accepté].
- **Gkikopoulou, E**, Guéant JL, Merten M.
AKT/PP2A and Cox-2 signaling mediates cobalamin-induced inhibition of *MDR-1* gene expression in HepG2 cells. En préparation.
- **Gkikopoulou, E**, Guéant JL, Merten M.
Is NOS a connexion between methionine cycle and *MDR-1* gene expression? En préparation.
- **Gkikopoulou, E**, Guéant JL, Merten M.
TNF α -induced *MDR-1* gene expression in HepG2 cells is inhibited by cobalamin and oleic acid. En préparation.

Communications orales

- Repression signaling pathways of *MDR-1* gene: A link between vitamin B12 and chemotherapy?
Gkikopoulou E, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. *Advances and Controversies in B-Vitamins and Choline*, Leipzig (Germany), 5-8 Mars 2012

Publications

- L'activité du cycle de la Méthionine joue-t-elle sur la régulation de l'expression du gène *MDR-1* et pourrait-elle être une cible de la thérapie anticancéreuse? **Gkikopoulou E**, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. *Journées Nationales de l'Homocystéine*, Montpellier (France), 2 Octobre 2009

Communications affichées

- L'activation de la phospholipase D médie la répression du gène *MDR-1* induite par la cobalamine. Marguerite V, **Gkikopoulou E**, Guéant JL, Merten M. *1^{er} Forum du Cancéropôle du Grand-Est*, A5.12 : p.28, Vittel (France), Octobre 2007
 - How nutritional and environmental factors can affect mechanisms of regulation of *MDR-1* gene expression by the methionine cycle. **Gkikopoulou E**, Guéant JL, Merten M. *IV^{ème} Journée Claude Huriet*, Nancy (France), Décembre 2008
 - Voies de signalisation de répression du gène *MDR-1*. Cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ? **Gkikopoulou E**, Marguerite V, Kerek R., Guéant JL, Merten M. *V^{ème} Journée Claude Huriet de la recherche médicale*, Nancy (France), 14 Décembre 2009
 - Voies de signalisation de répression du gène *MDR-1*. Cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ? **Gkikopoulou E**, Marguerite V, Kerek R., Guéant JL, Merten M. *I^{ère} Journée Scientifique de la FR3209 Bioingénierie moléculaire, cellulaire et thérapeutique*, Nancy (France), 19 Décembre 2009
 - Voies de signalisation de répression du gène *MDR-1*. Cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ? **Gkikopoulou E**, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. *4^{ième} Forum du Cancéropôle du Grand-Est*, N° 16 : p.35, Strasbourg (France), 28-29 Octobre 2010
- Prix de jeune chercheur : 2^{ième} Prix de communication affichée**
- Relation entre les voies de signalisation Akt et NOS et l'expression du gène *MDR-1*. Cible

pharmacologique nouvelle pour améliorer la chimiothérapie ? **Gkikopoulou E**, Guéant JL, Merten M., *VIème Journée Claude Huriet de la recherche biomédicale*, Poster N° E12, Nancy (France), 17 Décembre 2010

- Repression signaling pathways of *MDR-1* gene : A link between nutritional factors and chemotherapy ? **Gkikopoulou E**, Marguerite V., Guéant JL, Merten M., *2nd Luxembourgish Nutrition Conference : “Dietary Composition, Pattern and Health “*, Book of Abstracts p.29, Mondorf (Luxembourg), 09 Mai 2011
- La protéine kinase B/Akt influencée par la cobalamine pourrait être un acteur de la chimiorésistance ? **Gkikopoulou E**, Guéant JL, Merten M., *VIIème Journée Claude Huriet de la recherche biomédicale*, Poster N° E43, Nancy (France), 2 Mars 2012
- Repression signaling pathways of *MDR-1* gene : A link between vitamin B12 and chemotherapy?
Gkikopoulou E, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. Vol.50, No.2, A17, WS1 04, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2012
- Repression signaling pathways of *MDR-1* gene: A link between vitamin B12 and chemotherapy?
Gkikopoulou E, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. Poster N° 4, *Vitamin B12 Symposium*, Nancy (France), 20-22 Septembre 2012
Félicitations du comité scientifique
- Repression signaling pathways of *MDR-1* gene : A link between vitamin B12 and chemotherapy?
Gkikopoulou E, Marguerite V, Guéant JL, Merten M. *6^{ième} Forum du Cancéropôle du Grand-Est*, Poster N° 13 : p.34, Strasbourg (France), 13-14 Novembre 2012

Article paru dans *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2012

**Phospholipase D activation mediates Cobalamin-
induced downregulation of *Multidrug Resistance-1* gene and
increase in sensitivity to vinblastine in HepG2 cells**

Véronique Marguerite*, Effrosyni Gkikopoulou*, Jean-Marc Alberto, Jean-Louis Guéant
and Marc Merten.

Laboratory of Nutrition, Genetics and Exposition to Environmental Risks, Faculty of Medicine, Vandoeuvre-lès-
Nancy, F-54505, France

*: Equal contribution

To whom correspondence and offprint request should be addressed:

Marc Merten, PhD

Laboratory of Nutrition, Genetics and exposition to environmental risks

9 Forêt de Haye avenue, B.P.184, Faculty of Medicine

Vandoeuvre-les-Nancy F-54505, France

Tel: +33 (0)3 83 68 33 03 Fax: +33 (0)3 83 68 32 79

E-mail : Marc.Merten@univ-lorraine.fr

Abstract

Failure of cancer chemotherapy due to Multidrug resistance is often associated with altered *Multidrug Resistance-1* gene expression. Cobalamin is the cofactor of methionine synthase, a key enzyme of the methionine cycle which synthesizes methionine, the precursor of cell S-adenosyl-methionine synthesis. We previously showed that cobalamin was able to down-regulate *Multidrug Resistance-1* gene expression. Herein we report that this effect occurs through cobalamin-activation of phospholipase D activity in HepG2 cells. Cobalamin-induced down-regulation of *Multidrug Resistance-1* gene expression was similar to that induced by the phospholipase D activator oleic acid and was negatively modulated by the phospholipase D inhibitor n-Butanol. Cobalamin increased cell S-adenosyl-methionine content which is the substrate for phosphatidylethanolamine-methyltransferase-dependent phosphatidylcholine production. We showed that cobalamin-induced increase in cell phosphatidylcholine production was phosphatidylethanolamine-methyltransferase-dependent. Oleic acid-dependent activation of phospholipase D was accompanied by an increased sensitivity to vinblastine of HepG2 cells while n-Butanol enhanced the resistance of the cells to vinblastine. This data indicates that cobalamin mediates down-regulation of *Multidrug Resistance-1* gene expression through increased S-adenosyl-methionine and phosphatidylcholine productions and phospholipase D activation. This points out phospholipase D as a potential target to down-regulate *Multidrug Resistance-1* gene expression for improving chemotherapy efficacy.

Keywords : Phospholipase D, Chemoresistance, Methionine Cycle, Cobalamin, Regulation

Abbreviations : ABC, ATP-Binding Cassette; Akt, Protein Kinase B; BCA, Bicinchoninic Acid; BCRP, Breast cancer resistance protein; Bet, Betaine; Beza, Bezafibrate; BHMT, Betaine-Homocysteine Methyltransferase; B-PC, Bodipy-Phosphatidylcholine; B-LysoPBut, Bodipy-LysoPhosphatidylbutanol; B-LysoPC, Bodipy-LysoPhosphatidylcholine; B-DAG, Bodipy-Diacylglycerol; B-MAG, Bodipy-Monoacylglycerol; Cbl, Cobalamin; DAG, Diacylglycerol; DMEM, Dulbecco's Modified Eagles Medium; DMG, Dimethylglycine; DMSO, Dimethyl Sulfoxide; EGTA, Ethylene Glycol Tetraacetic Acid; Erk, Extracellular signal-regulated kinase; FCS, Foetal Calf Serum; Gapdh, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GC/MS, Gas Chromatography–Mass Spectrometry; HCC, Hepatocellular carcinoma; Hcy, Homocysteine; LysoPBut, LysoPhosphatidylbutanol; LysoPC, LysoPhosphatidylcholine; LRP, Lung resistance-related protein; MAG, Monoacylglycerol; MAT, Methionine Adenosyl Transferase; MDR, Multidrug Resistance; *MDR-1*, Multidrug Resistance 1 gene; MEK, Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase; MeTHF, Methyltetrahydrofolate; MethyleneTHF, Methylenetetrahydrofolate; M-MLV, Moloney Murine Leukemia Virus; MRP1, Multidrug resistance-associated protein 1; MS, Methionine Synthase; MT, Methyl transferases; MTHFR, Methylenetetrahydrofolate reductase; mTOR, mammalian target of rapamycin; MTT, 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide; n-But, n-Butanol; Ole, Oleic acid; PA, Phosphatidic Acid; PBut, Phosphatidylbutanol; PC, Phosphatidylcholine; PC-PAF, PC-Platelet Activating Factor; PE, Phosphatidylethanolamine; PEMT, Phosphatidylethanolamine-methyltransferase; P-gp, P-glycoprotein; PKC, protein kinase C; PLD, Phospholipase D; *POL2*, RNA Polymerase II; PVDF, Polyvinylidene Difluoride; RIPA buffer, Radio Immuno Precipitation Assay Buffer; Raf, Rapidly Accelerated Fibrosarcoma; Ras, Rat sarcoma; SAH, S-adenosyl-homocysteine; SAHH, S-adenosyl-homocysteine-hydrolase; SAM, S-adenosyl-methionine; SDS, Sodium Dodecyl Sulfate; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis;

TBST, Tris-Buffered Saline/Tween 20; t-But, tert-Butanol; THF, Tetrahydrofolate; TLC, Thin Layer Chromatography; X-CH₃, Methylated substrate; X-H, Substrate to be methylated;

Introduction

Multidrug resistance (MDR) is a major cause of cancer chemotherapy failure and understanding the basis of drug resistance is a primary issue in oncology. One of the best-characterized causes of the MDR phenomenon is P-glycoprotein (P-gp) induction (Gottesman et al., 1993) which is a transmembrane protein encoded by the *MDR-1* (Multidrug Resistance 1) gene. It acts as a multidrug pump, responsible for the efflux of anticancer drugs from cells thus rendering tumours drug-resistant (Dean et al., 2001). The *MDR-1* gene is known to be up-regulated by some specific transcription factors such as Sp-1, c-jun, c-fos or YB-1 (Scotto et al., 2001) but few data are available about the down-regulation of this gene.

Amongst the biochemical alterations of cancer cells, changes in phospholipid composition and metabolism have been reported (Dobrzynska et al., 2005). These include changes in membrane microdomains and caveolae, suggesting that these specialized organelles may somehow facilitate MDR of cancer cells (Lavie et al., 2001). Caveolae were also shown to be enriched in phospholipase D (PLD), a membrane protein involved in vesicular transport and signal transduction (Czarny et al., 1999). PLD catalyzes the hydrolysis of the terminal diester bond of phosphatidylcholine (PC) to liberate phosphatidic acid (PA) and choline (Exton, 2002). It has been proposed that PA acts as intracellular signalling molecule activating protein kinases, phospholipases and protein tyrosine kinases (Exton, 1997).

Phosphatidylethanolamine methyl transferase (PEMT) is an enzyme known to modify the cell phospholipid composition. This enzyme catalyses the transfer of methyl groups from S-adenosyl-methionine (SAM) onto phosphatidyl-ethanolamine to yield phosphatidylcholine. Thus, PEMT activity strictly depends on SAM cellular availability. A key factor of SAM synthesis is the cellular availability of methionine, an aminoacid that comes either from external sources or from endogenous source which is the methionine cycle (Fig. 1). Methionine synthase is a key enzyme of the methionine cycle, that regenerates methionine from homocysteine (Hcy), using methyltetrahydrofolate as methyl donor and cobalamin (Cbl) as cofactor (Banerjee et al., 1990). Cbl is the cofactor of methionine synthase (MS) and its addition to cells leads to a significant increase in MS activity (Marguerite et al., 2007). It has also been shown that the alternative pathway of methionine production, the betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) pathway, is not functional in HepG2 cells (Pellanda et al., 2012). This implies that in HepG2 cells, methionine and SAM cell content may be exclusively Cbl-dependent.

The methionine cycle activation by Cbl leads to the downregulation of the *MDR-1* gene without any modification of the methylation status of the *MDR-1* promoter (Marguerite et al., 2007). A possible mechanism may be that Cbl could influence *MDR-1* expression through changes in methylation of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine by phosphatidylethanolamine methyl-transferase (PEMT). Phosphatidylethanolamine (PE) is a lipid that can be methylated (Akesson et al, 1978). The methylation process converts PE to PC which is a known PLD substrate (Toohey, 2006). All this suggests a possible link between methionine cycle, PEMT and PLD activity.

This paper investigates whether the *MDR-1* gene downregulation by the methionine cycle is associated with changes in phospholipids cell content and in PLD activity.

2. Experimental procedures

2.1. Materials

Cyanocobalamin (Cbl), oleic acid-albumin (Ole), n-Butanol (n-But), tert-Butanol (t-But), and Bezafibrate (Beza) were obtained from Sigma (L'Isles d'Abeau Chesnes, France). Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), Penicillin G, Streptomycin and Foetal Calf Serum (FCS) were obtained from GIBCO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Bodipy-PC was from Molecular Probes, Eugene, OR, USA. All other chemicals were of cell culture grade.

2.2. Cell culture

The HepG2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC number: HB-8065). The cells were seeded and grown in basal DMEM supplemented with penicillin and streptomycin (100U/ml each) and 10% of heat-inactivated FCS and were incubated in a humidified incubator (10% CO₂) at 37°C. Experiments were initiated when cells reached 90% of confluency. Cells were routinely screened for Mycoplasma contamination. HepG2 cells were seeded onto 6-well plates (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and incubated with either Cbl (100 nM), Oleic acid (20 µM), n-But (135 mM), tert-Butanol (t-But, 135 mM), or a combination of either Cbl (100 nM) and Oleic acid (20 µM), or Cbl (100 nM) and n-But (135 mM) for 24 hours. Cbl was used at a dose of 100 nM, which was chosen after having tested a range of doses (30-10⁶ pM) in different cell types (Ortiou et al., 2004). This concentration is far above the known serum concentration (150-650 pM), and

was shown to lie inside a plateau of maximal effect of Cbl on cell growth and activation of methionine synthase.

2.3. PLD activity assay

PLD assay was performed according to Ella et al. (1994). Briefly, the cells were scraped into PBS and sonicated for a few seconds. 50 µg of total protein were used for the Phospholipase Assay which was performed in a final reaction volume of 220 µl containing 0.1 mM BODIPY-phosphatidylcholine (B-PC), 150 mM NaCl, 0.2 mM octylglycoside, 44 mM phosphate buffer [pH 7.5], 80 mM beta-glycerophosphate, 10 mM EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid), 5 mM dithiothreitol and 1% n-But (135 mM). Incubation initiated with the crude protein preparation was carried out at 37°C for 60 min. Products were then separated by thin layer chromatography (TLC) using chloroform/methanol/water/acetic acid (44:44:10:2 ; v/v/v/v) and revealed under UV light.

2.4. Cell treatment, RNA isolation and RT-PCR for MDR-1

HepG2 cells were seeded onto 6-well plates (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) and incubated with either Cbl (100 nM), Oleic acid (20 µM), n-But (1% i.e. 135 mM), tert-Butanol (t-But, 1% i.e. 135 mM), or a combination of either Cbl (100 nM) and Oleic acid (20 µM) or Cbl (100 nM) and n-But (135 mM) for 24 hours. Total RNA was extracted from the cultured cells according to the RNeasy Mini Kit extraction protocol, from Qiagen (Courtaboeuf, France). The extracted RNA was quantified by spectrophotometry and its integrity was checked by gel electrophoresis. 1 µg of total RNA was used for reverse

transcription in a total volume of 20 µL, using M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse transcriptase (200U) and reagents from Invitrogen. Aliquots of 2µL of cDNA were used for amplification. The used primers for *MDR-1* are, forward: 5'-CCC ATC ATT GCA ATA GCA GG-3' and reverse: 5'-GTT CAA ACT TCT GCT CCT GA-3' and the expected product size is 152 base pairs. For polymerase II (*POL2*), which is used as an internal standard, the used primers are, forward: 5'- CTG CTT CTT CTG CTC CAA ACT GCT -3' and reverse: 5'- TGT CCA TCT CCT CCC CAC CCT -3'. The expected product size is 155 base pairs. The cycling conditions were 94°C for 120 seconds, followed by 35 and 22 cycles, respectively, of 94°C for 30 seconds, 57°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds. PCR products were separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining under ultra-violet light.

2.5. Quantitative RT-PCR for *MDR-1*

HepG2 cells were seeded, cultured and treated in the same conditions as above. Specific amplifications were performed using as primers (*MDR-1*), forward: 5'- CCA CAG AGG GGA TGG TCA GTG TT-3', reverse: 5'-AGC GAA TGT TTT CAG CTA TCG TGG T-3'; expected product size is 131 base pairs. Quantification was performed using *POL2* as internal standard with the following primers: forward: 5'- CTG CTT CTT CTG CTC CAA ACT GCT -3'; reverse: 5'- TGT CCA TCT CCT CCC CAC CCT -3'. The expected product size is 155 base pairs. Real-time PCR was carried out using the DNA binding dye SYBR Green I for the detection of PCR products by a Biorad iCycler 3580 RTzwX45RF apparatus. Temperature cycling proceeded as follows: 1 cycle at 95°C for 4 min to activate the enzyme, then for 35 cycles, 95 °C for 10 s, 65 °C for 5 s and 72 °C for 10 s, followed by melting curves analyses (increasing temperature from 70 to 95°C). Product identity was confirmed by sequence

analysis and electrophoresis on 1% agarose gel and stained with ethidium bromide afterward. Results are expressed as a ratio of ΔCt of *MDR-1* cDNA to that of *POL2* cDNA and compared to untreated cells to which was arbitrarily attributed a value of 1.

2.6. Immunoblot analysis

Cultured cells were washed with ice-cold PBS1x. They were solubilized in a RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) buffer containing 140 mM NaCl, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate, 1% (v/v) Nonidet P-40, 0.1% (w/v) Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) and protease inhibitors (Roche Applied Science, Meylan, France). They were then lysed by 3 cycles of freezing/thawing and finally centrifuged at 4°C for 30 min at 15.000 g. The protein concentration in the supernatant was determined using the BCA (Bicinchoninic acid) protein assay kit (Uptima-Interchim, Montluçon, France). 30 µg of protein were separated by 12% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) according to Laemmli. Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes, which were blocked for 1 h with Tris buffered saline (pH 7.4) and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST; Tris-Buffered Saline and Tween 20) buffer, containing 5% (w/v) non-fat dry milk. The PVDF membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBST buffer, containing 5% non-fat dry milk as follows: anti-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (anti-Gapdh) (mouse monoclonal, 1/1000, Millipore, Molsheim, France), anti-P glycoprotein (anti-P-gp) (mouse monoclonal [C219], 1/500, abcam, Paris, France). The membranes were washed with TBST buffer and incubated for 1 h at room temperature with the corresponding horseradish peroxidase-conjugated preadsorbed secondary antibody (1/5.000, Molecular Probes, Eugene, USA). Immunoreactive proteins were visualised by using the enhanced chemiluminescence protocol (ECL kit, Amersham Biosciences, Orsay,

France). The quantification of proteins was performed with ImageJ 1.43u software and expressed as intensity relative to Control (in arbitrary units; A.U.), i.e. the ratio of P-gp to Gapdh band intensities.

2.7. Determination of SAM and SAH amounts

Cells were incubated with 100 nM of Cbl for 24 hours, in the presence, or absence, of 20 μ M of the PEMT inhibitor Beza for 90 minutes. The cells were then scraped in PBS and sonicated for 1 min on ice. The homogenate was then centrifuged at 20.000 g/4°C/10 min. 3% perchloric acid solution was added to the supernatant which was then centrifuged at 20.000 g for 20 min. The supernatant was then filtered through a 0.45 μ m membrane before separation. The sample was injected (50 μ L) in an HPLC system which consisted in a high pressure pump (TSP, P1000XR), an autosampler (TSP, AS100) and a C18 column (lichrospher OD2, 5 μ m, 250x4 mm) maintained at 30°C and a flow rate of 0.75 mL/min (130 bar). The mobile phase contained NaH_2PO_4 (50 mM, pH 3.2), heptanesulfonic acid (10 mM) and a gradient of acetonitrile (0-20 % from 0 to 20 min). The signal was measured by UV absorbance (254 nm, TSP, UV200). The amounts of SAM and SAH were calculated by using a range of standards.

2.8 Thin layer chromatography of phospholipids

Cells were scraped off from the plates and lipids were extracted using the Bligh and Dyer method (1959). The dried lipids were redissolved in 20 μ l of CH_3Cl . Phospholipids were separated by two dimensional chromatography on 10x10 cm Merck silica gel-60 precoated glass plates. The solvent system consisted of CHCl_3 / methanol / acetone / 25 % $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$

Publications

(16.4/4/9.8/1/1, v/v/v/v/v) in the first dimension and CHCl_3 / methanol / acetone / acetic acid / H_2O (15/5/6/3/1.5; v/v/v/v/v) in the second dimension. (Rouser et al., 1970). After chromatography, plates were dried under N_2 stream. The spots revealed under Rhodamine B were scraped off, eluted with 0.2 ml ethanol and counted for their phosphate composition according to the Chen et al. method (1956). Lipids were identified by comparing their R_f values with those of authentic standards obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.9. Drug-sensitivity assay

The sensitivity of the HepG2 cells to vinblastine was determined using the MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay. Briefly, cells were seeded onto 96-well plates and let to grow until 90% of confluency. Some of the plates were incubated with 20 μM Oleic acid or 135 mM n-But for 24 hours. Plates were then incubated with increasing concentrations (from 1 nM to 30 μM) of vinblastine for 48 h with or without 20 μM Oleic acid or 135 mM n-But. After incubation, cell medium was replaced with fresh drug-free medium containing 0.1 mg/ml of MTT and the cells were incubated for an additional 1 hour. Culture medium was removed and dye was extracted with DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Absorbance of samples was measured at 570 nm using a microplate reader. Negative Control was conducted using only drug-free culture medium and positive Control by using culture medium containing 1% of sodium azide leading to a 100% cell death. Experiments were performed at least three times and each concentration was tested in octaplates in each experiment. Viability was expressed as a percentage of untreated cells (mean $\pm$ SD). IC_{50} curves were plotted using SigmaPlot 10.0 software.

2.10. Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SD of at least triplicate measurements. To compare the effects of agents, values are presented relatively to the effect in absence of treatment (Control) having an arbitrary value of 1. Statistical comparisons were based on the Student's *t*-test analysis using StatView software. The difference between agents and standard was isolated by the Scheffé's multiple comparison test. A value of $P < 0.05$ was taken as an indicator of statistical significance. Control corresponds to cells incubated with vehicle solutions.

3. Results

3.1. Cobalamin changes SAM and SAH in HepG2 cells

We examined levels of SAM and SAH as a result of the changes in MS (by adding Cbl) and in PEMT (by the use of PEMT inhibitor, Beza) activities. Fig. 2A and B show that SAM and SAH levels increased by 52 ± 4 % and 135 ± 7 %, respectively, after incubation with Cbl. Beza led to a decreased production of both SAM and SAH (-25 ± 2 % and -35 ± 4 %, respectively). A mixture of Cbl and Beza led to an intermediate level of both SAM and SAH. This suggests that both the methionine cycle and PEMT may be able to regulate cellular SAM production and thus SAH generation through the use of SAM.

3.2. Bezafibrate increases and SAM decreases *MDR-1* gene expression in *HepG2* cells

We determined, using quantitative RT-PCR, whether *MDR-1* gene expression might be modulated by SAM or Beza (PEMT inhibitor). As indicated in Fig. 2C, a decrease in *MDR-1* mRNA (down to 0.15 ± 0.012) was found in the presence of 75 μ M SAM as compared to standard cell-culture conditions (Control, given an arbitrary value of 1). This decrease is similar to that induced by Cbl. In contrast, incubation with 10 μ M of Beza led to an increase (up to 1.7 ± 0.10) in *MDR-1* gene expression.

We then looked at whether Cbl associated with SAM or Beza may modulate *MDR-1* gene expression. Fig. 2C shows that Cbl diminishes the increase in *MDR-1* mRNA induced by Beza (from 1.7 ± 0.10 to 0.03 ± 0.01). A mixture of SAM and Cbl also led to a decrease in *MDR-1* mRNA level (down to 0.12 ± 0.01).

3.3. Cobalamin increases PC production in *HepG2* cells

SAM is a well known substrate of PEMT. We used Cbl alone or together with the PEMT inhibitor Beza to figure out the possible involvement of this pathway in Cbl-induced decrease in *MDR-1* gene expression. When the methionine cycle, which provides methyl units for PE methylation, was activated by addition of Cbl (Fig. 2D), the amounts of PC produced by the cells increased (from a basal 30 ± 3 mmol/mg of protein to 47 ± 4 mmol/mg of protein) whereas PE level was unchanged. However, Beza added alone caused no significant changes

in both PC or PE amounts. A mixture of Beza and Cbl led to a significant diminution of PC concentration (down to 18 ± 2 mmol/mg of protein) consistent with an increased use of PC by activated phospholipase, while PC is no longer produced by Bezafibrate-inhibited PEMT.

3.4. Cobalamin increases PLD activity in HepG2 cells

Transphosphatidylation reaction is a specific assay used to determine PLD activity. PLD can catalyze the exchange of the polar head group of the phospholipid substrate with a given primary alcohol to form the corresponding phosphatidyl alcohol (Rouser et al., 1970). This specific transphosphatidylation reaction has been used in many studies as a marker for estimating PLD activation. As a consequence, the use of primary alcohols such as n-But leads to an increase in Phosphatidyl-Butanol (PBut), and a decrease in PA, production. BODIPY-labelled PC (B-PC) is a suitable fluorescent PLD substrate because of its great resistance to photobleaching, the stability of the fluorescent properties of all of its hydrolysis products and because of the specificity to PLD amongst the different cell phospholipases (Yang et al., 1967; Ella et al., 1994).

PLD activity was examined in HepG2 extracts which were incubated for 24 h in the presence, or absence, of Cbl or PLD modulators. After incubation of these extracts with B-PC, aliquots of the reaction mixture were applied to the TLC plate. As shown in Fig. 3, Cbl- or Oleic acid-treated cells showed enhanced utilization of the B-PC substrate as compared to extracts from untreated cells (Control). On the contrary, n-But-treated cells showed reduced utilization of the B-PC substrate. The identity of hydrolysis products was assigned by comparison with known standards and confirmed by GC/MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) (data not shown). Three products, Lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC), Lyso-

phosphatidylbutanol (Lyso-PBut) and PBut were mainly observed indicating that further metabolism of the PLD reaction products occurred in extracts of HepG2 cells. Neither BODIPY-monoacylglycerol (B-MAG), nor BODIPY-diacylglycerol (B-DAG) were observed. This is consistent with absence of cell stimulation with agonists and further conversion of PA by a PA phosphatase (generating DAG; Diacylglycerol) and a diacylglycerol lipase (generating MAG; Monoacylglycerol) under these experimental conditions. B-PBut production was quantified using image J 1.43u software. Cbl and oleic acid were shown to trigger respectively a threefold and a fivefold increase in B-PBut production, while n-But dramatically reduced B-PBut production (down to 5 ± 2 % of Control).

3.5. PLD modulators regulate *MDR-1* gene expression in HepG2 cells

We determined, using semi-quantitative and quantitative RT-PCR, whether *MDR-1* gene expression might be modulated by PLD modulators in the same conditions where PLD activities were seen changing. As indicated in Fig. 4A, a decrease in *MDR-1* mRNA (down to 0.06 ± 0.06) was found in the presence of 20 μ M Oleic acid as compared to standard cell-culture conditions (Control, given an arbitrary value of 1). In contrast, incubation with n-But led to a dramatic increase (up to 3.7 ± 0.13) in *MDR-1* gene expression. No significant change in *MDR-1* expression was obtained with the inactive analogue tert-Butanol (t-But).

We previously showed that Cbl also induces a decrease in *MDR-1* gene expression in HepG2 cells (Marguerite et al., 2007). Here we looked at whether Cbl and PLD effectors may interact in modulating *MDR-1* gene expression. Fig. 4A shows that Cbl (n-But+Cbl lane) diminishes the increase in *MDR-1* mRNA induced by n-But (from 3.7 ± 0.13 to 1.2 ± 0.05). However, a mixture of Oleic acid and Cbl (Ole+Cbl) yielded a decrease in *MDR-1* mRNA

level that was similar to that induced by Cbl or by Oleic acid alone. All these results suggest a link between methionine synthase activity, PLD activity and *MDR-1* gene expression.

3.6. *PLD modulators regulate P-gp in HepG2 cells*

We subsequently determined, using Western-blotting analysis, whether the expression of P-gp may also be modulated at the protein level by PLD modulators in the same conditions where PLD activities and *MDR-1* gene expression were seen to change. As shown in Fig.4B , a twofold increase in P-gp level was observed when cells were incubated with n-But (from 1 ± 0.1 up to 2.11 ± 0.3) whilst a decrease in P-gp was shown when cells were incubated with Oleic acid (down to 0.65 ± 0.09). Similarly to the observation made with PCR, t-But was without any effects, and Cbl (n-But+Cbl lane) showed to counteract the increase in P-gp induced by n-But (from 2.11 ± 0.3 down to 1.14 ± 0.1). However, a more extended diminution of P-gp was shown (down to 0.36 ± 0.13) with a mixture of both Oleic acid and Cbl (Ole+Cbl).

3.7. *PLD modulators influence resistance to vinblastine in HepG2 cells*

Vinblastine is an antimitotic agent used in cancer chemotherapy but also a well-known substrate of P-gp. Cancer cell resistance to vinblastine is known to be mediated by the regulation of *MDR-1* gene expression (Arias et al., 1990). As PLD effectors are able to modulate *MDR-1* gene expression, we looked at whether they were also able to modify detoxification capacity of the cells. The effect of PLD modulators on the resistance of HepG2

cells to vinblastine was thus examined by the determination of their chemosensitivity. HepG2 cells show a concentration-dependent decreasing resistance to vinblastine with a calculated IC_{50} being about 5 μM (Fig. 5, Control). In the presence of 20 μM of Oleic acid, a shift to the left was observed (with a calculated IC_{50} of 0.9 μM). An opposite effect (a shift to the right) was observed when n-But was used, with a calculated IC_{50} for n-But of about 10 μM . The association of Oleic acid with Cbl had a similar effect to that observed when using Oleic acid alone. Cbl was shown to counterbalance the effect of n-But as leading to a viability curve similar to Control.

4. Discussion

The present study provides evidence that Cbl represses *MDR-1* gene expression through PLD activation. Although much progress has been made at identifying and characterizing the signalling mechanisms that up-regulate *MDR-1* gene, much less is known about the mechanism responsible for down-regulation of this gene. Here we showed that increasing PLD activity caused a decrease in *MDR-1* gene expression in HepG2 cells. In addition, this down-regulation of *MDR-1* gene by PLD is associated with an increased chemosensitivity to anticancer agents. Thus, PLD activation appears a novel possible mechanism for improving chemosensitivity.

A recent work (Beedholm-Ebsen et al., 2010) showed that another member of the ABC (ATP-Binding Cassette) family, ABCC1/MRP1 (Multidrug resistance-associated protein 1) is able to export Cbl out of different cell types, thus lowering its intracellular amounts. HepG2 cells are known to express very low levels of MRP1 (Li et al., 2007) and MDR in these cells

is mainly due to the up-regulation of MDR1 and BCRP (Breast cancer resistance protein) but not MRP1 and LRP (Lung resistance-related protein). These data suggest that MRP1 poorly influences Cbl effects and further highlight the peculiar role of MDR1 in HCC (Hepatocellular carcinoma). Thus, reducing expression of *MDR-1* gene could be an important way for the reversal of MDR of HCC.

A previous work from our laboratory with HepG2 cells showed that Cbl was able to repress *MDR-1* gene expression through activation of methionine synthase. (Marguerite et al., 2007). This present data establishes that PLD activation is a possible link between methionine cycle activation and *MDR-1* gene expression. As neither MAG nor DAG are produced, the action of PLD might be mediated by PA, which may stimulate intracellular receptors acting on *MDR-1* promoter. Methionine produced through the methionine cycle serves mainly to generate S-adenosyl-methionine which is the principal intracellular methyl donor for transmethylation reactions. In hepatocytes, one of the predominant intracellular uses of SAM is the transmethylation of PE to form PC by the enzyme PEMT (Jacobs et al., 2005).

Activation of the methionine cycle by adding Cbl to HepG2 cells led to significant changes in both SAM and PC amounts. Involvement of PEMT was confirmed by the use of Beza (a PEMT inhibitor) which led to partial inhibition of Cbl-induced SAM production and a total inhibition of Cbl-induced PC synthesis. This suggests that activation of the methionine cycle by Cbl leads to increases in SAM production and in PC generation through PEMT.

Changes in cell PC concentration may be responsible for differences in many of the cell biochemical properties. Besides its major role in cell membrane composition and structure, PC is also a well known substrate for phospholipases. One of these, PLD, cleaves PC to form choline and PA. In many aspects, the over-expression of PLD has been implicated in cancer progression and carcinogenesis (Min et al., 2001) and is involved in many cellular functions such as membrane trafficking, cytoskeletal reorganization, receptor endocytosis, exocytosis,

and cell migration (Foster DA et al., 2003). PLD activity is elevated in cells transformed by a variety of oncogenes including v-Src, v-Ras, and v-Raf (Exton et al., 2002; Song et al., 1991; Carnero et al., 1994). Furthermore, PLD is considered as a promising target in cancer therapy (Frankel et al., 1999). Blocking PLD activity in the MDA-MB-231 cells, a breast cancer cell line, where there is a very high level of PLD activity, leads to apoptosis (Foster et al., 2003). Here we showed that PLD activation led to both *MDR-1* gene and P-gp repression and to a decrease in the HepG2 cells resistance to vinblastine. The evidence for PLD being an important component of these events relies on the use of n-But and Oleic acid. Furthermore, the fact that Cbl is able to counteract the n-But-dependent increase in *MDR-1* gene expression suggests that PLD mediates the effect of Cbl on *MDR-1* gene expression. This also indicates that PLD activity may be a main determinant of the action of Cbl on *MDR-1* gene expression.

It has been suggested that PLD may play a role in the progression of several cancers (Zhong et al., 2003; Welsh et al., 1994) where PLD expression and PLD activity are high. This implied that PLD activity or components of PLD signalling could be targeted to kill cancer cells that exhibit elevated PLD activity (Fiucci et al., 2000). However it would be interesting to determine 1) the « chemosensitivity status » of these models and 2) whether, and how far, the agents used to target and to inhibit PLD will or not induce the overexpression of *MDR-1*. It can thus be proposed that excessive care should be taken in considering these agents, *i.e.* they should be selected as not being *MDR-1* substrates or inducers.

In the past years, several works have dealt with the transport of glycerophospholipids, sphingolipids and their analogs by P-gp. A variety of short-chain lipid analogs were found to be expelled from cells by P-gp (Foster et al., 2006; Van Helvoort et al., 1996). Among the endogenous lipids, the short-chain PC-PAF (PC-Platelet Activating Factor) as well as PE and PC are P-gp substrates (Bosch et al., 1997; Ernest et al., 1999). However, due to its low substrate specificity, it is intriguing to imagine an involvement of P-gp in the transverse

distribution of endogenous lipids in the plasma membrane and it is hence unlikely that changes in PC concentration may modify some direct biochemical properties of P-gp. On the other hand, it was shown that the membrane PC/PE ratio may interact with the binding affinities of drugs to P-gp. Several drugs which are amphiphilic compounds appear to have their activities depending on their ability to compete with phospholipids at the drug binding sites within the P-gp molecule (Raggers et al., 2000). Lipids (and particularly PC) that interact weakly with P-gp may be more easily displaced, giving higher affinities for binding of drugs. On the contrary, tight-binding lipids (e.g. PE) may be more difficult to displace, resulting in lower drug-binding affinity. Thus, not only does Cbl activate PLD and repress *MDR-1* gene but it should also potentiate the action (by increasing the PC/PE ratio) of other amphiphilic drugs such as doxorubicin (Pajeva et al., 2004). Further experiments should now be designed to investigate this hypothesis.

Many cancer cells are shown to be methionine-dependent, leading to develop strategies to lower circulating levels of methionine in order to limit cancer growth (Cavuoto et al., 2012), especially in combination with anticancer drugs. We could hypothesize that lowering methionine levels should increase intracellular activity of methionine synthase as an adaptative reaction. We previously showed that Cbl activates methionine synthase and potentiates cytotoxicity induced by vinblastine (Marguerite et al., 2007). It would be interesting to determine whether, and how far, combinations of methionine starvation, cobalamin and/or oleic acid and drugs may have clinical benefit in cancer therapy. There are currently some confusing data about effects of Cbl in combinational therapy in cancer. Food supplementation with folic acid, L-Methyltetrahydrofolate and Cbl was shown to be associated with metabolism of prostate cancer cells and with lower efficacy of the P-gp substrate docetaxel (Tisman, et al., 2011). However, these studies deal with prostate cancer cells, highly expressing MRP1 (Zalcberg et al., 2000). Furthermore, a recent work

demonstrates a possible involvement of folic acid in prostate cancer (Wien et al., 2012) but not in any other cancer type. In these studies, the treatment breakdown effects can be attributed to folic acid but not to Cbl. Another group (Jiralerspong et al., 2009) showed that patients with both cancer and Mellitus diabetes undergo better pathological response to neoadjuvant chemotherapy. These patients were receiving the antidiabetic agent Metformin known to lead to Cbl deficiency and thus are assumed to also receive high doses of Cbl. It would be interesting to determine in this study, whether correlation can be made between Cbl levels and efficacy of chemotherapy.

Taken together these data suggest (Fig. 6) that, in HepG2 cells, Cbl represses *MDR-1* gene expression through activation of the methionine cycle, generation of PC by PEMT, and PLD activation. One can assume that PA may then interact with intracellular receptors that will lead to *MDR-1* gene repression. Many intracellular targets of PA have been identified, such as the ras (rat sarcoma) /raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) /MEK (Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase) /Erk (extracellular signal-regulated kinase) pathway, Akt (**Protein** Kinase B), mTOR (mammalian target of rapamycin) or PKC (protein kinase C) (Exton, 1997; Wang et al., 2006). Further study is now necessary to elucidate how PLD activation triggers *MDR-1* gene repression.

Funding

This work was granted by the “Ligue contre le Cancer (LNC), Comité Meurthe et Moselle”. Véronique Marguerite and Effrosyni Gkikopoulou were also supported by LNC studentships.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Claude Gallabert and Jacqueline Carrère (Hôpital Rénée Sabran, Giens, France) for their help in phospholipid analysis and determination.

References

- Akesson B, Fehling C, Jägerstad M. Effect of vitamin B12 deficiency on phosphatidylethanolamine methylation in rat liver. *Br J Nutr* 1978;40:521-27.
- Arias IM, Gatmaitan Z, Mazzanti R, Shu H, Kumamoto Y. Structure and function of P-glycoprotein in the normal liver and intestine. *Princess Takamatsu Symp* 1990;21:229-39
- Banerjee RV, Matthews RG. Cobalamin-dependent methionine synthase. *FASEB J* 1990;4: 1450–9.
- Beedholm-Ebsen R, van de Wetering K, Hardlei T, Nexø E, Borst P, Moestrup SK. Identification of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) as a molecular gate for cellular export of cobalamin. *Blood* 2010;115: 1632-1639.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-17.
- Bosch I, Dunussi-Joannopoulos K, Wu RL, Furlong ST, Croop J. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 1997;36:5685-94.
- Carnero A, Cuadrado A, del Peso L, Lacal JC. Activation of type D phospholipase by serum stimulation and ras-induced transformation in NIH3T3 cells. *Oncogene* 1994;9:1387-95.

Publications

- Cavuoto P, Fenech MF. A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treat Rev* 2012;38:726-36.
- Chen PS, Toribara TY, Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal Chem* 1956;28:1756-58.
- Czarny M, Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J Biol Chem* 1999;274:2717-24.
- Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res* 2001;42:1007-17.
- Dobrzynska I, Szachowicz-Petelska B, Sulkowski S, Figaszewski Z. Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2005;276:113-19.
- Ella KM, Meier GP, Bradshaw CD, Huffman KM, Spivey EC, Meier KE. A fluorescent assay for agonist-activated phospholipase D in mammalian cell extracts. *Anal Biochem* 1994;218:136-42.
- Ernest S, Bello-Reuss E. Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2306-13.
- Exton JH. Cell signalling through guanine-nucleotide-binding regulatory proteins (G proteins) and phospholipases. *Eur J Biochem* 1997;243:10-20.
- Exton JH. Phospholipase D-structure, regulation and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2002;144:1-94.
- Fiucci G, Czarny M, Lavie Y, Zhao D, Berse B, Blusztajn JK, Liscovitch M. Changes in phospholipase D isoform activity and expression in multidrug-resistant human cancer cells. *Int J Cancer* 2000;85:882-88.
- Foster DA. Targeting Phospholipase D-mediated Survival Signals in Cancer. *Curr Signal Transd T* 2006;1:295-303.

- Foster DA, Xu L. Phospholipase D in Cell Proliferation and Cancer. *Mol Cancer Res* 2003;1:789-800.
- Frankel P, Ramos M, Flom J, Bychenok S, Joseph T, Kerkhoff E, Rapp UR, Feig LA, Foster DA. Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:502-07.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
- Jacobs R, Stead L, Devlin C, Tabas I, Brosnan M, Brosnan J, and Vance D. Physiological Regulation of Phospholipid Methylation Alters Plasma Homocysteine in Mice. *J Biol Chem* 2005 ;280 : 28299–28305.
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and Pathologic Complete Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Diabetic Patients With Breast Cancer *J Clin Oncol* 2009 ;27:3297-3302.
- Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. Upregulation of caveolin in multidrug resistant cancer cells: functional implications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:317-23.
- Li G, Chen X, Wang Q, Xu Z, Zhang W, Ye L. The roles of four multi-drug resistance proteins in hepatocellular carcinoma multidrug resistance. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007;27:173-5.
- Marguerite V, Beri-Dexheimer M, Ortiou S, Guéant JL, Merten M. Cobalamin potentializes vinblastine cytotoxicity through downregulation of *MDR-1* gene expression in HepG2 cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:967-976.
- Min DS, Kwon TK, Park WS, Chang JS, Park SK, Ahn BH, Ryoo ZY, Lee YH, Lee YS, Rhie DJ, Yoon SH, Hahn SJ, Kim MS, Jo YH. Neoplastic transformation and tumorigenesis associated with overexpression of phospholipase D isozymes in cultured murine fibroblasts. *Carcinogenesis* 2001;22:1641-1647

Publications

- Ortiou S, Alberto JM, Guéant JL, Merten M. Homocysteine Increases Methionine Synthase mRNA Level in Caco-2 Cells. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:407-414.
- Pajeva I, Todorov DK, Seydel J. Membrane effects of the antitumor drugs doxorubicin and thaliblastine: comparison to multidrug resistance modulators verapamil and trans-flupentixol. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:243-50.
- Pellanda H, Namour F, Fofou-Caillierez M, Bressenot A, Alberto JM, Chéry C, Ayav A, Bronowicki JP, Guéant JL, Forges T. A splicing variant leads to complete loss of function of betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:385-92.
- Raggers RJ, Pomorski T, Holthuis JC, Kalin N, van Meer G. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* 2000;1:226-34.
- Rouser G, Fkeischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970;5:494-96.
- Scotto KW, Johnson RA. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target. *Mol Interv* 2001;1:117-25.
- Song JG, Pfeffer LM, Foster DA. v-Src increases diacylglycerol levels via a type D phospholipase-mediated hydrolysis of phosphatidylcholine. *Mol Cell Biol* 1991;11 :4903-8.
- Tisman G, Garcia A. Control of prostate cancer associated with withdrawal of a supplement containing folic acid, L-methyltetrahydrofolate and vitamin B12: a case Report. *JMCR* 2011;5:413-19.
- Toohy JJ. Vitamin B12 and methionine synthesis: a critical review. Is nature's most beautiful cofactor misunderstood? *Biofactors* 2006;26:45-57.

- Van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P, van Meer G. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 1996;87:507-17.
- Wang X, Devaiah SP, Zhang W, Welte R. Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 2006;45:250-78.
- Welsh CJ, Yeh GC, Phang JM. Increased phospholipase D activity in multidrug resistant breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:211-17.
- Wien TN, Pike E, Wisløff T, Staff A, Smeland S, Klemp M. Cancer risk with folic acid supplements: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2012;2:e000653.
- Yang SF, Freer S, Benson AA. Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J Biol Chem* 1967;242:477-84.
- Zalcberg J, Hu XF, Slater A, Parisot J, El-Osta S, Kantharidis P, Chou ST, Parkin JD. MRP1 not MDR1 gene expression is the predominant mechanism of acquired multidrug resistance in two prostate carcinoma cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000;3:66-75.
- Zhong M, Shen Y, Zheng Y, Joseph T, Jackson D, Foster DA. Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;302:615-19.

Figures

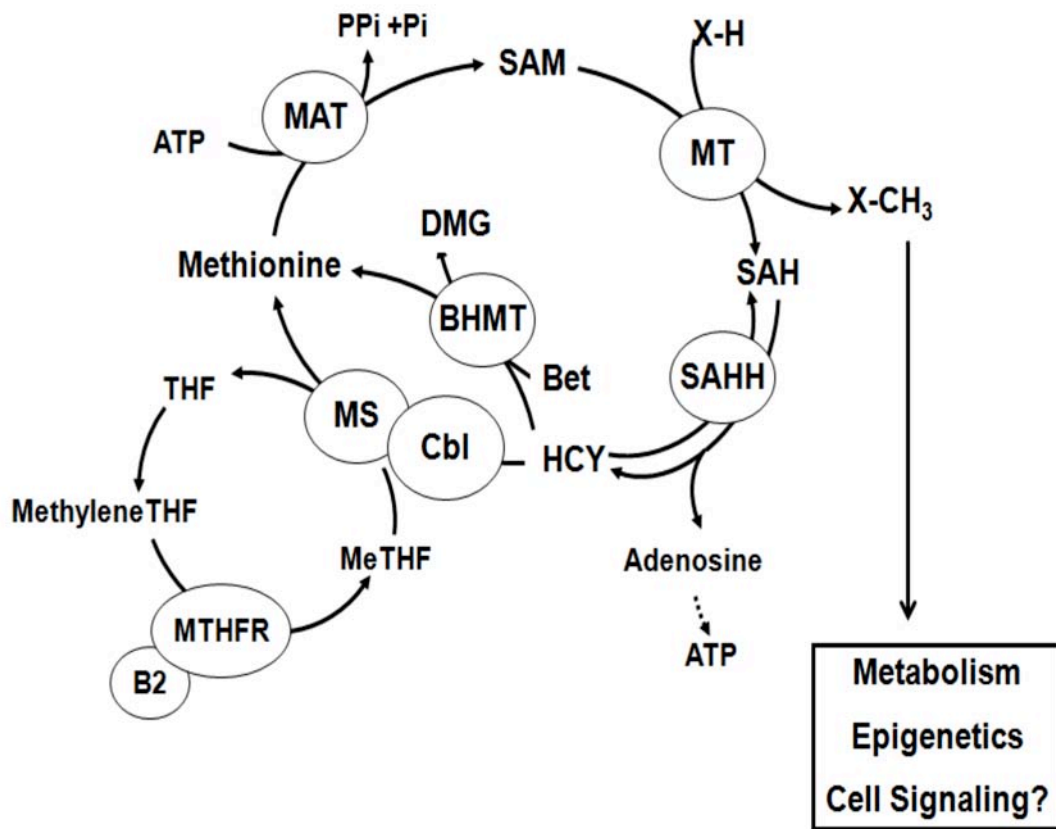


Fig.1. The methionine cycle. Methionine adenosyl transferase (MAT) metabolizes the formation of S-adenosylmethionine (SAM), which is the main intracellular methyl donor. Methyl transferases (MT) are able to use SAM and to methylate the acceptor X-H to form X-CH₃. The resulting S-adenosyl-homocysteine (SAH) is reversibly cleaved into adenosine and homocysteine (Hcy) by S-adenosyl-homocysteine-hydrolase (SAHH). Homocysteine (Hcy) is either remethylated by betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT), not functional in HepG2 cells, or remethylated by methionine synthase (MS). Then, methionine returns back to the S-adenosylmethionine cycle. Cobalamin (Cbl), as an essential cofactor of MS, is a limiting determinant of methionine cycle activity and thus of the intracellular methylation reactions. Methyltetrahydrofolate (MeTHF), Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR),

Methylenetetrahydrofolate (MethyleneTHF), Tetrahydrofolate (THF), Betaine (Bet), Dimethylglycine (DMG), Substrate to be methylated (X-H), Methylated substrate (X-CH₃).

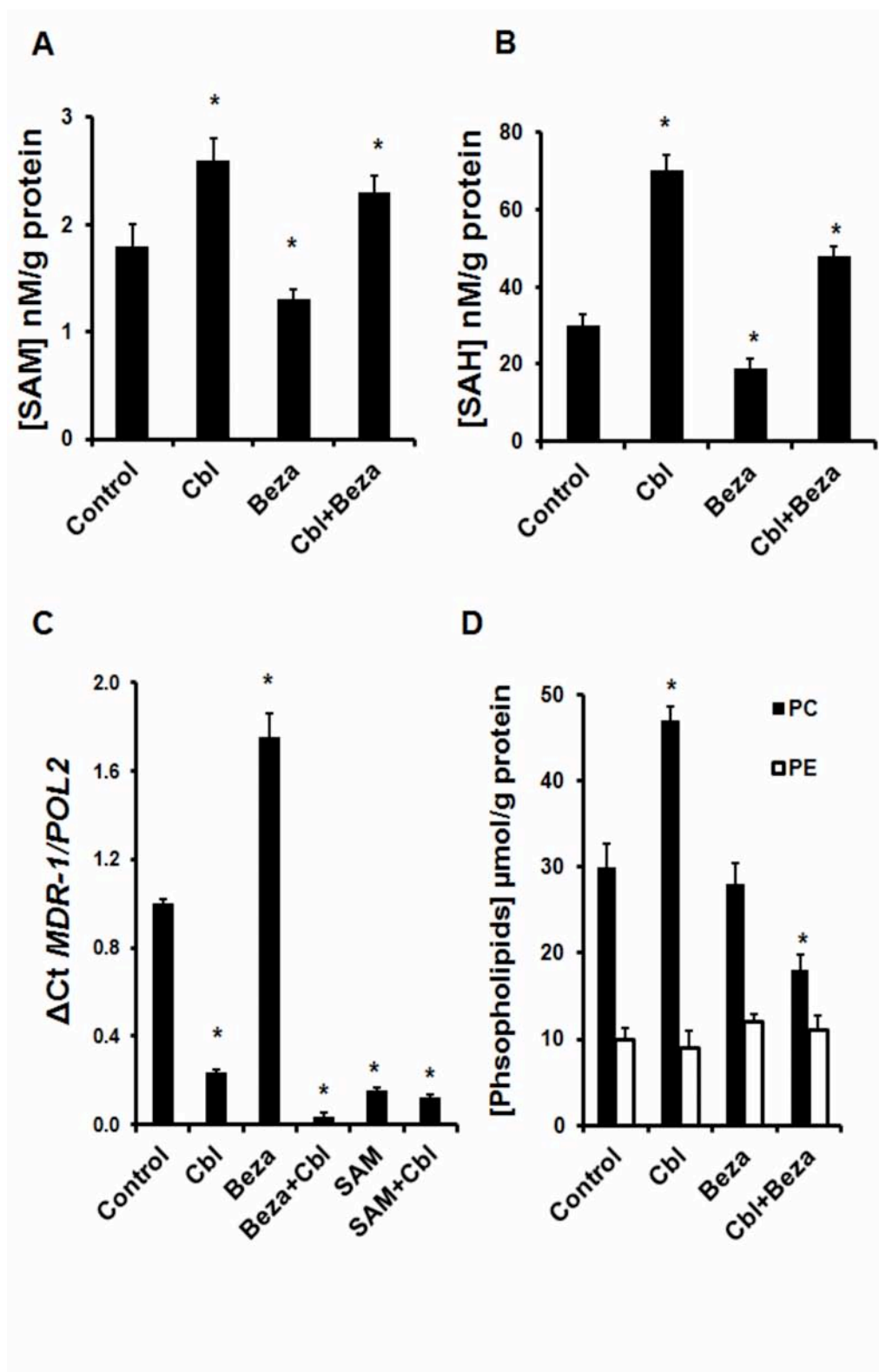


Fig. 2. Involvement of PEMT in methionine cycle and *MDR-1* gene expression. **A and B.** Cellular SAM and SAH content of HepG2 cells. Cells were incubated for 24 h with either 100 nM Cobalamin (Cbl), 10 μ M Beza or a mixture of both (Cbl+Beza) and compared to untreated cells (Control). Cells were scraped off and the centrifuged homogenates were assayed by HPLC for their SAM (**A**) or SAH (**B**) content. Here the data present the mean values $\pm$ standard deviation of three independent experiments which were done in triplicates. **C.** *MDR-1* gene expression in the human HepG2 cell line. Total RNA (1 μ g) was amplified with *MDR-1* and *POL2* primers. Products were quantified using quantitative RT-PCR. Lane 1 : untreated cells (Control); lane 2 : cells incubated with 100 nM Cbl; lane 3 : cells incubated with 10 μ M Beza; lane 4 : cells incubated with mixture of 10 μ M Beza and 100 nM Cbl (Beza+Cbl); lane 5 : cells incubated with 75 μ M SAM (SAM); lane 6 : cells incubated with a mixture of 75 μ M SAM and 100 nM Cbl (SAM + Cbl). The Δ Ct of *MDR1/POL2* is represented for every condition. **D.** Effects of Cbl and Beza on PE and PC content of HepG2 cells. Cells were cultured until confluency and incubated for 24 h with 100 nM Cobalamin (Cbl), 10 μ M Beza (Beza) or a mixture of 100 nM Cbl and 10 μ M Beza (Cbl+Beza) and compared to untreated cells (Control). PC (dark bars) and PE (light bars) were assayed on cell lysates by thin layer chromatography. Mean values $\pm$ standard deviation of three independent experiments are represented.

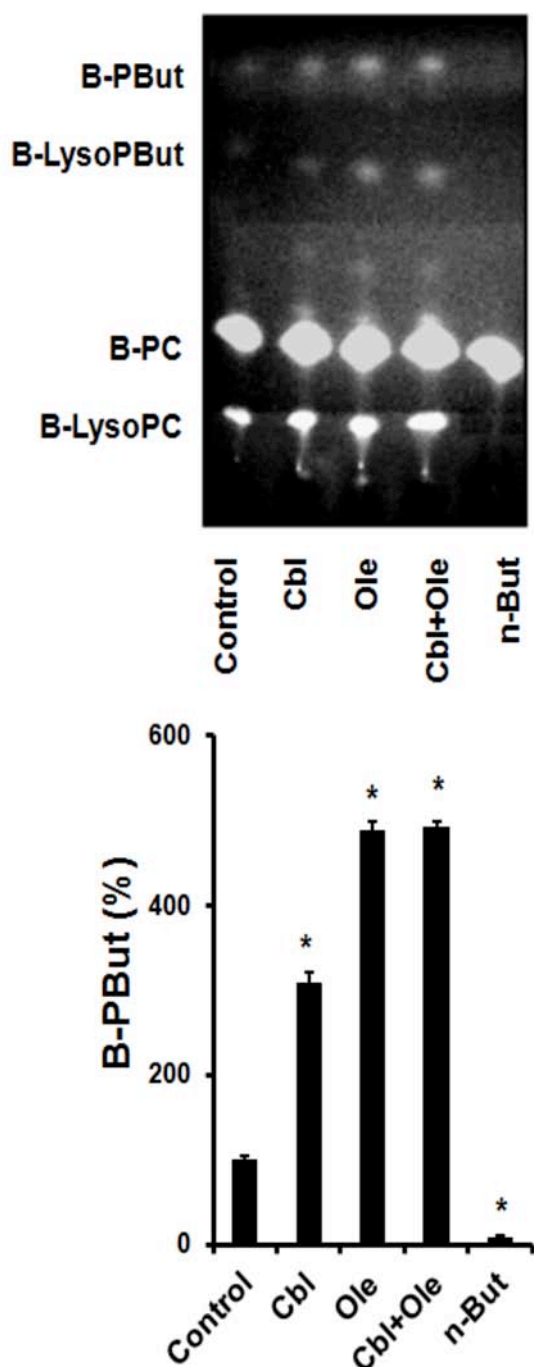


Fig. 3. Phospholipase D activity in HepG2 cells. Cells were first incubated for 24 hours with either 100 nM Cbl, 135 mM n-But, 20 μ M Oleic acid or a mixture of 100 nM Cbl and 20 μ M Oleic acid and then lysed. Lysates were incubated with B-PC and the fluorescent products were submitted to TLC, imaged and numerized by image J 1.43u software. Products shown

are B-PBut, (BODIPY-phosphatidylbutanol); B-LysoPBut, (BODIPY-Lysophosphatidylbutanol); B-PC, (BODIPY-Phosphatidylcholine: substrate); B-LysoPC, (BODIPY-Lysophosphatidylcholine). B-PBut spots representing PLD activity were quantified and presented as an histogram.

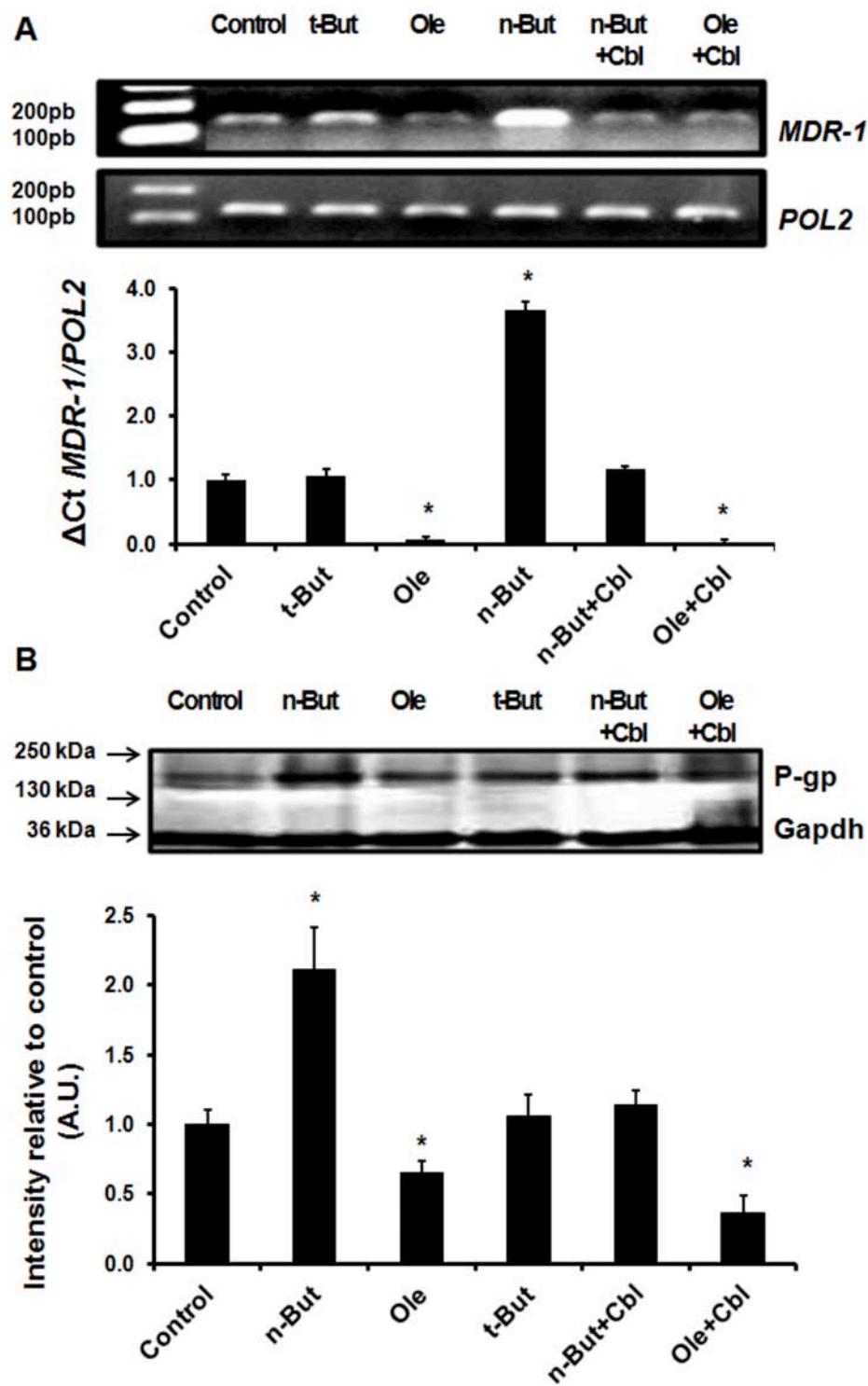


Fig. 4. PLD activity modulates *MDR-1* expression. **A.** *MDR-1* gene expression by RT-PCR in the human HepG2 cell line. Total RNA (1 µg) was amplified with *MDR-1* and *POL2* primers. RT-PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis and quantified using quantitative RT-PCR. Lane 1 : untreated cells (Control); lane 2 : cells incubated with 135 mM tert-Butanol (t-But); lane 3 : cells incubated with 20 µM Oleic acid (Ole); lane 4 : cells incubated with 135 mM n-But (n-But); lane 5 : cells incubated with a mixture of both 135 mM n-But and 100 nM Cbl (n-But + Cbl); lane 6 : cells incubated with both 20 µM Oleic acid and 100 nM Cbl (Ole + Cbl). **B.** Western blotting analysis of P-gp in HepG2 cells. Immunoblot revealed using chemiluminescence and the mouse monoclonal [C219] antibody. Immunoblots were numerized using the image J 1.43u software and normalized using Gapdh as reference protein. Results were expressed as intensity relative to Control condition to which a value of 1 has been attributed. Lane 1 : untreated cells (Control) ; lane 2 : cells incubated with 135 mM n-But (n-But); lane 3 : cells incubated with 20 µM Oleic acid (Ole); lane 4 cells incubated with 135 mM tert-Butanol (t-But); lane 5 : cells incubated with a mixture of both 135 mM n-But and 100 nM Cbl (n-But + Cbl); lane 6 : cells incubated with both 20 µM Oleic acid and 100 nM Cbl (Ole + Cbl).

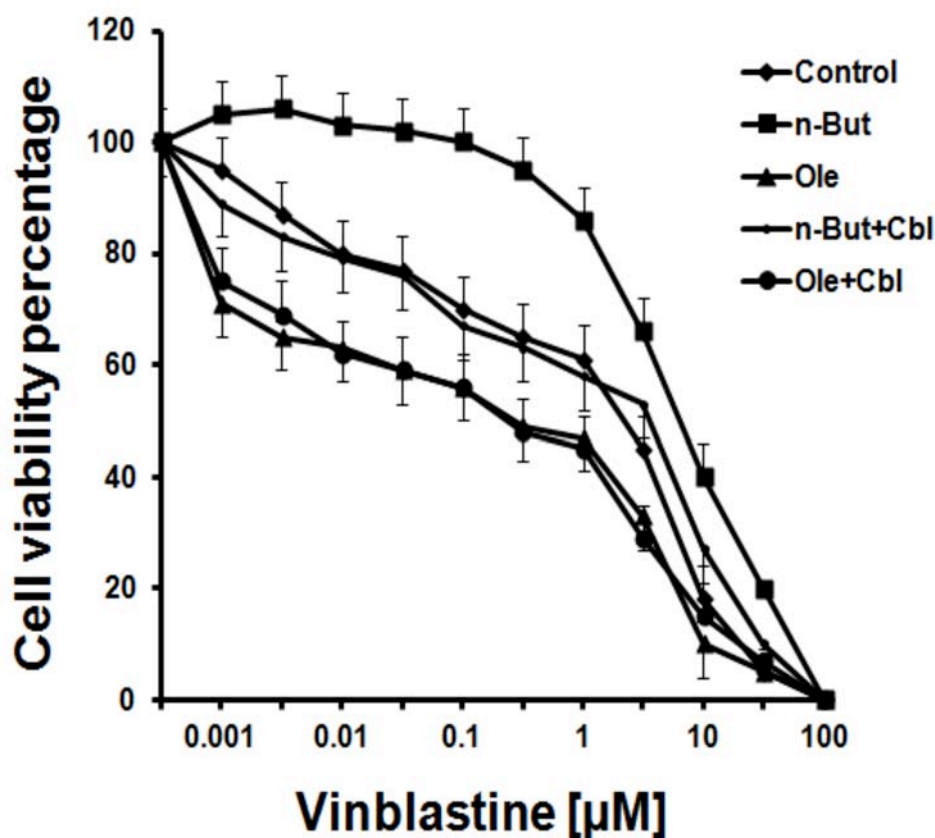


Fig. 5. Chemosensitivity of HepG2 cells was determined by MTT assay. Increasing doses of vinblastine were added from 1 nM to 100 μ M to cells incubated with 135 mM n-But (dark squares), with 20 μ M of Oleic acid (dark triangles), with 135 mM n-But associated with 100nM Cbl (small dark circles) or 20 μ M of Oleic acid associated with 100nM Cbl (dark circles) and compared to Control untreated cells (dark diamond). The data present the mean values $\pm$ standard deviation of three independent experiments which were done in octaplates.

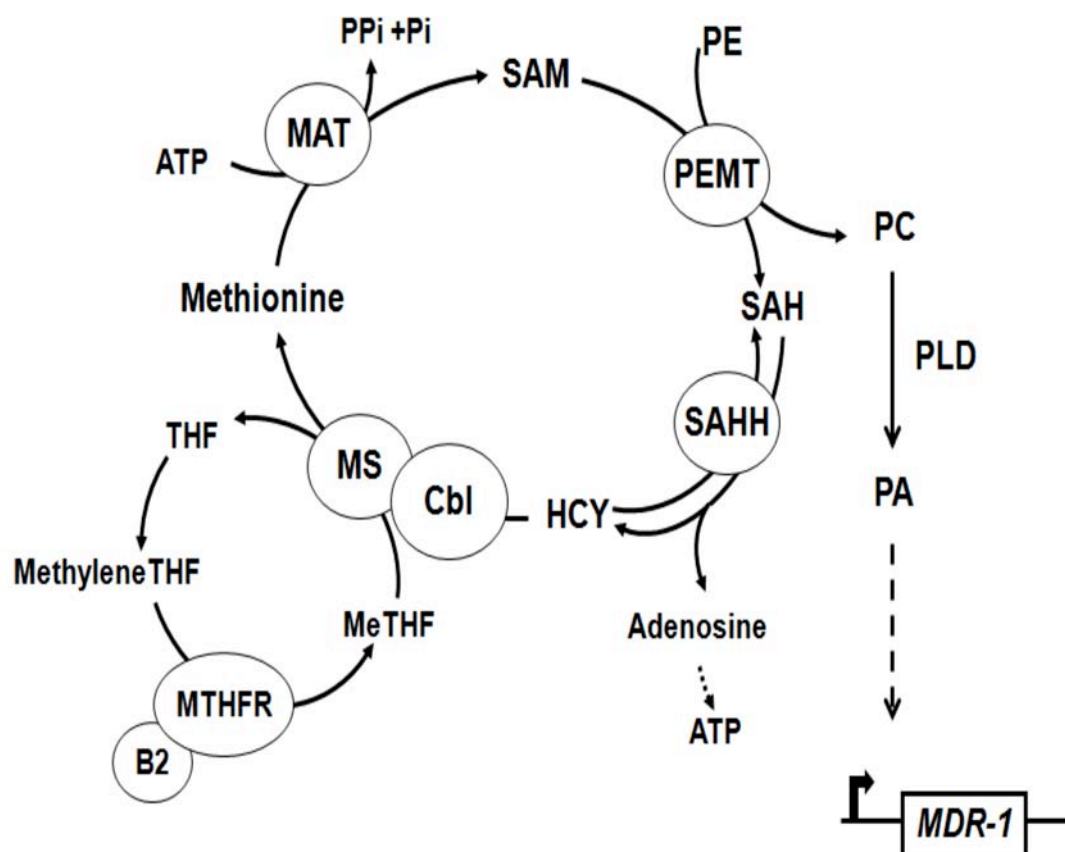


Fig. 6.. Hypothesis presenting possible relationship between Cbl and *MDR-1* gene expression. Cbl activates the methionne cycle leading to an increase in SAM amounts, an increase in phosphatidylethanolamine methyl transferase (PEMT) activity and thus in increased phosphatidylcholine (PC) cell content using phosphatidylethanolamine (PE). The addition of Cbl also triggers increased activity of phospholipase D (PLD), which uses PC as a substrate. PLD generates phosphatidic acid (PA) which in turn downregulates *MDR-1* gene expression through yet unknown mechanisms. Methionine adenosyl transferase (MAT), S-adenosylmethionine (SAM), S-adenosyl-homocysteine (SAH), Homocysteine (Hcy), S-adenosyl-homocysteine-hydrolase (SAHH), Methionine synthase (MS), Cobalamin (Cbl), *Multidrug resistance-1* (*MDR-1*), Methyltetrahydrofolate (MeTHF), Methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR), Methyltetrahydrofolate (MethyleneTHF), Tetrahydrofolate (THF).

Voies de signalisation cobalamine-dépendantes de l'expression du gène *MDR-1*. Une cible pharmacologique nouvelle pour la chimiothérapie ?

Contexte: La résistance aux agents anti-cancéreux souvent observée en chimiothérapie s'accompagne d'une augmentation de l'expression des gènes tels que *MDR-1*, gérée en partie par des réactions de méthylation cellulaire (dépendantes du métabolisme de la méthionine). Malheureusement, la physiologie des réactions de méthylation régulant l'expression de *MDR-1* est insuffisamment connue. La méthionine synthase est l'enzyme clé du cycle métabolique de la méthionine et possède comme cofacteur la cobalamine (vitamine B12), suggérant un rôle crucial du couple cobalamine / méthionine synthase dans les cellules cancéreuses et dans la survenue de la chimio-résistance par l'intermédiaire de la méthylation. Nous avons trouvé que l'ajout de cobalamine à des cellules d'adénocarcinome hépatique conduisait à une répression du gène *MDR-1* qui ne passe pas par la méthylation du promoteur. **Objectif :** Notre objectif est d'explorer et d'étudier les voies métaboliques situées entre le cycle de la méthionine et l'expression du gène *MDR-1*. **Méthodes :** Des techniques chromatographiques, électrophorétiques, de culture cellulaire, des techniques de pharmacotoxicologie et d'expression génique sont utilisées sur la lignée d'hépatocarcinome humain HepG2. **Résultats :** La répression cobalamine-dépendante du gène *MDR-1* est associée à une activation de la PLD, une diminution du facteur de signalisation Akt ainsi qu'à une inhibition de Cox2. Les voies semblent être impliquées de manière complexe. Le ciblage pharmacologique de ces voies semble potentialiser l'effet d'agents utilisés en chimiothérapie. **Conclusion/Perspectives :** Cette étude devrait permettre 1) de mieux comprendre des mécanismes expliquant comment certains médicaments anticancéreux deviennent inactifs (Chimiorésistance) 2) de déterminer des paramètres d'optimisation de l'utilisation de ces anticancéreux en relation avec l'expression de *MDR-1* elle-même en relation avec le statut vitaminique B 3) de déterminer les impacts de facteurs nutritionnels (cobalamine) dans l'expression de *MDR-1* et 4) peut être d'orienter la recherche en chimiothérapie vers de nouvelles voies thérapeutiques. **Mots clés:** Multi-drogue résistance, vitamine B12, phospholipase D, Akt, cyclooxygénase 2

Repression cobalamin-dependent signaling pathways of *MDR-1* gene: A new pharmacological target for chemotherapy?

Background: A key factor of chemioresistance is an increased expression of *MDR-1* gene, partly controlled by cellular methylation reactions. Until now, the physiology of these reactions is not clearly known. The main intracellular metabolic pathway, generating methyl donors, is the methionine cycle, the activity of which is strongly depending on B-group vitamins (B12, B9). Thus, *MDR-1* gene expression may be controlled by the activity of the methionine cycle and consequently presence of these vitamins. **Aim:** The aim of this study is to determine if, and to elucidate how, the methionine cycle influences the *MDR-1* gene expression. **Methods:** Chromatography, pharmacotoxicology, cell culture techniques, gene and protein expression studies have been used on the human hepatocarcinoma cell line HepG2. **Results:** We showed that cobalamin-induced *MDR-1* gene repression was associated with phospholipase D activation, Akt phosphorylation, and Cox-2 co-repression in a complex and intricate manner. We may suggest that targeting these pathways could potentiate chemotherapy. **Discussion/Conclusion :** This work should allow 1) a better understanding of mechanisms explaining why some anticancer agents may become inactive, 2) to optimize utilisation of these agents in relationship with *MDR-1* gene expression and the B vitamin status, 3) to evaluate impacts of nutritional factors (cobalamine) in *MDR-1* gene expression and 4) probably develop possible ways to improve chemotherapy. **Key words:** Multidrug resistance, vitamin B12, phospholipase D, Akt, cyclooxygenase 2