



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>

UNIVERSITE PAUL VERLAINE-METZ
UFR SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES
ECOLE DOCTORALE
« BIOLOGIE, SANTE, ENVIRONNEMENT »

THÈSE

Soutenue publiquement

Le 8 novembre 2011

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE-METZ

Mention : Sciences de la vie et de la Santé

Par

Adeline BEILLEROT

*Implication du système thiorédoxine dans la
régulation des phosphatases CDC25 dans des
cellules de cancer du sein en condition de
stress oxydant*

JURY

RAPPORTEURS

Karl-Josef Dietz	Professeur	Université de Bielefeld
Norbert Latruffe	Professeur	Université de Bourgogne

EXAMINATEURS

Denyse Bagrel	Professeur	Directeur de thèse, Université Paul Verlaine-Metz
Phillipe Becuwe	Professeur	Université Henry Poincaré, Nancy I
Eric Battaglia	Docteur	Université Paul Verlaine-Metz

Remerciements

« Cherchons comme cherchent ceux qui doivent trouver et trouvons comme trouvent ceux qui doivent chercher encore. Car il est écrit : celui qui est arrivé au terme ne fait que commencer »

[Saint Augustin]

A ma Maman et mon Papa,

A mes petites sœurs, Sandrine, Tiphany, Aurélie

A Sarah,

Je vous dédie cette thèse.

Remerciements

Je remercie sincèrement le professeur Denyse BAGREL pour son accueil au sein du LIMBP. Au-delà de vos incontestables connaissances scientifiques, j'ai pu apprécier vos qualités humaines, notamment dans les moments les plus difficiles. Je vous remercie pour vos encouragements qui furent précieux au cours de cette thèse.

Je remercie vivement le Docteur Eric Battaglia pour son encadrement. Je te remercie pour nos échanges scientifiques enrichissants, pour tes conseils toujours avisés, pour tes idées et ton écoute vis-à-vis des miennes. Je te remercie pour le temps que tu as consacré à mon travail alors que rien ne t'y obligeait officiellement. Je te remercie également pour ton soutien moral et tes encouragements lorsqu'il a pu m'arriver d'être déçu.

Je remercie le professeur Phillippe Becuwe et son équipe pour leur accueil très chaleureux au sein de leur laboratoire et le travail réalisé dans le cadre de notre collaboration pour la mise au point de la lignée MCF7-MnSOD+. Je remercie également personnellement le professeur Becuwe pour avoir accepté de prendre part au jury qui évaluera ce travail.

Je remercie les professeurs Norbert Latruffe et Karl-Joseph Dietz pour avoir accepté d'être membres rapporteurs du jury qui évaluera ce travail.

Je remercie le docteur Aline Bennisroune et son stagiaire Clément Bojic pour leur soutien technique dans le cadre des expériences préliminaires évoquées dans le chapitre Perspectives. Aline, je te remercie également pour la relecture de ce manuscrit et ta gentillesse.

Je remercie très chaleureusement ma collègue Emilie Bana pour m'avoir permis de bénéficier de ses compétences en informatique qui me firent gagner un temps très précieux.

Je tiens à remercier ma collègue et amie Hélène Albert. Mon plus grand regret sera de ne plus travailler avec toi à l'avenir. Bien sur, je te remercie pour tes corrections orthographiques et notre collaboration dans le travail mais je te remercie surtout pour ton extrême gentillesse, pour nos échanges scientifiques et autres, pour ton humour et notre soutien mutuel. Je te souhaite le meilleur pour le futur.

Je remercie tout les autres membres du LIMBP, passé et présent, Elodie, Tzvetee, Stéphanie, Hervé et Sophie pour nos échanges scientifiques et nos bonnes parties de rigolade.

Je remercie mes anciens collègues de l'IUT pour leur incroyable bonne humeur. Il est impossible de stresser en votre compagnie !

Finalement, je remercie ma famille, mes amis (Sarah, Caroline, Maud, Stéphane, Candice, Sébastien, Greg, Olivier, Schmucker, Régis et tous les autres) et mon compagnon, Guillaume, pour leur amour et leur soutien inconditionnel qui me donne toujours envi de davantage me dépasser.

Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique (EA 3940) dans l'équipe de Biochimie sous la direction du Professeur Denyse BAGREL - Université Paul Verlaine-Metz, UFR Sciences et Technique, Campus Bridoux, rue du général Delestraint, 57070 Metz, France.

J'ai été bénéficiaire d'une allocation financée par la Ligue Contre Le Cancer (comité de Moselle, Meurthe et Moselle et Meuse) qui a également soutenu financièrement la réalisation de ce travail doctoral.

PUBLICATIONS DANS DES JOURNAUX INTERNATIONAUX A COMITE DE LECTURE :

Synthesis and protective effects of coumarone derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin

Beillerot A, Rodriguez JC, Kirsch G, Bagrel D

Bioorg Med Chem Letters, 2008, 18(3):1102-5

Protection of CDC25 phosphatases against oxidative stress in breast cancer cells: evaluation of the implication of the thioredoxin system

Beillerot A, Battaglia E, Bennisroune A, Bagrel D

Submitted to Free radical Journal

COMMUNICATIONS AFFICHÉES :

Synthesis and protective effects of new coumarinic analogs

Beillerot A, Rodriguez JC, Kirsch G, Bagrel D

1^{er} forum du Cancéropôle Grand Est, Vittel, France, 2007

Oxidative stress and breast cancer: thioredoxin system and CDC25 phosphatases involvement

Beillerot A, Battaglia E and Bagrel D

2^e forum du Cancéropôle Grand Est, Vittel, France, 2008

Regulation of CDC25 activity by the thioredoxin system during oxidative stress in breast cancer cells

Beillerot A, Battaglia E and Bagrel D

Oncotrans, Nancy, France, 2009

Implication du système thiorédoxine dans la régulation des phosphatases CDC25 dans des cellules de cancer du sein en condition de stress oxydant

Résumé :

De récentes études suggèrent que la régulation des phosphatases par le peroxyde d'hydrogène pourrait jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire. Dans les cellules cancéreuses qui possèdent un statut redox souvent pro-oxydant, ce mécanisme de régulation pourrait être crucial pour la prolifération tumorale. Les phosphatases CDC25 (A, B et C) sont des régulateurs de la progression du cycle cellulaire. Sohn et Rudolph ont montré que les CDC25B et C peuvent être inactivées par le peroxyde d'hydrogène et réactivées en présence du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (trx/trxR), *in vitro*. L'existence d'une telle régulation dans des cellules cancéreuses pourrait ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques puisqu'une inhibition des trxR ou des trx pourrait induire une inhibition des CDC25 et ainsi prévenir la croissance tumorale.

Après avoir vérifié que CDC25A était également sensible au peroxyde d'hydrogène et réactivable *in vitro* par le système trx/trxR, les effets du peroxyde d'hydrogène et de deux inhibiteurs du système trx/trxR, l'Auranofine et l'Acroléine, ont été testés sur des lignées d'adénocarcinome mammaire humain (MCF7 et MDA-MB 231). Ces deux lignées présentent des niveaux d'expression variables pour la trx1. Dans les deux types de cellules, H₂O₂ induit un arrêt du cycle cellulaire malgré l'absence d'inhibition totale des CDC25. La conservation de l'état de phosphorylation des CDK lors de ce traitement témoigne donc de l'existence d'un système protecteur efficace pour ces phosphatases. L'inhibition totale des trxR par l'Auranofine engendre des effets cytotoxiques et une production de peroxydes dans les deux lignées. Il en est de même pour les cellules MDA-MB 231 traitées par l'Acroléine alors que les cellules MCF7 sont totalement résistantes à cette molécule. Le traitement des cellules par l'Auranofine induit un stress oxydant modéré car il n'altère pas le taux intracellulaire de glutathion, n'induit pas d'oxydation des trx1 et ne modifie pas la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Toutefois, ce traitement induit des cassures de l'ADN qui peuvent expliquer la cytotoxicité de ce composé. L'Acroléine au contraire provoque, dans les cellules MDA-MB 231, une importante déplétion en glutathion associé à une oxydation majeure des trx1 et à un arrêt du cycle cellulaire. Ce dernier ne semble toutefois pas dû à une hyper-phosphorylation des CDK, ce qui suggère qu'une altération complète du système trx/trxR n'induit pas une inhibition totale des CDC25.

Afin d'apporter des éléments nouveaux pour la compréhension des mécanismes de régulation redox des CDC25 et du cycle cellulaire dans les cellules de cancer du sein, nous avons ensuite étudié les impacts d'une surexpression de la Mn-SOD dans les cellules MCF7 puisque ces dernières sous-expriment cette protéine par rapport aux cellules MDA-MB 231. Les résultats obtenus révèlent que la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et la phosphorylation des CDK ne sont pas sensibles à ce changement d'expression.

Dans ce travail nous avons donc pu mettre en évidence que le rôle des CDC25 dans la régulation du cycle cellulaire n'est pas dépendant de l'état de fonctionnalité du système trx/trxR ou du niveau d'expression des Mn-SOD mais qu'il existe un système protecteur puissant qui permet de maintenir au moins en partie l'activité de déphosphorylation des CDC25 en milieu pro-oxydant dans les cellules de cancer du sein.

Mots clefs : Cancer du sein, CDC25, système trx/trxR, régulation redox, stress oxydant

Involvement of thioredoxine system in CDC25 phosphatase regulation in breast cancer cells in oxidative stress condition

Abstract :

Recent studies suggest that the regulation of phosphatases by hydrogen peroxide may play an important role in cell signaling. In cancer cells, which often possess a pro-oxidative redox state, this regulation could be essential for tumor growth. CDC25 phosphatases (A, B and C) are key regulators of cell cycle progression. Sohn and Rudolph have shown that CDC25B and C are inactivated by hydrogen peroxide and reactivated by the thioredoxin/thioredoxin reductase system (trx/trxR), *in vitro*. Such regulation in cancer cells could open new therapeutic avenues since the inhibition of trxR or trx could induce a CDC25 inhibition and so prevent tumor cell multiplication.

After verifying that CDC25 activity is sensitive to H₂O₂ and could be restored by trx/trxR system *in vitro*, the effects of hydrogen peroxide and that of two trx/trxR inhibitors (Auranofin and Acrolein) was tested on human breast adenocarcinoma cells (MCF7 and MDA-MB 231). These two cell lines exhibit differential expression level for trx1. In both cell lines, H₂O₂ could induce a cell cycle arrest in spite of the lack of a full CDC25 inhibition. The maintenance of the CDK phosphorylation state suggests that an efficient protective system exists for these phosphatases. The total inhibition of trxR by Auranofin led to cytotoxic effects and peroxide production in both cell lines. Similar results were obtained for MDA-MB 231 cells treated with Acrolein while MCF7 cells were found to be resistant to this compound. Auranofin could trigger a moderate oxidative stress in treated cells without affecting intracellular GSH content, trx1 oxidation and cell cycle distribution. However, this treatment could trigger double-strand DNA breaks, which could explain the cytotoxicity of Auranofin. Conversely, Acrolein could provoke a strong GSH depletion associated with a full oxidation of trx1 and a cell cycle arrest in MDA-MB 231 cells. Nevertheless, this cell cycle disruption was not due to CDK hyper-phosphorylation, suggesting that a total inhibition of the trx/trxR system does not trigger a full CDC25 inhibition.

Furthermore, in order to bring additional knowledge about CDC25 and cell cycle oxidative regulation in breast cancer cells, we have studied the effects of the Mn-SOD over-expression in MCF7 cells. In this cell line, Mn-SOD expression level was found to be lower than in MDA-MB 231 cells. Our results showed that the cell cycle distribution and CDK phosphorylation are not affected by Mn-SOD over-expression.

In conclusion, we have shown in this work that the CDC25 function in cell cycle regulation is independent of both a functional trx/trxR system and Mn-SOD expression level but that, under pro-oxidative conditions, a potent protective system maintains at least partially CDC25 dephosphorylation activity in breast cancer cells.

Key words : Breast Cancer, CDC25, trx/trxR system, redox regulation, oxidative stress

Liste des abréviations

8OHdG :	8-hydroxy-désoxyguanosine
ADN :	acide désoxyribonucléique
AP-1 :	activator protein 1
APC :	anaphase promoting complex
ARE :	antioxidant response element
ASK1 :	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATM :	ataxia telangiectasia mutated
ATO :	arsenic trioxide
ATR :	ATM and Rad3 related
AW464 :	4-(benzothiazol-2-yl)-4-hydroxycyclohexa-2,5-dienone
Bcl2 :	B-cell lymphoma 2
CaBP1 :	calcium binding protein 1
CAK :	CDKs activating kinase
CaMK2 :	calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II
CBPs :	cysteine-based phosphatases
Cdc25 :	cell division cycle 25
CDK :	cyclin dependent kinase
Chk :	checkpoint Kinase
CLHP :	chromatographie liquide haute performance
CIP :	cocktail inhibiteur de protéase
CK1α :	casein kinase 1 α
CKII :	casein kinase II
CKIs :	CDK inhibitors
C-TAK1 :	Cdc Twenty-five C Associated Kinase 1
DCF :	2'7'dichlorofluorescéine
DMSO :	diméthylsulfoxyde
DSP :	dual-specificity phosphatases
DTNB :	5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid
DTNB :	acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque
DTT:	dithiothréitol
Dub3 :	enzyme de dé-ubiquitinylation 3
E.Coli :	Escherichia coli
EGF:	epidermal growth factor
ERdj5/JPDI :	J-domain-containing PDI-like protein
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
ERp72 :	endoplasmic reticulum protein 72
FITC:	fluorescein isothiocyanate
FAK :	focal adhesion kinase
Gpx :	glutathion peroxydase
GSH :	glutathion réduit
GSK-3b:	glycogen synthase kinase-3b

H₂DCFDA :	2',7'dichlorodihydrofluorescéine diacétate
IAP :	inhibitor of apoptosis
IP :	iodure de propidium
IPTG:	Isopropyl-thio-β-galactoside
IR :	radiation ionisante
JNK :	Jun N-terminal Kinase
LB amp :	LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline
LB :	Luria-Bertani
LMW-PTP :	PTP de faible poids moléculaire
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MAPKKK :	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MetSO :	méthionine sulfoxyde
MGd :	motexafin gadolinium
MK2 :	MAPKAP kinase-2
MPF:	M-phase promoting factor
MSR :	méthionines sulfoxyde réductases
NADPH:	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NES :	nuclear export signal
NFκB:	nuclear factor-kappa B
NLS :	nuclear localization signal
Nrf2:	NF-E2-related factor 2
OMF :	3-O-méthylfluorescéine
OMFP :	3-O-méthylfluorescéine phosphate
OPA :	l'ortho-phtalaldéhyde
p38SAPK :	p38 Stress Activated Protein Kinase
PDGF :	platelet-derived growth factor
PDI :	protéines disulfures isomérases
pEg3:	paternally-expressed gene 3
Plk :	polo kinase
PMSF:	phenyl methane sulphonyl fluoride
PNP :	p-nitrophénol
p-NPP :	p-nitrophényl phosphate
PRL-1 :	phosphatase of regenerating liver
Prx :	peroxyrédoxine
PTEN:	phosphatase and TENsin homolog
PTP1B :	protein tyrosine phosphatase 1B
PTPs :	protein tyrosine phosphatases
PX-12 :	1-methyl-propyl-2-imidazolyl disulfide
SAB :	sérum albumine bovine
SCF :	skp1/Cullin/F-box
SDS:	sodium dodécyl sulfate
SHP2:	SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2
SOD :	superoxyde dismutase
TBP-2:	thioredoxin binding protein 2

TBST:	tris buffer saline-Tween
TCEP :	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TMX :	transmembrane Trx-related protein
TNB :	acide 5-thio-2-nitrobenzoïque
TNFα :	tumor necrosis factor alpha
TRAF2 :	TNF receptor-associated factor 2
TRP14 :	14-kDa human thioredoxin (trx)-related protein
TRP32 :	32-kDa human thioredoxin (trx)-related protein
Trx :	thiorédoxine
TrxR :	thiorédoxine Réductase
UPR :	unfolded protein response
UV :	ultra- violet
VDUP-1:	vitamin D up-regulated protein 1
βTrCP :	β transducin repeat-containing protein

Table des matières

INTRODUCTION	13
I. CYCLE CELLULAIRE ET PHOSPHATASES CDC25.....	14
I.1. Le cycle cellulaire.....	14
I.2. Les phosphatases CDC25.....	16
I.2.1. Fonction	16
I.2.2. Structure	17
I.2.3. Mécanisme catalytique.....	19
I.2.4. Mécanismes de régulation des CDC25	20
I.2.4.1. Régulation de l'expression et de la localisation intracellulaire des CDC25	21
I.2.4.2. Séquestration et dégradation des CDC25 lors de dommages à l'ADN.....	22
I.2.4.3. Régulation de l'activité des CDC25.....	24
I.2.4.3.1. Régulation de l'activité CDC25 par phosphorylation	24
I.2.4.3.2. Régulation « redox » de l'activité CDC25	24
II. ERO ET SYSTEME THIOREDOXINE / THIOREDOXINE REDUCTASE	26
II.1. ERO et signalisation cellulaire.....	26
II.2. Le système thiorédoxine / thiorédoxine réductase (trx/trxR).....	31
II.2.1 Les thiorédoxines réductases	32
II.2.1.1 Structure et mécanisme d'action.....	32
II.2.1.2 Les substrats des trxR	34
II.2.2. Les thiorédoxines.....	36
II.2.2.1 Structure et mécanisme catalytique	36
II.2.2.2. Les fonctions des thiorédoxines.....	37
II.2.2.2.1. Rôle dans la synthèse d'ADN	38
II.2.2.2.2. Rôle antioxydant.....	38
II.2.2.2.3. Rôle dans le déroulement de l'apoptose	38
II.2.2.2.3.1. Rôle anti-apoptotique.....	39
II.2.2.2.3.2. Rôle pro-apoptotique	40
II.2.2.2.4. Rôle dans le déroulement des cascades de phosphorylation.....	41
II.2.3. Les défenses antioxydantes dépendantes du système trx/trxR	42
II.2.3.1. Les peroxyrédoxines	42
II.2.3.2. Les méthionine sulfoxyde réductases	43
II.2.4. Les inhibiteurs du système trx/trxR.....	44
II.2.4.1. Les inhibiteurs de thiorédoxine réductase.....	45
II.2.4.1.1. Composés dérivé du platine.....	45
II.2.4.1.2. Composés dérivés de l'or.....	45
II.2.4.1.3. Composés nitroaromatiques.....	47
II.2.4.1.4. L'arsenic trioxyde	48
II.2.4.1.5. Le motexafin gadolinium.....	48

II.2.4.1.6. Curcumine et flavonoïdes	49
II.2.4.2. Les inhibiteurs de thiorédoxine.....	50
II.2.4.2.1. 1-methyl-propyl-2-imidazolyl disulfide.....	50
II.2.4.2.2. 4-(benzothiazol-2-yl)-4-hydroxycyclohexa-2,5-dienone (AW464).....	51
II.2.4.3. Polluants environnementaux : Acroléine et Chrome hexavalent, deux inhibiteurs de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase	52
III. ERO, SYSTEME TRX/TRXR ET PHOSPHATASES CDC25 DANS LE CANCER..	53
III.1. Statut redox des cellules cancéreuses.....	53
III.2. Système thiorédoxine/thiorédoxine réductase et cancer	55
III.3. Phosphatases CDC25 et cancer	57
OBJECTIFS ET STRATEGIE	60
I. OBJECTIFS.....	61
II. STRATEGIE	62
RESULTATS ET DISCUSSION	64
I. MODULATION REDOX DE L'ACTIVITE CDC25 PAR LE PEROXYDE D'HYDROGENE.....	65
I.1. Modulation redox de l'activité CDC25 par H₂O₂ <i>in vitro</i>	65
I.1.1. Inhibition des phosphatases CDC25 par H ₂ O ₂	65
I.1.2. Réactivation de CDC25A par le TCEP et le système trx/trxr	65
I.2. Régulation de l'activité CDC25 par un apport exogène d'H₂O₂ dans des cellules d'adénocarcinome mammaire humain	67
I.2.1. Cytotoxicité du peroxyde d'hydrogène.....	67
I.2.2. Evaluation de la quantité d'ERO intracellulaires.....	69
I.2.3. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire	70
I.2.4. Etat redox des CDC25	73
I.2.5. Détermination indirecte de l'activité CDC25	74
II. ROLE DU SYSTEME TRX/TRXR DANS LA MODULATION REDOX DE L'ACTIVITE CDC25	75
II.1 Effets de l'inhibition de trxR par l'Auranofine sur l'activité CDC25	75
II.1.1. Cytotoxicité de l'Auranofine	76
II.1.2. Inhibition de l'activité trxR par l'Auranofine.....	77
II.1.3. Production d'ERO par l'Auranofine.....	78
II.1.4. Etat redox des thiorédoxines 1.....	79
II.1.5. Dosage intracellulaire du glutathion réduit	83
II.1.7. Dommage à l'ADN.....	87
II.1.8. Activité CDC25	88
II.1.9. Conclusion	90

II.2 Effets de l'inhibition de trxR et de trx par l'Acroléine sur l'activité CDC25	90
II.2.1. Cytotoxicité de l'Acroléine	91
II.2.2. Inhibition de l'activité enzymatique de trxR1 par l'Acroléine.....	92
II.2.3. Production d'ERO par l'Acroléine	93
II.2.4. Etat d'oxydation des thiorédoxines 1	94
II.2.5. Dosage intracellulaire du glutathion réduit	96
II.2.6. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire	97
II.2.7. Activité CDC25	99
II.2.8. Dommages à l'ADN.....	101
II.2.9. Conclusion	103
III. EFFET D'UNE SUREXPRESSON DE LA MNSOD SUR L'ACTIVITE CDC25 .	103
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	110
I. CONCLUSION.....	111
II. PERSPECTIVES.....	114
II.1. Altération moléculaire stable de l'expression de trx1 dans la lignée MCF7.....	114
II.2. Mise en évidence d'une interaction CDC25-trx	115
II.3. Intervention des peroxirédoxines et/ou de la sulfirédoxine dans la régulation redox de l'activité CDC25.....	116
MATERIEL ET METHODES.....	118
I. EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION GST-CDC25A, B ET C	119
I.1. Préparation de bactéries compétentes	120
I.2. Transformation de bactéries compétentes	120
I.3. Cultures bactériennes.....	120
I.3.1. Préculture	121
I.3.2. Culture d'expression	121
I.3.3. Extraction de la protéine de fusion GST-CDC25	121
I.3.4. Purification de la GST-CDC25	121
II. MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE CDC25	122
II.1. Mesure en colorimétrie.....	122
II.2. Mesure en spectrofluorimétrie à cuve.....	122
III. CULTURE CELLULAIRE.....	122
III.1. Lignées cellulaires.....	122
III.2. Conditions de culture	123
III.3. Entretien des cellules.....	123

III.4. Congélation et décongélation des cellules.....	123
III.5. Traitement et récupération des cellules en culture	124
III.6. Développement de modèles cellulaires transgéniques.....	124
III.6.1. Transfections stables	124
III.6.1.1. Etablissement d'une lignée MCF7 surexprimant la MnSOD	124
III.6.1.1.1. Protocole de transfection stable	125
III.6.1.1.2. Evaluation de l'efficacité de la transfection	126
II.6.1.1.2.1. Mise en évidence de la surexpression par immunoblotting	126
III.6.1.1.2.2. Evaluation de l'activité MnSOD	126
III.6.1.2. Etablissement d'une lignée MCF7 réprimant la thiorédoxine 1	127
III.6.1.2.1. Amplification et purification des vecteurs d'expression	127
III.6.1.2.1.1. Amplification des plasmides	127
III.6.1.2.1.2. Purification des plasmides	129
III.6.1.2.2. Transfection des plasmides dans les cellules MCF7	130
III.6.2. Transfection transitoire	130
III.6.2.1. Amplification et purification des vecteurs d'expression	130
III.6.2.2. Protocole de transfection transitoire	131
III.6.2.3. Evaluation de l'efficacité de la transfection	132
III.6.2.4. Mise en évidence de l'interaction trx1-CDC25	132
IV. EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE	133
V. EVALUATION DE LA QUANTITE RELATIVE D'ERO INTRACELLULAIRES	133
VI. ACTIVITE THIOREDOXINE REDUCTASE	134
VI.1. Préparation des échantillons.....	134
VI.2. Mesure	134
VII. MESURE DE L'ETAT D'OXYDATION INTRACELLULAIRE DE LA THIOREDOXINE 1	134
VII.1. Préparation des échantillons	134
VII.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant, non réducteur	135
VII.3. Immunodétection de la trx1	135
VIII. DOSAGE DU CONTENU INTRACELLULAIRE EN GLUTATHION REDUIT	136
IX. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE	137
X. IMMUNOFLUORESCENCE : DETECTION DES FOYERS γ-H2AX	138
XI. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOTTING	138
XI.1. Préparation des échantillons.....	138
XI.2. Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide, SDS-Page	139
XI.3. Immunodétection des protéines d'intérêts	139
XII. EVALUATION DE L'ACTIVITE CDC25 DANS LES CELLULES.....	141

XIII. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES	141
XIV. DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY MODIFIEE (ZAKIM).....	141
XV. ANALYSES STATISTIQUES	141
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	143
PUBLICATIONS	162

Liste des figures

Figure 1 : Régulation du cycle cellulaire par l'activation ou l'inhibition des complexes Cyclines / CDK (Aressy and Ducommun, 2008; Kurzawa and Morris, 2010).....	15
Figure 2 : Structure primaire générale des phosphatases CDC25 et modifications post-traductionnelles (Boutros, Dozier <i>et al.</i> , 2006).	18
Figure 3 : Structure tridimensionnelle de CDC25A (a) et B (b) déterminée par cristallographie aux rayons X (Park <i>et al.</i> , 2008).....	18
Figure 4 : Boucle de résidus clefs du site actif de CDC25B (Rudolph, 2005).....	19
Figure 5 : Mécanisme catalytique général des PTPs (Rudolph, 2007).	20
Figure 6 : Voies de régulation des phosphatases CDC25 en réponse à des altérations de l'ADN (Aressy and Ducommun, 2008).	23
Figure 7 : Cycle d'oxydation de la cystéine catalytique des phosphatases CDC25 (Sohn and Rudolph, 2003).....	25
Figure 8 : Formation et réduction d'un pont disulfure entre Cys 473 et Cys 426 chez CDC25B par l'action respective des ERO et du système Trx/TrxR (Sohn and Rudolph, 2003).	26
Figure 9 : Chaîne de formation des ERO à partir de l'oxygène moléculaire (Nordberg and Arner, 2001).	27
Figure 10 : Production intracellulaire du peroxyde d'hydrogène.	28
Figure 11 : Régulation redox des voies de signalisation <i>via</i> la modulation de l'activité des kinases et des phosphatases par H ₂ O ₂ (Rhee, 2006).	31
Figure 12 : Structure des trxR1 et trxR2 (Tonissen and Di Trapani, 2009).	33
Figure 13 : Structure tridimensionnelle homodimérique de trxR (Sandalova <i>et al.</i> , 2001).	33
Figure 14 : Cycle catalytique des trxR (Gromer <i>et al.</i> , 2004; Arner, 2009).....	34
Figure 15 : Structure des trx 1 et trx 2 (Tonissen and Di Trapani, 2009).	36
Figure 16 : Cycle catalytique des trx (Collet and Messens, 2010).....	37
Figure 17 : Rôle des trx dans l'apoptose à travers la régulation d'ASK1 (Nakamura, Hoshino <i>et al.</i> , 2009).....	40
Figure 18 : Intervention du système trx/trxR dans la réponse catalytique des peroxyrédoxines (Kang <i>et al.</i> , 2005).....	43

Figure 19 : Structure du cisplatine.	45
Figure 20 : Structure de l’Auranofine.	47
Figure 21 : Structure du CDNB.....	48
Figure 22 : Structure de l’arsenic trioxyde.....	48
Figure 23 : Structure du motexafin gadolinium.	49
Figure 24 : Structure de la curcumine (1) et de la myricétine (2) et de la quercétine (3).	50
Figure 25 : Structure du PX-12.	51
Figure 26 : Structure du AW464.	52
Figure 27 : Structure de l’Acroléine.....	52
Figure 28 : Cercle vicieux de la production d’ERO dans les cellules cancéreuses (Trachootham, Alexandre <i>et al.</i> , 2009).	54
Figure 29 : Surexpression des phosphatases CDC25 dans différents cancers humains (Boutros, Lobjois <i>et al.</i> , 2007; Wang, Trope <i>et al.</i> , 2010).	58
Figure 30 : Inhibition de l’activité phosphatase des protéines de fusion GST - CDC25A, B et C par le peroxyde d’hydrogène, <i>in vitro</i>	65
Figure 31 : Réversion de l’inhibition des protéines de fusion GST – CDC25A par le TCEP et le système trx/trxR, <i>in vitro</i>	66
Figure 32 : Niveau d’expression de la thiorédoxine 1 et de la thiorédoxine réductase 1 dans les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231.	67
Figure 33 : Evaluation de la cytotoxicité du peroxyde d’hydrogène sur des cellules MCF7 et MDA-MB 231 après 24 h de traitement.....	68
Figure 34 : Effet de H ₂ O ₂ sur les taux intracellulaires d’ERO et d’anion superoxyde dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.	69
Figure 35 : Effet de H ₂ O ₂ sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.	71
Figure 36 : Evolution du taux de cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) en phase G2-M au cours du temps lors d’un traitement par H ₂ O ₂	72
Figure 37 : Immuno-détections, en condition réductrice et non réductrice, des phosphatases CDC25A, B et C purifiées.....	73
Figure 38 : Effet de H ₂ O ₂ sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B).	75

Figure 39 : Evaluation de la cytotoxicité de l’Auranofine sur des cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	76
Figure 40 : Inhibition de l’activité trxR par l’Auranofine dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	77
Figure 41 : Production d’ERO dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 traitées par l’Auranofine.....	79
Figure 42 : Evaluation de l’état redox de la thiorédoxine purifiée d’ <i>E.Coli</i>	80
Figure 43 : Effet de l’Auranofine sur l’état redox des trx1 dans des cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	81
Figure 44 : Effet de l’Auranofine sur le contenu intracellulaire en glutathion réduit des cellules MCF7 (A) et des cellules MDA-MB 231 (B).....	84
Figure 45 : Effet de l’Auranofine sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	86
Figure 46 : Mise en évidence de la formation de foyers γ -H2AX dans les cellules MDA-MB 231 et MCF7 traitées par l’Auranofine.....	88
Figure 47 : Effet de l’Auranofine sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B).....	89
Figure 48 : Evaluation de la cytotoxicité de l’Acroléine sur les cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	91
Figure 49 : Inhibition de l’activité trxR par l’Acroléine dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	92
Figure 50 : Production d’ERO dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 traitées par l’Acroléine.....	94
Figure 51 : Effet de l’Acroléine sur l’état redox des trx1 des cellules MCF7 et MDA-MB 231.....	95
Figure 52 : Effet de l’Acroléine sur le contenu intracellulaire en glutathion réduit des cellules MCF7 (A) et des cellules MDA-MB 231 (B).....	96
Figure 53 : Effet de l’Acroléine sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.....	98
Figure 54 : Evolution du taux de cellules MDA-MB 231 en phase G2-M au cours du temps lors d’un traitement par l’Acroléine.....	99
Figure 55 : Effet de l’Acroléine sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MDA-MB 231.....	101

Figure 56 : Mise en évidence de la formation de foyers γ -H2AX dans les cellules MDA-MB 231 traitées par l'Acroléine.	102
Figure 57 : Niveau d'expression de trx 1, de trxR1 et de MnSOD et phosphorylation de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231.	105
Figure 58 : Niveau d'expression de la MnSOD dans des cellules MCF7 transfectées avec un vecteur d'expression pcDNA3.1+ contenant (MCF7-MnSOD+) ou non (MCF7-vecteur vide) l'ADNc de la Mn-SOD.	106
Figure 59 : Activité de la MnSOD dans les cellules MCF7 transfectées avec un vecteur d'expression pcDNA3.1+ contenant (MCF7-MnSOD+) ou non (MCF7-vecteur vide) l'ADNc de la Mn-SOD.	107
Figure 60 : Quantité relative d'anion superoxyde (A) et d'ERO (B) dans les cellules MCF7-néo et les cellules MCF7-MnSOD+.	108
Figure 61 : Effet d'une surexpression de la MnSOD sur la répartition des cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire.	109
Figure 62 : Effet d'une surexpression de la Mn-SOD sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7.	109
Figure 63 : Carte de restriction du plasmide pGEX-2T et caractéristiques principales du vecteur de protéine de fusion glutathion-S-transférase.	119
Figure 64 : Carte du vecteur plasmidique pcDNA3.1+, utilisé pour l'insertion de l'ADNc de la MnSOD.	126
Figure 65 : Séquence des shRNA dirigés contre la thiorédoxine 1, insérés dans le vecteur pLKO.1-puro.	128
Figure 66 : Carte du plasmide « pLKO.1-puro » porteur d'une séquence shRNA utilisée pour l'inhibition de l'expression de la thiorédoxine 1.	129
Figure 34 : Carte du plasmide « pEBG » permettant l'expression d'une protéine de fusion couplée à la GST.	131
Figure 67: Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.	140

INTRODUCTION

I. CYCLE CELLULAIRE ET PHOSPHATASES CDC25

I.1. Le cycle cellulaire

C'est en 1858 que le concept de la multiplication cellulaire par division est né, l'Allemand Rudolf Virchow (1821–1902) formulant alors le célèbre axiome : « toute cellule provient d'une cellule ». La croissance et la division cellulaire sont des processus essentiels à la survie d'un individu et à la propagation d'une espèce. Le cycle cellulaire correspond aux différentes étapes de la vie d'une cellule, de sa naissance après division de sa cellule mère jusqu'à sa propre division en deux cellules filles. Il comprend l'interphase et la phase mitotique. L'interphase constitue 90 % du cycle, elle comprend la phase G1 (*Gap 1*), la phase S et la phase G2 (*Gap 2*). La phase mitotique est encore appelée phase M. La phase G1 est une phase de croissance cellulaire et de préparation à la réplication de l'ADN, la phase S est une phase de synthèse d'ADN durant laquelle s'effectue la réplication de l'ADN et la phase G2 est une phase de croissance et de préparation à la mitose (**figure 1**) (Viallard *et al.*, 2001).

La progression du cycle cellulaire est régulée par l'activation séquentielle de kinases hétérodimériques appelées CDK pour « *cyclin-dependent kinases* » et la subséquente phosphorylation de leur substrat. Les CDK sont constituées d'une sous-unité sérine et thréonine kinase qui est activée par son association avec une sous-unité cycline régulatrice.

La progression à travers la phase G1 est prise en charge par les complexes CDK4/Cycline D et CDK6/Cycline D et la transition G1/S est assurée par le complexe CDK2/Cycline E. La progression à travers la phase S est dépendante de l'accumulation du complexe CDK2/Cycline A qui est essentiel pour la réplication de l'ADN. CDK2 et CDK1 participent toutes les deux à la transition G2/M avec les cyclines A et B respectivement alors que la progression de la phase M est assurée majoritairement par le complexe CDK1/Cycline B1, également appelé MPF pour « *Mitosis-Promoting Factor* » (**figure 1**) (Kiyokawa and Ray, 2008; Malumbres and Barbacid, 2009; Kurzawa and Morris, 2010).

L'entrée et la progression en phase G1 dépendent de facteurs mitogènes tels que les facteurs de croissance, les hormones, les signaux de contact entre cellules. En début de phase G1, il existe une « barrière » appelée « point de restriction ». Dans le cas d'une privation en facteurs de croissance, le cycle sera stoppé au niveau de ce point de restriction et les cellules passeront dans un état de quiescence nommé G₀. Ensuite, au cours de la progression du cycle, le passage d'une phase à l'autre est soumis à une régulation fine mettant en jeu des voies métaboliques capables d'arrêter le cycle. Ces passages régulés sont communément appelés

« points de contrôle ». Il existe trois points de contrôle qui interviennent respectivement à la transition G1/S, à la transition G2/M et à la transition métaphase/anaphase. Les paramètres évalués au niveau de ces points de régulation sont l'intégrité de l'ADN avant l'entrée en phase S, la fidélité de la réplication avant l'entrée en phase M et le bon positionnement du fuseau mitotique avant le déroulement de l'anaphase. En cas d'erreurs ou de dysfonctionnement, le cycle cellulaire est stoppé pour permettre la réparation des dommages (Vermeulen *et al.*, 2003).

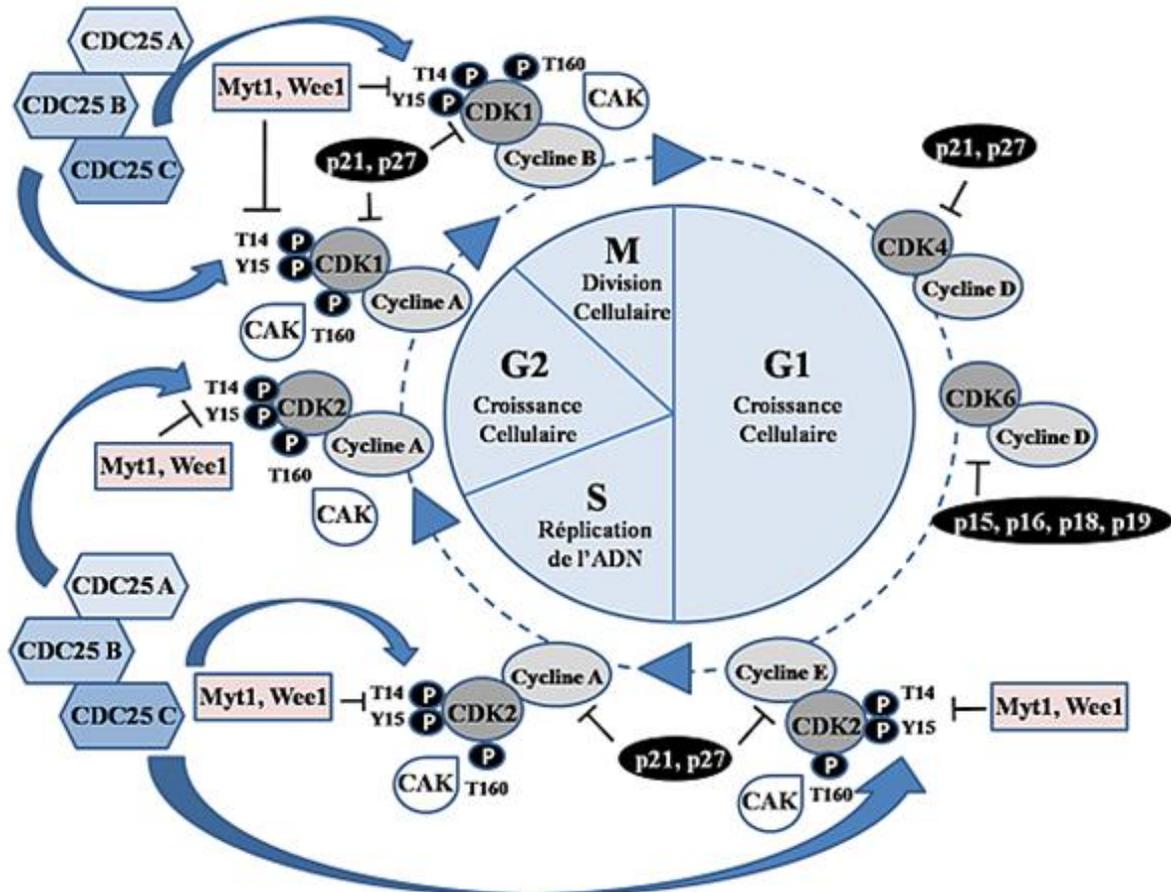


Figure 1 : Régulation du cycle cellulaire par l'activation ou l'inhibition des complexes Cyclines / CDK (Aressy and Ducommun, 2008; Kurzawa and Morris, 2010).

Afin de stopper le cycle ou au contraire de permettre sa progression, l'activité CDK est régulée par de nombreux mécanismes. D'une part, l'activité CDK est régulée négativement par des protéines appartenant à la famille KIP/CIP (p21, p27 et p57) et à la famille INK4 (p16, p15, p18 et p19), ces protéines s'associent physiquement avec les complexes CDK/Cycline pour inhiber leur activité. D'autre part, l'activité catalytique de la sous-unité CDK peut également être activée ou inactivée par phosphorylation en fonction de l'acide aminé considéré. La phosphorylation du résidu thréonine au niveau de la boucle T de chaque

CDK (Thr 161 de CDK1, Thr 160 de CDK2, Thr 172 de CDK4) par des kinases activatrices (CAK) comme CDK7/Cycline H et CAK1, est requise pour une activation totale. En effet, cette phosphorylation induit un changement conformationnel des CDK qui favorise leur liaison avec les cyclines. A l'inverse, la phosphorylation des résidus Tyr 15 des CDK1 et CDK2 et Tyr 17 de CDK4, situés dans le domaine de liaison à l'ATP, est inhibitrice pour l'activité CDK. La phosphorylation de ces résidus tyrosine ainsi que la phosphorylation de leur résidu thréonine adjacent (Thr14 pour CDK1 et CDK2) est catalysée par les protéines kinases Wee1, Mik1 et Myt1 immédiatement après l'assemblage des CDK avec les cyclines. La phosphorylation inhibitrice des CDK1 et CDK2 constitue le mécanisme majeur du point de contrôle en G2/M de façon à retarder ou arrêter le cycle cellulaire en réponse aux dommages cellulaires. La réactivation par déphosphorylation des CDK est permise par l'action des phosphatases CDC25 qui jouent ainsi un rôle clef dans la progression du cycle cellulaire (**figure 1**) (Kiyokawa and Ray, 2008; Malumbres and Barbacid, 2009; Kurzawa and Morris, 2010).

I.2. Les phosphatases CDC25

Les phosphatases CDC25 (*Cell division cycle 25*) sont des phosphatases à double spécificité (*dsPases*) qui déphosphorylent à la fois les résidus pTyr et pThr. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de CDC25 : CDC25A, B et C. Chaque isoforme est codée par un gène unique localisé sur différents chromosomes (3p21, 20p13 et 5q31 respectivement). De plus, un mécanisme d'épissage alternatif génère 2 variants pour CDC25A, 7 variants pour CDC25B et 5 variants pour CDC25C. Ces derniers contribuent à la régulation spatiale et temporelle des complexes CDK/Cycline (Aressy and Ducommun, 2008; Lavecchia *et al.*, 2009; Jullien *et al.*, 2011).

I.2.1. Fonction

Le rôle des phosphatases CDC25 dans la régulation du cycle cellulaire a été largement discuté au cours des quinze dernières années. Bien que les premières études suggéraient que chacune des isoenzymes intervenait de façon très spécifique lors d'une phase du cycle, des études plus récentes ont démontré que les trois isoformes jouent un rôle essentiel et complémentaire durant les transitions G1-S et G2-M mais également durant la mitose (Boutros *et al.*, 2006; Timofeev *et al.*, 2010).

Ainsi, il est couramment admis que CDC25A permet la déphosphorylation des pThr14 et pTyr15 de la kinase des complexes cyclines (E ou A)/CDK2. La kinase, alors activée, phosphoryle la protéine du rétinoblastome (*pRB*), ce qui permet la libération du facteur de transcription de la famille E2F qui peut alors exercer son action sur les gènes permettant l'entrée de la cellule en phase S (Sanchez and Dynlacht, 2005). Cependant il semblerait que CDC25A ne suffise pas à elle seule pour que cette transition s'opère puisque des ARN interférents dirigés contre CDC25B et C peuvent inhiber la progression en phase S même en présence de CDC25A fonctionnelle (Garner-Hamrick and Fisher, 1998; Turowski *et al.*, 2003). Bien que les cibles de CDC25B et C dans cette transition ne soient pas clairement connues, ces résultats suggèrent que les 3 isoformes de CDC25 sont capables de promouvoir l'entrée des cellules en phase S. Classiquement, CDC25B est plutôt connue pour activer le *pool* centrosomal de complexes cyclineB/CDK1 pendant la transition G2-M, cette activation étant ensuite maintenue grâce à l'action des CDC25C dans le noyau au début de la mitose (Gabielli *et al.*, 1997; Lindqvist *et al.*, 2005). Là aussi, de récentes études ont suggéré que CDC25A aurait, elle aussi, un rôle à jouer dans la transition G2-M puisqu'il a été montré qu'une surexpression de CDC25A accélère la division cellulaire alors qu'une diminution de son expression après utilisation d'un ARN interférent retarde l'entrée des cellules en mitose (Mailand *et al.*, 2002). CDC25A serait en effet capable de maintenir l'assemblage et donc l'activation des complexes cyclineB/CDK1 dans le noyau permettant ainsi la condensation des chromosomes et l'entrée des cellules en mitose (Boutros, Dozier *et al.*, 2006; Aressy and Ducommun, 2008; Timofeev, Cizmecioglu *et al.*, 2010).

I.2.2. Structure

La séquence polypeptidique des phosphatases CDC25 contient entre 300 et 600 résidus d'acide aminé selon les isoformes et les variants d'épissage, et peut être divisée en deux domaines : un domaine régulateur *N*-terminal, fortement divergent entre les trois isoformes, avec seulement 20 à 25% d'identité, et un domaine catalytique *C*-terminal plus conservé, avec 60 % d'homologie entre les CDC25A, B et C.

Le domaine régulateur *N*-terminal contient de nombreux sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation impliqués dans la régulation de l'activité CDC25, dans la stabilité de la protéine et dans ses associations avec différentes protéines régulatrices. Il contient également des séquences signal d'importation ou d'exportation nucléaire « NLS » (*nuclear localization signal*) et « NES » (*nuclear export signal*), qui contrôlent la localisation intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, des phosphatases CDC25 (**figure 2**).

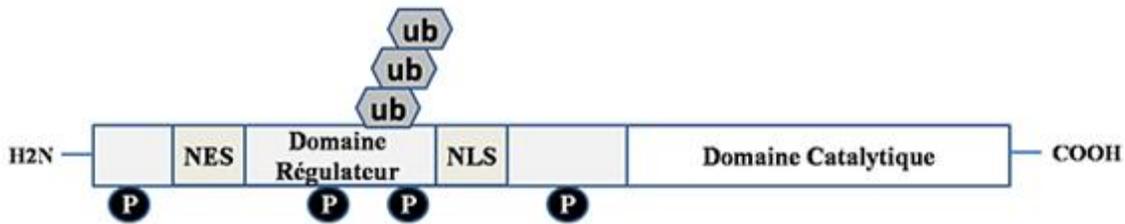


Figure 2 : Structure primaire générale des phosphatases CDC25 et modifications post-traductionnelles (Boutros, Dozier *et al.*, 2006).

La structure cristalline des domaines catalytiques des CDC25A et B libres de leur substrat a été résolue par cristallographie aux rayons X, permettant d'établir des données essentielles concernant l'organisation tridimensionnelle de leur site actif. Le domaine catalytique est composé de 5 feuillets β parallèles centraux pris en sandwich entre trois hélices α en dessous et deux hélices α au dessus (**figure 3**).

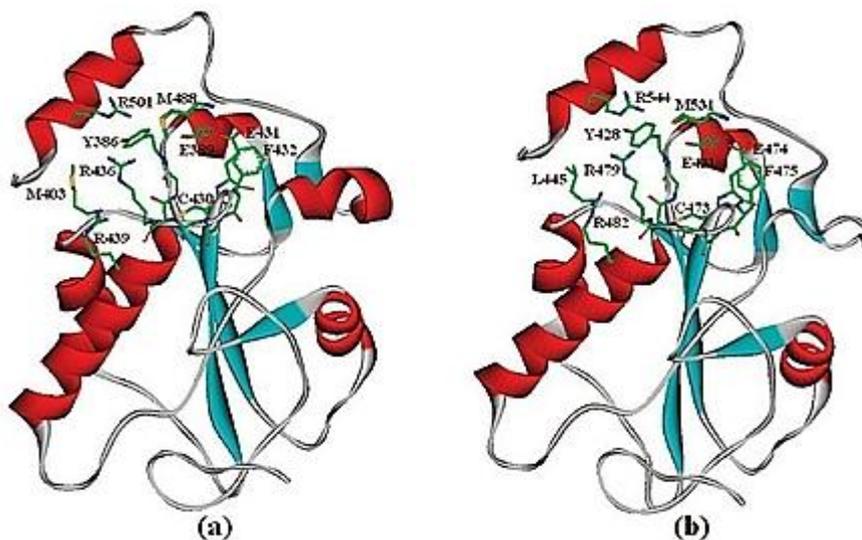


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de CDC25A (a) et B (b) déterminée par cristallographie aux rayons X (Park *et al.*, 2008).

Les résidus C-terminaux en position 31 pour CDC25A et en position 17 pour CDC25B ne sont pas visibles au sein de cette structure complexe, d'autant plus que CDC25B présente une hélice α supplémentaire à proximité de son site actif.

Les CDC25 possèdent au niveau de leur site actif une séquence « **HCX₅R** » caractéristique des protéines de la famille des PTP (*protein tyrosine phosphatase*). Dans cette séquence type, « H » représente un résidu histidine hautement conservé, « C » correspond à la cystéine catalytique, « X₅ » représente 5 résidus qui forment une boucle dans laquelle les hydrogènes des groupements amides se lient aux phosphates des substrats et « R » représente un résidu

arginine hautement conservé requis pour la liaison des acides aminés phosphorylés au substrat (**figure 4**). Ce motif caractéristique est situé au sommet d'une hélice α , favorisant ainsi la déprotonation de la cystéine catalytique.

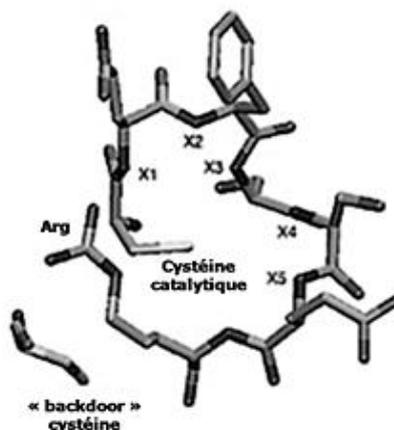


Figure 4 : Boucle de résidus clés du site actif de CDC25B (Rudolph, 2005).

Contrairement à d'autres phosphatases, le site actif des CDC25 semble être très accessible, puisqu'il est peu profond et présente une large interface d'interaction avec d'autres protéines. En effet, à l'inverse des PTP1B (*protein tyrosine phosphatase 1B*) dont le site actif est enfoui dans une cavité qui restreint la spécificité de substrat aux tyrosines phosphorylées, le site actif ouvert des CDC25 peut recevoir les groupements phosphorylés des tyrosines et des thréonines ce qui leur confère leur double spécificité de substrat. Des constructions de CDC25, contenant toute la séquence polypeptidique ou contenant uniquement le domaine catalytique, présentent la même activité pour le substrat CDK2/CyclineA. Cette observation suggère que tous les éléments essentiels à la reconnaissance du substrat se situent au niveau du site actif. Bien qu'il n'y ait apparemment pas de structure spécifique à la reconnaissance du substrat comme une boucle auxiliaire au sein de la structure tridimensionnelle des CDC25, trois résidus (Arg488, Arg492, Tyr497) appelés « *Hotspot* », localisés à 20-30 Å du site actif chez CDC25B, semblent avoir un important rôle à jouer dans la reconnaissance et la spécificité du substrat (Rudolph, 2007; Aressy and Ducommun, 2008).

I.2.3. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique général des PTPs contenant le motif HCX₅R se déroule en deux étapes et implique la participation de deux résidus catalytiques clés : un anion thiolate et un acide catalytique protoné. Le groupement phosphorylé du substrat est maintenu dans la boucle du site actif suite à la formation de liaisons hydrogène avec les groupements amides

des 5 résidus « X₅ » et avec l'arginine du motif HCX₅R. Lors de la première étape de la réaction, l'anion thiolate de la cystéine catalytique attaque le groupement phosphate bisanionique du substrat. Le produit intermédiaire (substrat-phosphate-cystéine catalytique) alors formé est ensuite protoné par action de l'acide catalytique (aspartate), permettant ainsi le départ du substrat déphosphorylé. Dans la seconde étape de la réaction, l'intermédiaire phospho-cystéine restant est hydrolysé après attaque par une molécule d'eau, elle-même préalablement activée par l'aspartate qui fait alors office de base (**figure 5**) (Rudolph, 2007).

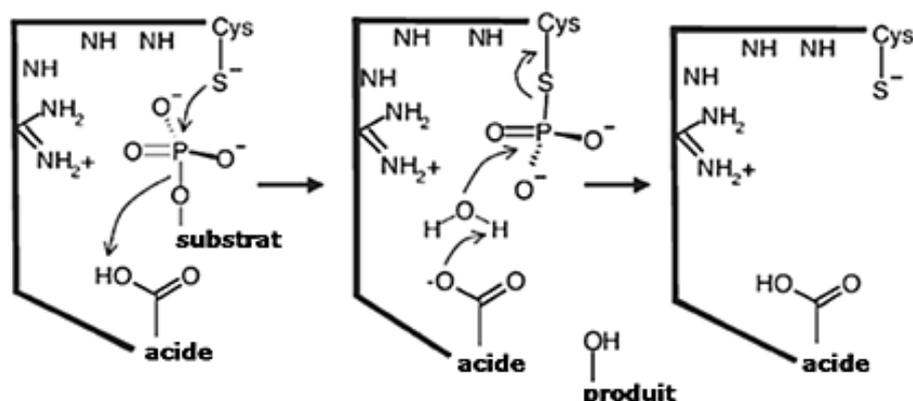


Figure 5 : Mécanisme catalytique général des PTPs (Rudolph, 2007).

Le mécanisme catalytique des CDC25 obéit au schéma global établi pour l'ensemble des PTP au détail près que l'identité de l'acide catalytique n'est pas clairement établie pour les CDC25. En effet, deux cas de figures distincts semblent exister : il semblerait que la réaction ne nécessite pas d'acide catalytique pour des substrats avec un groupement partant présentant un pKa inférieur à 8 alors que pour des substrats avec un groupement partant dont le pKa est supérieur à 8, un acide catalytique semble être strictement requis mais n'a pas encore été clairement identifié. L'hypothèse la plus probable évoque l'action du résidu Glu431 chez CDC25A. Les CDC25 étant des PTPs à double spécificité, elles agissent sur leur substrat en enchaînant deux cycles catalytiques : l'enzyme se dissocie de son substrat après un premier cycle catalytique c'est-à-dire après la déphosphorylation de la phospho-tyrosine et doit se réassocier et procéder à un deuxième cycle catalytique pour déphosphoryler la phospho-thréonine (Rudolph, 2007).

I.2.4. Mécanismes de régulation des CDC25

La progression et l'arrêt du cycle cellulaire sont intimement liés à la régulation de la synthèse, de la dégradation, de la localisation et de l'activité des phosphatases CDC25.

I.2.4.1. Régulation de l'expression et de la localisation intracellulaire des CDC25

L'équilibre entre la synthèse et la dégradation des CDC25 est hautement régulé. Parmi les trois isoformes, CDC25C semble être la plus stable. En effet, bien que sa transcription présente des variations au cours du cycle avec un pic en phase G2, son niveau protéique reste lui relativement stable avec une demi-vie de 12 h. Les quantités intracellulaires de CDC25A et B sont par contre variables en fonction de la phase du cycle considérée.

CDC25A est exprimée en milieu de phase G1 sous l'action du facteur de transcription E2F et du proto oncogène c-Myc mais cette synthèse *de novo* est contrebalancée par une dégradation à travers la voie du complexe SCF- β TrCP (*Skp1/Cullin/F-box* – β *transducin repeat-containing protein*) ubiquitine ligase jusqu'à l'entrée en mitose. CDC25A est stabilisée par sa phosphorylation par le complexe CDK1/CyclineB au cours de la transition G2/M, cette stabilisation lui permettant d'assurer son rôle en début de phase M. Le niveau de CDC25A diminue ensuite rapidement en sortie de mitose et début de phase G1 suite à sa dégradation médiée par une ubiquitinylation dépendante du complexe APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*). La dégradation des CDC25A par les complexes de ligation à l'ubiquitine nécessite la reconnaissance de motifs spécifiques localisés dans le domaine N-terminal de la protéine. Ainsi, la liaison de CDC25A avec le complexe APC/C requiert la reconnaissance d'une boîte de destruction « KEN » (*KEN box*) alors que l'interaction avec le complexe SCF- β TrCP est dépendante de la phosphorylation de résidus sérine localisés dans des motifs appelés DSG (Boutros *et al.*, 2007; Aressy and Ducommun, 2008). Par exemple, durant l'interphase l'association de CDC25A avec le complexe SCF- β TrCP nécessite la phosphorylation du résidu sérine 82 dans le motif DSG. La phosphorylation de ce résidu est favorisée par la phosphorylation de résidus voisins tels que les résidus S76, S79 et T80. Deux études récentes ont montré que la kinase GSK-3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) phosphorylerait dans un premier temps le résidu S76 permettant ensuite à la kinase CK1 α (*casein kinase 1 α*) de phosphoryler les résidus S79 et S82 (Kang *et al.*, 2008; Honaker and Piwnicka-Worms, 2010).

Pour sa part, l'expression de CDC25B augmente en milieu de phase S, culmine au cours de la transition G2-M puis diminue. CDC25B, très instable, est dégradée par le protéasome. Cette dégradation est consécutive à la liaison avec le complexe SCF- β TrCP mais, contrairement à CDC25A, cette liaison ne nécessite pas de phosphorylation préalable puisqu'elle s'opère au

niveau d'un motif « D-D-G » non phosphorylé (Boutros, Lobjois *et al.*, 2007; Aressy and Ducommun, 2008).

La régulation subcellulaire des CDC25 au cours du cycle cellulaire est contrôlée par un processus dynamique de navettes entre le noyau et le cytoplasme. Leur transfert du cytoplasme vers le noyau est géré à la fois par la présence des séquences NLS et NES dans le domaine régulateur de chaque CDC25 mais également par l'interaction de ces dernières avec des protéines de la famille 14-3-3 qui engendre leur séquestration cytoplasmique. Pour que cette interaction ait lieu, il est nécessaire que les phosphatases CDC25 soient phosphorylées au niveau d'un résidu sérine par les kinases chk1 (*checkpoint kinase 1*) ou C-TAK1 (*Cdc twenty-five C associated protein kinase*) afin qu'un site de liaison puisse être créé. CDC25C, par exemple, est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 durant l'interphase après phosphorylation du résidu S216 par C-TAK1. Les deux protéines se dissocient ensuite au début de la mitose, permettant la reconnaissance de la séquence NLS de la CDC25 par la machinerie d'importation nucléaire. CDC25C est alors transloquée dans le noyau où elle va déphosphoryler le complexe CDK1/CyclineB. Cette translocation serait de plus favorisée par la phosphorylation de résidus sérine dans la séquence NES par les kinases PLK1 et PLK3 (*Polo-like kinase*). La régulation de la localisation des CDC25A et B est basée sur le même schéma, seuls variant les kinases impliquées et les résidus phosphorylés (Boutros, Dozier *et al.*, 2006; Aressy and Ducommun, 2008).

I.2.4.2. Séquestration et dégradation des CDC25 lors de dommages à l'ADN

Lorsque la cellule est exposée à différents stress qui altèrent son ADN, tels que des radiations ionisantes, des rayonnements ultraviolets ou des inhibiteurs de réplication, le cycle cellulaire est interrompu au niveau des points de contrôle, afin que la cellule puisse réparer ses dommages dont l'accumulation pourrait causer sa transformation ou sa mort. Cet arrêt du cycle est possible grâce à un mécanisme de régulation des CDC25. En effet, en fonction du type de dommages apparus au niveau de l'ADN, des kinases nommées ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*), ATR (*Rad3-related*) ou p38 SAPK (*p38 stress-activated kinase*) phosphorylent d'autres kinases telles que Chk1, Chk2 (*checkpoint kinase*) ou MK2 (*MAPKAP kinase-2*, également appelée Chk3) qui à leur tour phosphorylent les CDC25 (**figure 6**) (Reinhardt and Yaffe, 2009).

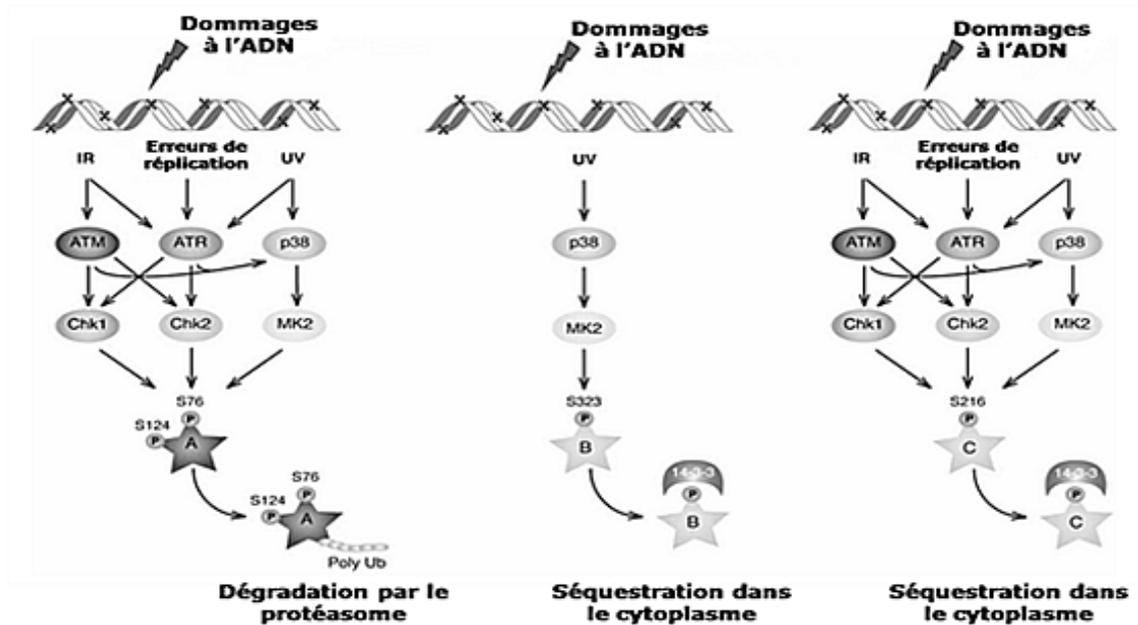


Figure 6 : Voies de régulation des phosphatases CDC25 en réponse à des altérations de l'ADN (Aressy and Ducommun, 2008).

Chk: Checkpoint Kinase, MK: MAPKAP kinase-2, ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated, ATR: ATM and Rad3 related

Ainsi, CDC25A serait impliquée dans l'arrêt du cycle en réponse à des dommages de l'ADN au niveau des transitions G1/S et G2/M mais également pendant la phase S. Cet arrêt du cycle interviendrait suite à la phosphorylation de CDC25A au niveau des résidus S76 et S124 qui déclenche un processus d'ubiquitinylation conduisant à la dégradation de la phosphatase par le protéasome (**figure 6**).

L'arrêt en G2 engendré par des anomalies au niveau de l'ADN est également médié par la phosphorylation de CDC25C au niveau du résidu S216. Cette phosphorylation permet la liaison de CDC25C avec des protéines membres de la famille 14-3-3 et donc sa séquestration dans le cytoplasme. Elle ne pourra donc pas rejoindre ses partenaires CDK1/cyclineB dans le noyau, empêchant ainsi l'entrée de la cellule en mitose (**figure 6**).

CDC25B subirait le même sort que CDC25C en cas d'altérations de l'ADN avec cette fois une phosphorylation au niveau du résidu S323 (**figure 6**) (Karlsson-Rosenthal and Millar, 2006; Aressy and Ducommun, 2008; Lavecchia, Di Giovanni *et al.*, 2009).

I.2.4.3. Régulation de l'activité des CDC25

I.2.4.3.1. Régulation de l'activité CDC25 par phosphorylation

La régulation de l'activité catalytique des phosphatases CDC25 est dépendante de l'activité de nombreuses kinases parmi lesquelles leurs propres substrats, les complexes CDK/cycline. Ce type de régulation a été plus amplement décrit pour les CDC25B et C. CDC25B est régulée positivement par phosphorylation de S353 par la kinase Aurora A, permettant ainsi l'activation du complexe CDK1/cycline B au niveau du centrosome. L'activation de CDC25B et C est ensuite maintenue par ce même complexe dans le noyau, créant ainsi une boucle d'amplification qui permet l'entrée en mitose. Au cours de la mitose, une kinase supplémentaire, Polo-like kinase 1, entre dans cette boucle d'amplification en phosphorylant CDC25C (Bagheri-Yarmand *et al.*, 2010). D'autres kinases comme CKII (*casein kinase II*) ou pEg3 (*Paternally-expressed gene 3*) ont également été décrites comme des régulateurs directs de l'activité phosphatase de CDC25B, et CaMK2 (*Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase Type II*) comme kinase stimulatrice de l'activité de CDC25C (Aressy and Ducommun, 2008).

I.2.4.3.2. Régulation « redox » de l'activité CDC25

Comme précédemment précisé dans le chapitre I.2.2, les phosphatases CDC25 sont caractérisées par la présence dans leur site actif du motif [HCX₅R] caractéristique des PTPases. La cystéine de ce site catalytique (Cys⁴³¹ pour CDC25A, Cys⁴⁷³ pour CDC25B et Cys³⁷⁷ pour CDC25C) est un résidu très réactif et déterminant pour l'activité (cf I.2.2). Ces cystéines sont très sensibles à l'oxydation. Cette oxydation engendre l'inactivation de l'enzyme alors incapable de réagir avec son substrat.

En effet, lorsque l'enzyme est sous sa forme libre, la cystéine catalytique est sous forme d'anion thiolate. Ce dernier possède un pKa exceptionnellement faible (5,8 chez CDC25 B par exemple contre 8,3 dans d'autres protéines). Ce faible pKa lui confère une grande réactivité vis-à-vis des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ainsi, en présence d'un excès de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou d'anion superoxyde (O₂⁻), il y a formation d'un acide sulfénique (-SO[·]), très instable, qui peut être lui-même oxydé en acide sulfinique (-SO₂[·]), ou même en acide sulfonique (-SO₃⁻). Lorsque l'oxydation passe le stade d'acide sulfinique, le processus devient irréversible et l'activité catalytique nulle (**figure 7**) (Sohn and Rudolph, 2003; Brisson *et al.*, 2005; Rudolph, 2007). Une telle transformation irréversible de la

cystéine catalytique pourrait constituer un signal de dégradation de l'enzyme. En effet, il a été montré que les CDC25A et les CDC25C sont dégradées lors d'un traitement de cellules *HeLa* par du peroxyde d'hydrogène et que cette dégradation est indépendante de la voie des *checkpoint kinases* et du protéasome, suggérant une interaction directe entre les ERO et les phosphatases CDC25 (Savitsky and Finkel, 2002; Brisson *et al.*, 2007).

Par contre, si la concentration en ERO est modérée, l'acide sulfénique pourra réagir avec une autre cystéine située à l'extérieur du site actif (cystéine *backdoor*) pour former un pont disulfure (Buhrman *et al.*, 2005; Rudolph, 2005). Ce mécanisme a été démontré, *in vitro*, pour les CDC25B et C, mais il est probable que CDC25A subisse les mêmes transformations (Sohn and Rudolph, 2003). Dans le cas de CDC25C, la formation de ce pont disulfure induirait une modification de la conformation de l'enzyme facilitant sa liaison avec la protéine 14-3-3 et sa subséquente séquestration dans le cytoplasme (Savitsky and Finkel, 2002).

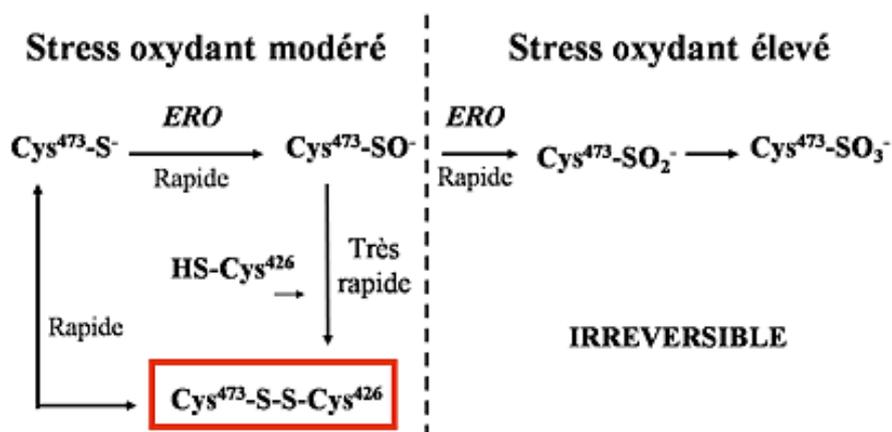


Figure 7 : Cycle d'oxydation de la cystéine catalytique des phosphatases CDC25 (Sohn and Rudolph, 2003).

Cependant, ce pont disulfure peut être réduit *in vitro* par le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase (trx/trxR, voir paragraphe II.2), permettant aux CDC25 de retrouver leur activité catalytique (**figure 8**) (Rudolph, 2005). Il y a plus de 10 ans, l'existence d'une telle régulation a déjà été suggérée *in vivo*. Natsuyama et son équipe ont en effet démontré qu'un apport en agents antioxydants tels que la thiorédoxine ou la superoxyde dismutase permet de relancer la mitose de cellules embryonnaires. L'arrêt de la division de ces cellules a alors été attribué à un stress oxydant. La reprise de la division cellulaire coïncidant avec une déphosphorylation de CDK1, substrat des CDC25, les auteurs ont alors émis l'hypothèse que l'arrêt du cycle devait être médié par une régulation négative de l'activité CDC25 en condition de stress oxydant et que l'ajout d'agents antioxydants devait permettre d'inverser cette régulation (Natsuyama *et al.*, 1993).

Depuis, cette hypothèse n'a pas encore été clairement confirmée. En effet, bien que certaines études aient montré l'impact d'un stress oxydant sur la dégradation des CDC25C et A et sur l'activité des CDC25B dans des cellules *HeLa* (Savitsky and Finkel, 2002; Brisson, Nguyen *et al.*, 2005; Brisson, Foster *et al.*, 2007), aucune étude récente n'a encore permis de démontrer clairement dans les cellules le rôle des ERO et du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase dans la régulation des CDC25 et du cycle cellulaire. Dans ce travail de thèse, nous tenterons d'apporter des éléments de réponse à cette problématique.

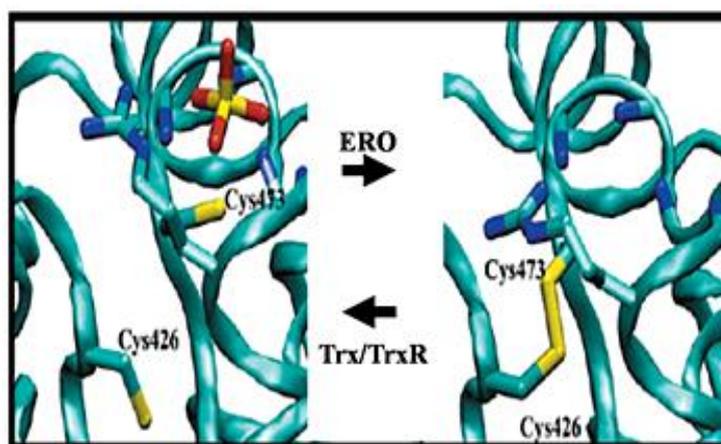


Figure 8 : Formation et réduction d'un pont disulfure entre Cys 473 et Cys 426 chez CDC25B par l'action respective des ERO et du système Trx/TrxR (Sohn and Rudolph, 2003).

II. ERO ET SYSTEME THIOREDOXINE / THIOREDOXINE REDUCTASE

II.1. ERO et signalisation cellulaire

Toutes les cellules aérobies génèrent des espèces réactives de l'oxygène au cours de réactions métaboliques essentielles à la vie cellulaire ou en réponse à certains stimuli. Comme leur nom l'indique, les ERO sont des molécules chimiquement réactives qui dérivent du métabolisme de l'oxygène moléculaire (dioxygène). De par sa configuration électronique, l'oxygène est avide d'électrons, sa réduction incomplète génère des espèces radicalaires oxygénées incluant l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (HO^\bullet), l'oxygène singulet (1O_2), les radicaux peroxydes (ROO^\bullet), le peroxy-nitrate ($ONOO^-$) et l'oxyde nitrique (NO). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui n'est pas un radical fait également partie de la famille des ERO car sa transformation engendre la production de certains radicaux précédemment cités.

L'anion superoxyde est produit à partir de l'oxygène moléculaire par addition d'un électron. C'est une ERO primaire à partir de laquelle sont produites d'autres espèces réactives de l'oxygène (**figure 9**).

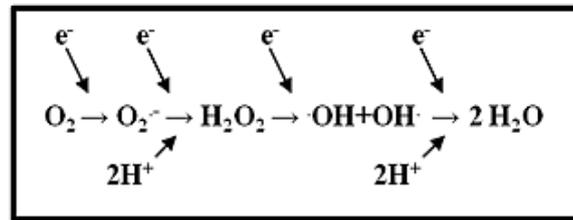


Figure 9 : Chaîne de formation des ERO à partir de l'oxygène moléculaire (Nordberg and Arner, 2001).

La formation de l'anion superoxyde a lieu spontanément dans des environnements riches en électrons au niveau de différents systèmes qui transfèrent ces derniers tels que la chaîne respiratoire, les oxydases (xanthine, NADPH...) ou les réductases. Il se produit au cours de ces transferts d'électrons des « fuites » et ces « électrons fuyants » sont responsables de la réduction monoélectronique de l'oxygène moléculaire en radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ (Nordberg and Arner, 2001; Trachootham *et al.*, 2008). Dans la mitochondrie qui est la principale source d'ERO intracellulaire, l'oxygène moléculaire est produit principalement au niveau des complexes I et III (NADH ubiquinone réductase cytochrome et ubiquinone cytochrome c réductase) de la chaîne de transport des électrons et au niveau de la glycerol-3-phosphate déhydrogénase (Lambert and Brand, 2009). Une importante production d' $O_2^{\cdot-}$ prend également place au niveau des NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxydases situées au niveau des membranes plasmiques. Ces enzymes sont associées à des récepteurs membranaires reconnaissant des cytokines ou des facteurs de croissance (PDGF, EGF, insuline, angiotensin II, and TNF α) et sont activées suite à l'interaction du récepteur avec son ligand (Valko *et al.*, 2006; Groeger *et al.*, 2009; Oakley *et al.*, 2009; Hawkes and Alkan, 2010). Cette interaction permettrait une production d' H_2O_2 extracellulaire qui pourrait ensuite entrer dans la cellule pour participer à la voie de signalisation induite par la reconnaissance du ligand (DeYulia *et al.*, 2005). Le réticulum endoplasmique et les peroxysomes sont également des sources d'ERO. Les peroxysomes produisent du peroxyde d'hydrogène mais pas d'anion superoxyde. Plusieurs enzymes peroxysomales (glycolate oxydase, D-aminoacide oxydase, urate oxydase...) et microsomaux (enzyme du métabolisme lipidique, système du cytochrome P450...) sont à l'origine de cette synthèse. Le réticulum endoplasmique est responsable de 80% de la production d' H_2O_2 dans une cellule. Le peroxyde d'hydrogène est également produit dans le cytoplasme et la mitochondrie par des superoxydes dismutases (Isoda *et al.*)

qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (**figure 10**) (Opara, 2006; Valko, Rhodes *et al.*, 2006; Goetz and Luch, 2008; Trachootham, Lu *et al.*, 2008).

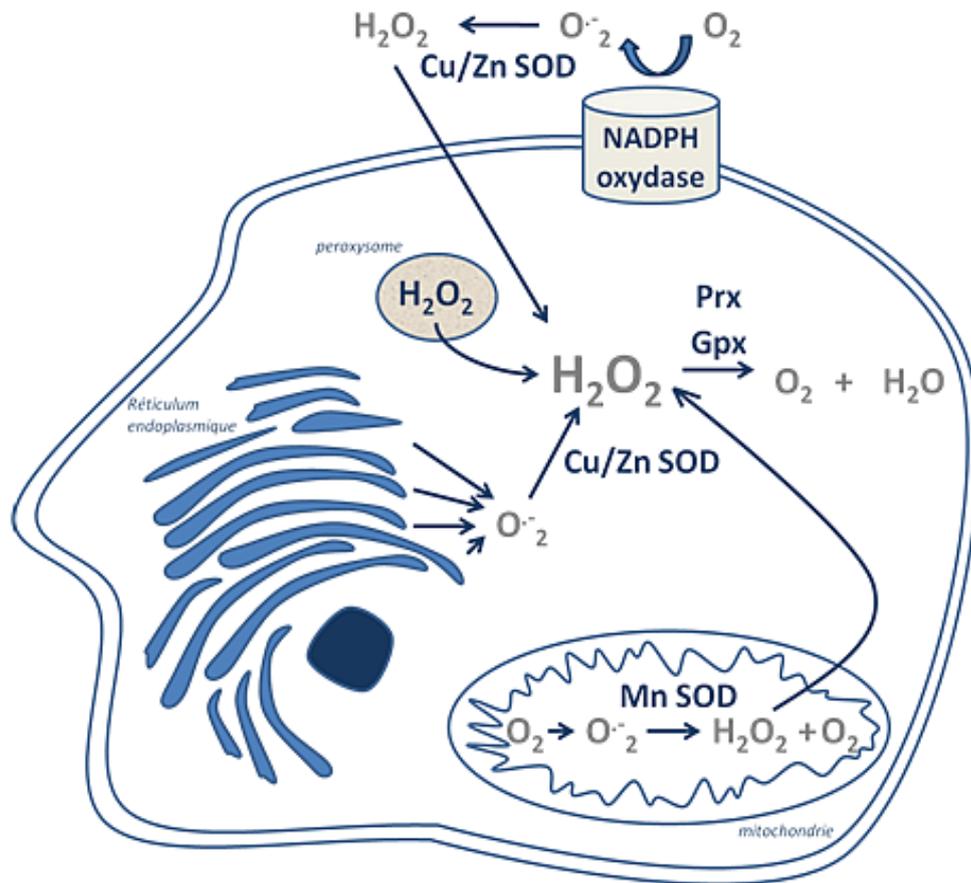


Figure 10 : Production intracellulaire du peroxyde d'hydrogène.

Pour contrebalancer sa production continue d'ERO et garder un statut redox équilibré, la cellule possède de nombreux systèmes antioxydants. Il existe des systèmes non enzymatiques et enzymatiques. Parmi les systèmes non enzymatiques, on trouve les vitamines A, C et E, la bilirubine, l'urate et le glutathion réduit (GSH) qui vont réaliser des réactions d'échanges « thiols-disulfides ». La première ligne de défenses enzymatiques de la cellule contre une accumulation d'ERO est la conversion de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène par les superoxydes dismutases, la Mn-SOD mitochondriale et la Cu/Zn-SOD cytosolique (**figure 10**). Bien que les SOD produisent des quantités importantes d' H_2O_2 , elles ont un rôle antioxydant primordial car l'anion superoxyde qu'elles éliminent est bien plus réactif que le peroxyde d'hydrogène qu'elles libèrent. Ce peroxyde d'hydrogène sera pris en charge par différentes peroxydases. Parmi celles-ci, on trouve la catalase, les Gpx (*glutathion peroxydase*) et les Prx (*peroxyrédoxines*) (**figure 10**). Ces peroxydases diffèrent

principalement par leur mécanisme catalytique, leur localisation et leur efficacité. Les Gpx et Prx éliminent de faible quantité d' H_2O_2 alors que la catalase catalyse la dégradation de grande concentration de peroxyde d'hydrogène mais son expression est principalement peroxysomale (Rhee *et al.*, 2005). D'autres systèmes enzymatiques antioxydants rétablissent les modifications induites par les ERO au niveau des protéines. Il s'agit du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase, des glutarédoxines et des méthionines sulfoxydes réductases (Valko, Rhodes *et al.*, 2006; Giorgio *et al.*, 2007; Trachootham, Lu *et al.*, 2008).

En effet, de par leur configuration électronique radicalaire, les espèces réactives de l'oxygène présentent une importante réactivité vis-à-vis de l'ensemble des biomolécules essentielles à la vie cellulaire comme l'ADN, les lipides et les protéines. Au niveau des protéines, ce sont les acides aminés des chaînes latérales qui sont les plus exposés aux attaques des ERO. Les résidus d'acides aminés contenant du soufre ou du sélénium comme la cystéine et la méthionine sont particulièrement sensibles à l'oxydation. Une oxydation des méthionines ou des cystéines peut avoir d'importants effets sur l'activité, la structure, la stabilité ou la localisation cellulaire des protéines (Goetz and Luch, 2008; Hawkes and Alkan, 2010). L'oxydation des protéines se traduit fréquemment par la formation de ponts disulfures suite à l'oxydation des groupements sulfhydryl des résidus de cystéine. En effet, l'oxydation des groupements thiols des résidus de cystéine peut conduire à la formation d'acide sulfénique qui en présence d'une quantité modérée d'ERO pourra réagir avec un homologue pour former un pont disulfure intra ou inter-protéique. Si la quantité d'ERO est excessive, l'acide sulfénique évoluera en acide sulfinique puis sulfonique comme nous l'avons vu dans le cas de la cystéine catalytique des CDC25 (**figure 6**). Les groupements sulfhydryl de la majorité des résidus cystéines des protéines (Cys-SH) ont un pKa de 8 et dans un environnement réducteur comme le cytoplasme ces groupements restent protonés à pH physiologique. Ainsi, les protéines cytoplasmiques ne contiennent en général pas de pont disulfure. Cependant, certaines protéines possèdent des groupements sulfhydryl avec un faible pKa, dû à des interactions de charges avec des résidus d'acide aminé voisins. Les résidus cystéine concernés sont alors sous forme d'anions thiolate à pH neutre. Les protéines porteuses de ces anions sont plus sensibles à l'oxydation par les ERO. Comme nous l'avons précisé précédemment, la formation de ces ponts disulfures intra- ou inter-moléculaire peut toutefois être réparée dans des réactions d'échange de disulfures catalysées par des thiols transférases telles que les thiorédoxines ou les glutarédoxines (Cumming *et al.*, 2004). Après les cystéines, les méthionines sont les acides aminés les plus sensibles aux ERO. L'oxydation des résidus méthionine des protéines engendre la formation d'isomères S- et R- de méthionine sulfoxyde (Met-(S)-SO et Met-(R)-

SO). Les méthionines sulfoxyde réductases catalysent la conversion des méthionines oxydées en méthionine réduites dans une réaction dépendante des thiorédoxines (Hawkes and Alkan, 2010).

Les altérations des macromolécules biologiques par les ERO et notamment les modifications protéiques sont en générales réparables. Lorsque la quantité d'ERO présente n'est pas excessive et que les dommages peuvent être pris en charge par les systèmes de réparation, les altérations causées par les ERO ne sont pas des évènements létaux pour la cellule. Dans le cas contraire, la cellule entre dans un état dit de « stress oxydant » qui conduira à la mort cellulaire par apoptose ou nécrose selon l'intensité et la nature de l'attaque (Ueda *et al.*, 2002; Masutani *et al.*, 2005; Rytter *et al.*, 2007; Baigi *et al.*, 2008).

Longtemps la littérature a fait état du peroxyde d'hydrogène comme une espèce chimique délétère pour la cellule, dont l'élimination rapide était cruciale pour la survie cellulaire. Aujourd'hui, le rôle de médiateur du peroxyde d'hydrogène dans de nombreux processus biologiques est clairement établi. Il intervient dans des voies de signalisation qui stimulent la prolifération, la différenciation, la migration ou l'apoptose (Rhee, 2006; Giorgio, Trinei *et al.*, 2007; Veal *et al.*, 2007; Chiarugi, 2009; Hawkes and Alkan, 2010). Par exemple, dans des cellules stimulées par des facteurs de croissances comme PDGF ou EGF, la production d' H_2O_2 est requise pour la propagation du signal dans la voie des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Valko *et al.*, 2007). Les cibles les plus caractérisées d' H_2O_2 au cours de ces voies de signalisation sont d'une part les CBPs (*cysteine-based phosphatases*) qui comprennent les PTPs (*protein tyrosine phosphatases*), les DSP (*dual-specificity phosphatases*), les LMW-PTP (PTP de faible poids moléculaire) et la phosphatase lipidique PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) et d'autre part les tyrosines kinases. H_2O_2 oxyde les résidus cystéines situés au niveau du site actif des phosphatases et inhibe leur activité (Meng *et al.*, 2002; Salmeen and Barford, 2005). A l'opposé, l'activité des tyrosines kinases est stimulée par leur oxydation (**figure 11**) (Nakashima *et al.*, 2005). L'inhibition des phosphatases favorise les cascades de phosphorylation car l'activation seule des protéines tyrosine kinases n'est pas suffisante pour maintenir le niveau de phosphorylation des protéines effectrices intervenant dans la transmission d'un signal. (Chiarugi and Cirri, 2003; Rhee *et al.*, 2005; Rhee, 2006; Chiarugi and Buricchi, 2007; Woo *et al.*, 2010). Parmi les phosphatases cibles d' H_2O_2 , on trouve PTP1B (*protéine tyrosine phosphatase 1B*) (Lee *et al.*, 1998; Meng *et al.*, 2004), FAK-tyrosine phosphatase (*focal adhesion kinase*) (Chiarugi *et al.*, 2003), PTEN (Cho *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005), LMW-PTP (Caselli *et al.*, 1998; Chiarugi *et al.*, 2001), SHP2 (*SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2*) (Meng, Fukada *et al.*,

2002; Chen *et al.*, 2009) et PRL-1 (*phosphatase of regenerating liver*) (Sun *et al.*, 2005) pour lesquelles l'inactivation par oxydation a été montrée dans des lignées cellulaires. Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre, les phosphatases CDC25 sont également des cibles d' H_2O_2 mais leur inactivation n'a jusqu'à lors été montrée que *in vitro* (Rudolph, 2005). Pour initier les voies de signalisation, H_2O_2 doit être localement suffisamment concentré ce qui implique une faible activité Gpx et Prx. Toutefois la concentration nécessaire pour stimuler ces voies est très variable selon le type cellulaire (Veal, Day *et al.*, 2007). De plus, la durée de l'inactivation des phosphatases et donc la durée de l'activation de la voie de signalisation dépendra de la quantité et de la proximité d'agents antioxydants réducteurs de thiol tels que la glutarédoxine ou la thiorédoxine (Salmeen and Barford, 2005; Chiarugi and Buricchi, 2007; Winterbourn and Hampton, 2008; Forman *et al.*, 2010).

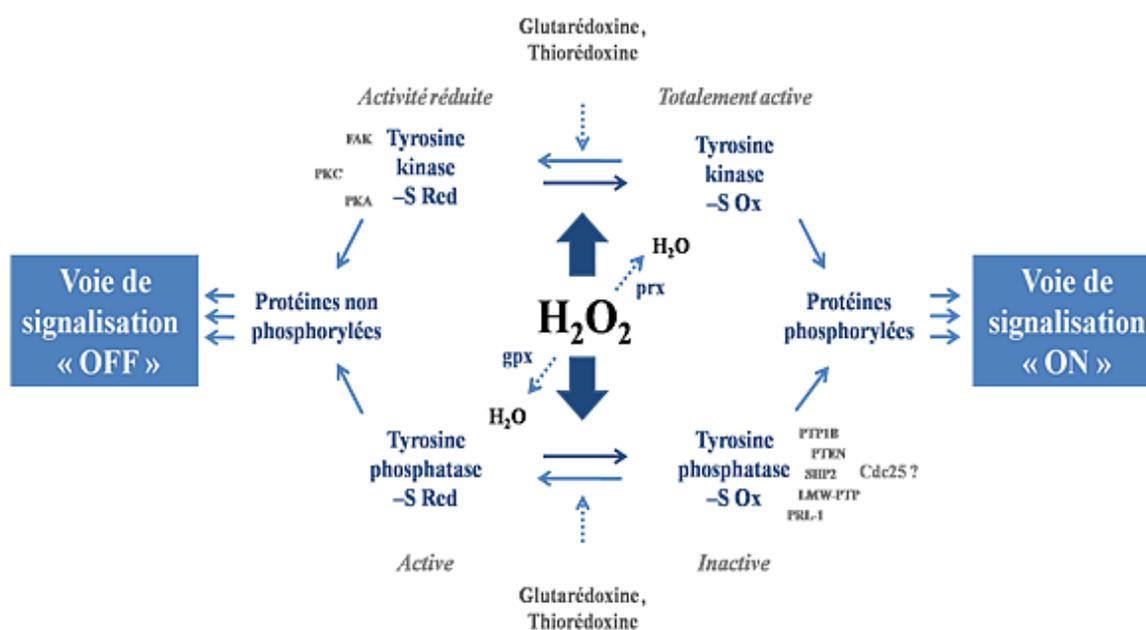
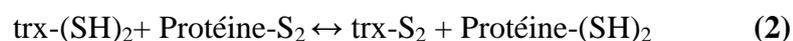
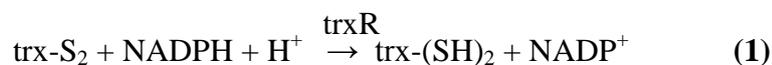


Figure 11 : Régulation redox des voies de signalisation *via* la modulation de l'activité des kinases et des phosphatases par H_2O_2 (Rhee, 2006).

II.2. Le système thiorédoxine / thiorédoxine réductase (trx/trxR)

Le système trx/trxR est un système antioxydant majeur qui permet de maintenir un statut redox intracellulaire équilibré. Il comprend les thiorédoxines réductases (trxR), les thiorédoxines (trx) et le NADPH, H^+ . Dans la cellule, les thiorédoxines oxydées (trx- S_2) présentent dans leur site actif un pont disulfure qui sera réduit en deux groupements thiol par les thiorédoxines réductases en présence de NADPH, H^+ (1). Les thiorédoxines réduites (trx-

SH₂) permettent la réduction de disulfures protéiques (2) (Arner and Holmgren, 2006; Holmgren and Lu, 2010).



Dans les cellules de mammifères, les thiorédoxines et les thiorédoxines réductases sont exprimées sous forme de trois isoformes : *trx1* et *trxR1* sont cytosoliques, *trx2* et *trxR2* sont mitochondriales et *Sp-trx* et *TRG* sont présentes dans les testicules chez les hommes. Contrairement aux *trxR1* et *trxR2*, *TRG* est capable de réduire le glutathion oxydé, d'où sa dénomination de thiorédoxine/glutathion réductase *TRG* (Arner, 2009; Holmgren and Lu, 2010).

II.2.1 Les thiorédoxines réductases

II.2.1.1 Structure et mécanisme d'action

Les thiorédoxines réductases sont des flavoprotéines, membres de la famille des nucléotides–disulfides oxydoréductases comme les glutathion réductases. On les retrouve de façon ubiquitaire dans les tissus de mammifères. Ce sont des sélénoprotéines homodimériques de taille moyenne (55-65 kDa) présentant une forte homologie de séquences entre elles. Les deux *trxR1* et *trxR2*, codées respectivement par les gènes *TXNRD1* et *TXNRD2*, possèdent chacune différentes isoformes issues d'un épissage alternatif associé à une expression spécifique du type cellulaire.

Toutes les isoformes ont une structure commune dans laquelle chaque sous-unité possède un site de liaison au NADPH, un site de liaison au FAD, un site de dimérisation ainsi que deux sites actifs. *TrxR2* possède en plus un site d'import mitochondrial. Le premier site actif est localisé dans la région *N*-terminale et présente un motif -Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-. Le deuxième site actif est situé dans la région *C*-terminale et possède une sélénocystéine indispensable pour l'activité dans une séquence -Gly-Cys-Sec-Gly- (**figure 12**).

Les deux sous-unités de la thiorédoxine réductase sont disposées selon un arrangement « tête-bêche » essentiel pour le déroulement de l'activité catalytique (**figure 13**). Au cours de la réaction enzymatique, le premier site actif, du côté *N*-terminal d'une sous-unité, reçoit les équivalents réduits du NADPH, H⁺ par l'intermédiaire du FAD permettant la formation d'un motif « dithiol » au niveau des deux cystéines du site. Les équivalents réduits sont ensuite

transférés à la sélénocystéine (sous forme sélénylsulfide (Cys-Sec)) du deuxième site actif, côté C-terminal de l'autre sous-unité. Le sélénothiol ainsi formé côté C-terminal permet de réduire les substrats de la *trxR* (**figure 14**) (Mustacich and Powis, 2000; Arner, 2009).

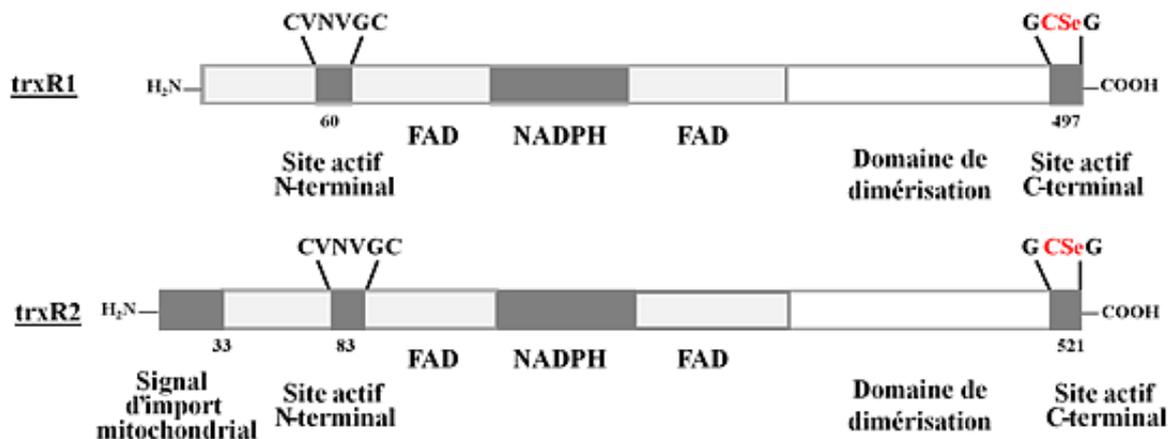


Figure 12 : Structure des *trxR1* et *trxR2* (Tonissen and Di Trapani, 2009).

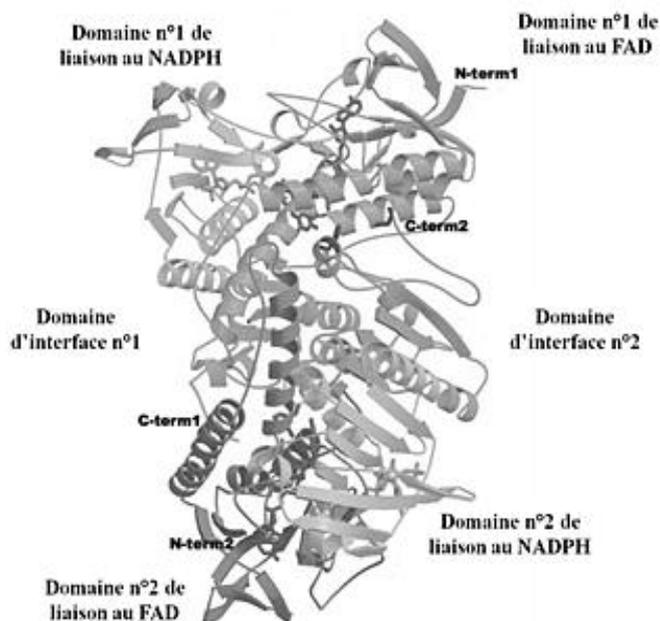


Figure 13 : Structure tridimensionnelle homodimérique de *trxR* (Sandalova *et al.*, 2001).

Le résidu sélénocystéine (Sec) est codé par un codon UGA qui est normalement identifié comme un codon stop mais qui, dans ce cas, peut être transcrit en sélénocystéine en présence d'un élément d'insertion de séquence sélénocystéine (SECIS) en 3'UTR dans l'ARNm correspondant. Le motif « Cys-Sec » du côté C-terminal est probablement localisé sur un bras

flexible de l'enzyme ce qui lui permet de rester sous une forme réduite grâce à son interaction avec le motif *N*-terminal réducteur (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-) de l'autre sous-unité du dimère. Le faible pK_a de la sélénocystéine (5,25) et l'accessibilité du site actif pourrait expliquer l'importante réactivité des *trxR* à pH physiologique ainsi que leur large spécificité de substrat et leur inhibition par de nombreux types d'inhibiteurs (Nalvarte *et al.*, 2004).

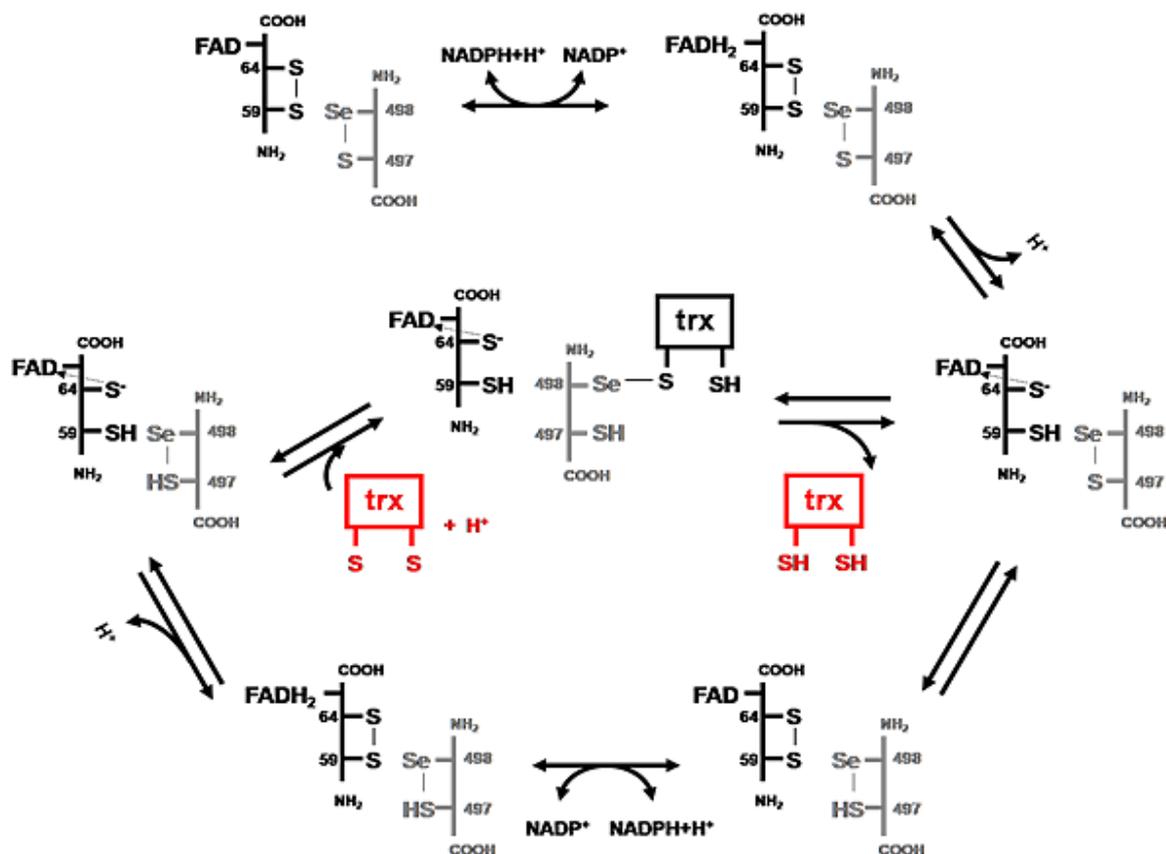


Figure 14 : Cycle catalytique des *trxR* (Gromer *et al.*, 2004; Arner, 2009).

II.2.1.2 Les substrats des *trxR*

Si les *trxR* sont les seules protéines connues capables de réduire les *trx*, elles sont également capables de réduire directement certains autres disulfures protéiques possédant un ou plusieurs sites actifs dont le motif « Cys-Xxx-Xxx-Cys » est similaire à celui des thiorédoxines. C'est le cas de TRP14 (14-kDa human thioredoxin (*trx*)-related protein) et TRP32 (32-kDa human thioredoxin (*trx*)-related protein)/Trx-like 1) qui sont des protéines cytoplasmiques, de la glutarédoxine 1 cytoplasmique et de la glutarédoxine 2 mitochondriale qui sont des membres de la famille thiorédoxine mais qui dépendent du glutathion. C'est également le cas de protéines situées dans le réticulum endoplasmique telles que les PDI

(*protéines disulfures isomérases*), CaBP1 (*calcium binding protein 1*), ERp72 (*endoplasmic reticulum protein*) et ERdj5/JPDI (*J-domain-containing PDI-like protein*) ou TMX (*transmembrane Trx-related protein*) qui est une protéine transmembranaire. Ces protéines de la famille des thiorédoxines interviennent dans le processus de repliement des protéines néo-synthétisées du réticulum endoplasmique, mais également lors de la réponse UPR (*unfolded protein response*) qui se met en place lorsqu'un stress du réticulum (accumulation de protéines de conformation anormale) apparaît (Powis and Kirkpatrick, 2007; Nakamura *et al.*, 2009). Ces protéines de la famille des thiorédoxines peuvent également être réduites par la thiorédoxine elle-même.

Les *trxR* ont également pour substrats des composés non protéiques, de faible poids moléculaire. Certains de ces composés tels que l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (*DTNB*), l'acide lipoïque ou les lipoamides sont porteurs de disulfures alors que d'autres n'en portent pas comme le polypeptide antibactérien NK-lysine, la L-cystine, l'alloxan, la vitamine K, certaines quinones (ubiquinone Q10), des composés contenant du sélénium (sélénite, sélénocystine) mais également certains peroxydes comme H₂O₂. À ce titre, la réduction par les *trxR* des peroxydes incluant les peroxydes lipidiques et le peroxyde d'hydrogène peut être une alternative à la voie enzymatique de détoxification des peroxydes lipidiques habituellement conduite par la glutathion peroxydase 4. Toutefois, le K_M élevé de *trxR* pour H₂O₂ implique que cette réaction ne se produit qu'en cas de stress oxydant important.

De plus, toujours en conditions de stress oxydant uniquement, les thiorédoxines réductases interviennent dans la synthèse de composés antioxydants comme l'acide ascorbique (vitamine C) et la vitamine E. En effet, les *trxR* catalysent la transformation de l'acide dihydroascorbique en acide ascorbique qui lui-même, outre son rôle antioxydant intrinsèque, intervient dans la production de la vitamine E qui est également un antioxydant cellulaire reconnu (Nordberg and Arner, 2001).

Les thiorédoxines réductases contribuent donc au maintien du statut redox intracellulaire grâce à leurs actions directes sur certains peroxydes ou par leurs actions dans des mécanismes de synthèse de composés antioxydants (vitamine C, vitamine E, ubiquinone, acide lipoïque...). Toutefois, ces réactions sont secondaires et n'interviennent que dans des conditions qui doivent encore être étudiées. Le rôle principal des *trxR* dans la régulation du stress oxydant est la régulation de l'activité des thiorédoxines.

II.2.2. Les thiorédoxines

II.2.2.1 Structure et mécanisme catalytique

Comme les trxR, les trx sont des oxydoréductases retrouvées de façon ubiquitaire dans les tissus des mammifères. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire (12 kDa pour trx1) qui contiennent un site actif dont le motif -Cys-Gly-Pro-Cys- est conservé. Trx1 contient 3 résidus cystéine supplémentaires en position 62, 69 et 73. Ces cystéines sont dites « de structure », intervenant dans des modifications post-transcriptionnelles telles que l'oxydation, la S-glutathionylation ou la S-nitrosylation qui permettent de réguler les fonctions de trx1 (**figure 15**). Cette dernière est également capable de former des homodimères par l'intermédiaire d'une liaison disulfure entre les résidus cystéine 73 (Nordberg and Arner, 2001; Tonissen and Di Trapani, 2009).

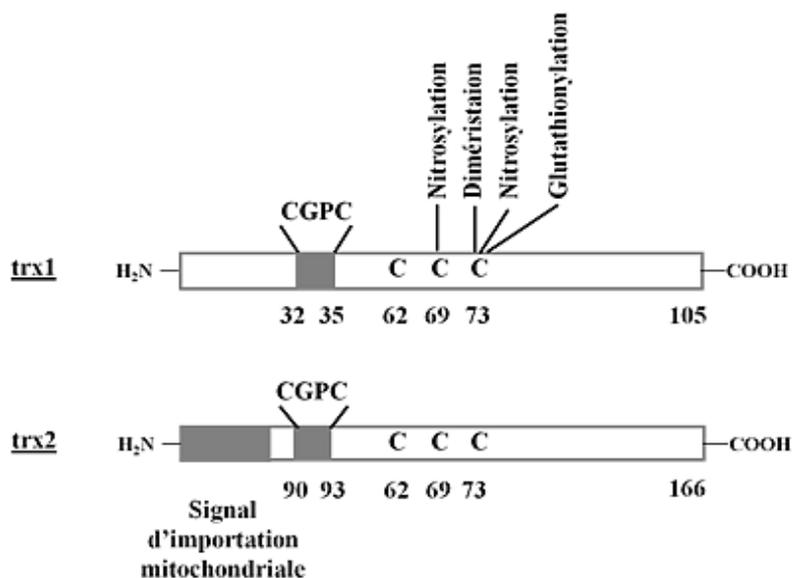


Figure 15 : Structure des trx 1 et trx 2 (Tonissen and Di Trapani, 2009).

La thiorédoxine 1 qui est majoritairement cytosolique peut être sécrétée à l'extérieur des cellules. En effet, deux formes de trx1 ont été retrouvées dans le milieu extracellulaire : une forme entière et une forme tronquée appelée trx80. Chacune de ces formes possède ses propres fonctions immuno-modulatrices avec des activités cytokine. La thiorédoxine 1 peut également être transférée dans le noyau suite à l'activation de certaines voies de signalisation telle que la voie NFκB (*nuclear factor-kappa B*) (Arner and Holmgren, 2006).

La réaction catalysée par la trx est une réaction de substitution nucléophile bimoléculaire. Il s'agit d'un transfert d'électrons de la trx vers le substrat protéique. La

réaction démarre par une attaque nucléophile du pont disulfure de la protéine substrat par le thiol de la cystéine 32 de la trx (étape 1 de la Figure 16). Cette attaque permet la libération d'un thiol au niveau du substrat et la formation d'un pont disulfure mixte entre la protéine et la cystéine 32 de la thiorédoxine. Ensuite, l'anion thiolate de la cystéine 35 du site catalytique de la trx attaque la cystéine 32 (étape 2 de la Figure 16). Le pont disulfure mixte est ainsi détruit, libérant le substrat protéique réduit. Par contre, la thiorédoxine est alors sous forme oxydée puisqu'un pont disulfure s'est formé au sein de son site catalytique, entre la cystéine 32 et la cystéine 35. La thiorédoxine est alors réduite par la thiorédoxine réductase en présence de NADPH, H⁺ afin de pouvoir reprendre un nouveau cycle catalytique (**figure 16**) (Collet and Messens, 2010; Holmgren and Lu, 2010).

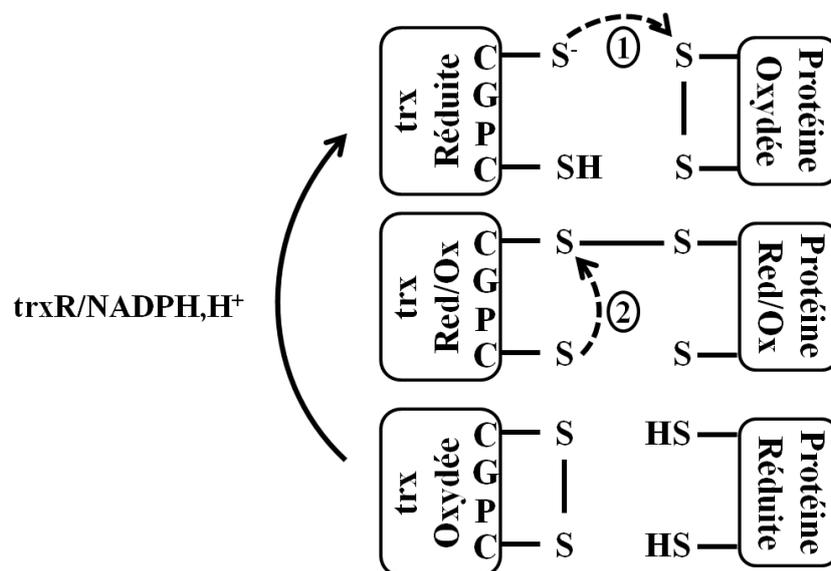


Figure 16 : Cycle catalytique des trx (Collet and Messens, 2010).

II.2.2.2. Les fonctions des thiorédoxines

Par l'intermédiaire de régulations redox et grâce à ses capacités antioxydantes, le système trx/trxR intervient dans l'ensemble des mécanismes qui rythment la vie cellulaire tels que la prolifération cellulaire, le maintien du statut redox ou l'apoptose. Les principaux rôles du système trx/trxR sont assurés par l'action directe des thiorédoxines sous formes réduites, les thiorédoxine réductases ayant la mission de maintenir ces dernières dans un état réduit actif.

II.2.2.2.1. Rôle dans la synthèse d'ADN

Les thiorédoxines jouent un rôle important dans la synthèse d'ADN et donc dans la prolifération cellulaire puisqu'elles fournissent des électrons à la ribonucléotide réductase qui catalyse la synthèse de désoxyribonucléotides à partir de ribonucléotides diphosphate (Biaglow and Miller, 2005).

II.2.2.2.2. Rôle antioxydant

Le système trx/trxR joue un rôle essentiel dans le maintien du statut redox intracellulaire.

En plus de sa capacité à réparer les dommages oxydants que peuvent subir couramment l'ensemble des protéines, les trx permettent de maintenir l'activité enzymatique de différents systèmes antioxydants. En effet, les trx réduisent les peroxyrédoxines, les méthionine sulfoxide réductases impliquées dans la réduction des méthionines sulfoxyde en méthionine, et les glutathion peroxidases 3. Il existe donc de ce fait une interaction entre les deux systèmes antioxydants les plus importants dans la cellule, le système du glutathion et le système trx/trxR. Ces systèmes antioxydants associés au système trx/trxR seront détaillés dans le chapitre II.2.3.

Les thiorédoxines peuvent également agir directement sur certaines ERO : elles sont par exemple des "scavenger" de radical hydroxyl et sont capables de capter l'oxygène singulet. Toutefois ces fonctions ne requièrent pas l'intervention du site actif de la protéine.

Une altération des fonctions des trx peut conduire à un déséquilibre du statut redox intracellulaire menant la cellule à un état de stress oxydant dont la conséquence la plus grave est l'entrée de cette dernière en apoptose (Biaglow and Miller, 2005; Tonissen and Di Trapani, 2009).

II.2.2.2.3. Rôle dans le déroulement de l'apoptose

Le rôle des thiorédoxines dans l'apoptose peut paraître paradoxal. En effet, les thiorédoxines sont susceptibles d'intervenir aussi bien dans les voies anti-apoptotiques que pro-apoptotiques. Leur contribution pro ou anti-apoptotique sera donc fortement dépendante du type cellulaire avec ses caractéristiques génétiques propres et son environnement.

II.2.2.2.3.1. Rôle anti-apoptotique

Hormis leur rôle dans le maintien du statut redox intracellulaire, les thiorédoxines interviennent également dans la réponse de la cellule face à un stress oxydant en activant les voies de signalisation apoptotique. Les thiorédoxines sont des senseurs du statut redox, elles transmettent leurs informations à des protéines kinases appelée ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) (Saitoh *et al.*, 1998). Ces dernières appartiennent à la famille des MAPKKK (*Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase*). La forme réduite de la thiorédoxine se lie à la région N-terminale d'ASK1 pour inhiber son activité kinase. Le complexe protéique formé par l'association d'ASK1 avec la trx est appelé « Signalosome ». Si une concentration importante en ERO est présente, la trx passe sous forme oxydée et sa liaison avec ASK1 est rompue. L'activité kinase d'ASK1 est alors fonctionnelle et ASK1 initie la formation d'un complexe protéique de plus haut poids moléculaire en recrutant d'autres facteurs tels que TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) et TRAF6. L'apoptose est ensuite médiée par l'intermédiaire des voies de JNK (*Jun N-terminal Kinase*) et p38. Le même processus s'opère également dans la mitochondrie par l'intermédiaire de trx2. Toutefois, dans la mitochondrie, ASK1 médie l'apoptose à travers une voie de signalisation indépendante de JNK. L'activation des deux voies, cytoplasmique et mitochondriale, a toutefois la même finalité : un relarguage du cytochrome c et une activation de la caspase 3 (**figure 17**) (Saitoh, Nishitoh *et al.*, 1998; Fujino *et al.*, 2006; Nadeau *et al.*, 2007) .

Les thiorédoxines ont également la faculté d'intervenir directement sur le déroulement de l'apoptose grâce à leur interaction avec la procaspase 3. Le rôle des thiorédoxines est encore ici anti-apoptotique car elles catalysent une réaction de trans-nitrosylation de la procaspase 3 qui induit une inhibition de l'apoptose (Mitchell *et al.*, 2007) .

Une autre fonction anti-apoptotique des trx est médiée par leur capacité à réguler, de façon redox, l'activité de nombreux facteurs de transcription. Trx favorise l'action des facteurs de transcription en réduisant un résidu cystéine essentiel pour leur liaison avec l'ADN. C'est le cas pour NF- κ B qui contrôle l'expression de différents gènes dont certains codent des protéines qui bloquent les voies apoptotiques comme les protéines de la famille Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), IAP (*inhibitor of apoptosis*) ou TRAF. En réduisant un pont disulfure présent dans la sous unité p50 de NF- κ B, la trx permet la liaison de ce facteur avec l'ADN et donc l'expression de protéines anti-apoptotiques (Matthews *et al.*, 1992; Tonissen and Di Trapani, 2009).

Ainsi, une inhibition chimique des thiorédoxines sera susceptible de déclencher l'apoptose de façon directe grâce à l'activation d'ASK1 et de la procaspase 3, mais également de façon indirecte avec la réduction de l'expression des protéines anti-apoptotiques *via* l'inactivation de NF- κ B. De plus, la thiorédoxine possède un inhibiteur endogène, la protéine TBP-2 (*thioredoxin binding protein 2*) autrefois appelée VDUP-1 (*vitamin D up-regulated protein 1*). Cette dernière se lie au site actif redox de la thiorédoxine et entre en compétition avec tous les autres substrats naturels de trx. Une concentration importante en TBP-2 pourrait activer les voies apoptotiques par inhibition des effets anti-apoptotiques de la thiorédoxine (Kaimul *et al.*, 2007; Powis and Kirkpatrick, 2007).

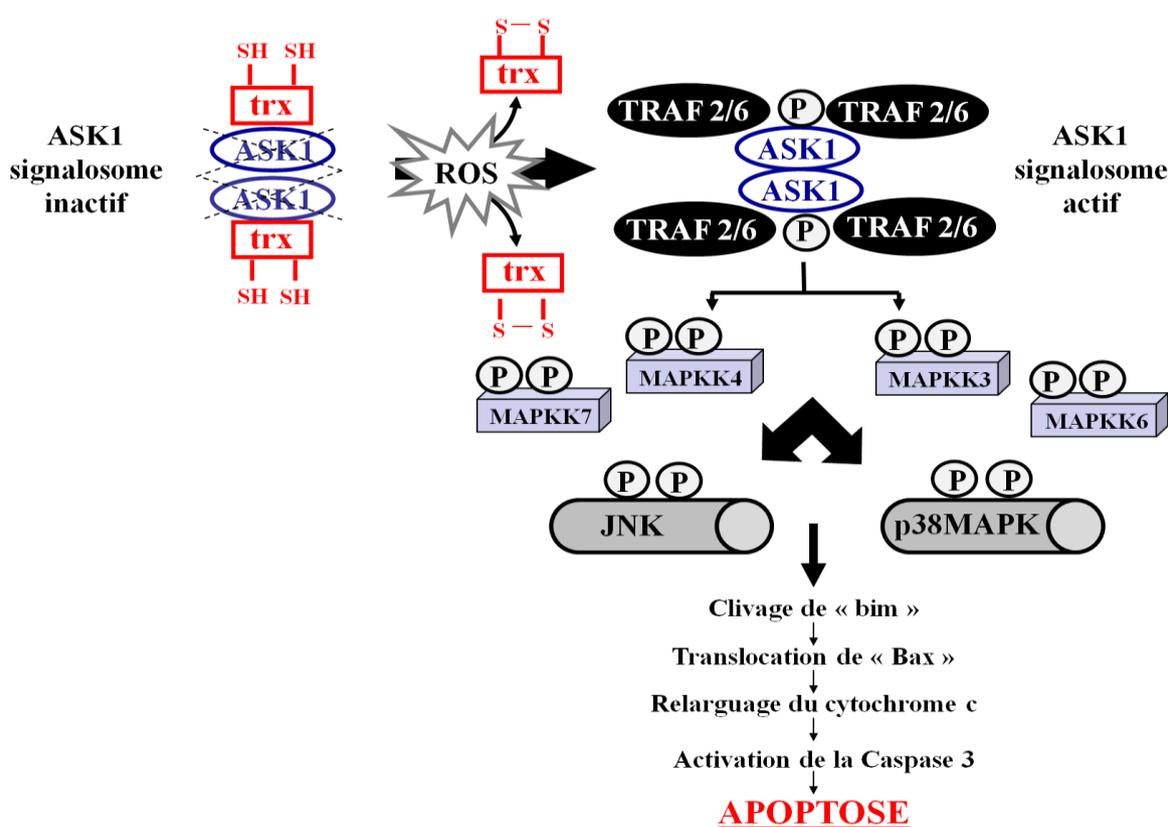


Figure 17 : Rôle des trx dans l'apoptose à travers la régulation d'ASK1 (Nakamura, Hoshino *et al.*, 2009).

II.2.2.2.3.2. Rôle pro-apoptotique

Hormis NF- κ B, la thiorédoxine régule l'activité d'autres facteurs de transcription comme AP-1 (*activator protein 1*) ou la protéine p53. p53 contrôle l'expression de nombreux gènes pro-apoptotiques en réponse à divers stimuli tels que l'accumulation de dommages dans l'ADN. Le gène p53 appartient à la famille des gènes suppresseurs de tumeurs. En effet,

lorsque le nombre de mutations dans l'ADN devient trop important, la protéine p53 provoque un arrêt du cycle cellulaire en induisant l'expression de la protéine p21. p53 contient douze cystéines dans sa séquence protéique. Neuf d'entre elles se situent dans le domaine de liaison à l'ADN et quatre sont essentielles pour la liaison. Comme pour NF- κ B, la capacité de liaison de p53 à l'ADN dépend de son état redox. L'intervention de la thiorédoxine, soit directement, soit par l'intermédiaire d'une autre protéine Ref1 (*Redox factor 1*) est donc requise pour maintenir les cystéines sous leur forme réduite et permettre la liaison de p53 à l'ADN (Ueno *et al.*, 1999; Masutani *et al.*, 2005).

En favorisant la liaison à l'ADN de certains facteurs de transcription qui ont des fonctions littéralement opposées, le rôle des thiorédoxines dans l'apoptose est controversé. Il est probablement fortement dépendant du niveau d'expression des protéines régulées par les trx et des protéines qui régulent la thiorédoxine. De nombreuses cellules cancéreuses profitent, par exemple, des effets anti-apoptotiques des trx car elles possèdent un gène p53 inactif.

II.2.2.2.4. Rôle dans le déroulement des cascades de phosphorylation

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre *II.1*, de nombreuses protéines kinases et phosphatases intervenant dans des voies de signalisation conduites par des cascades de phosphorylation possèdent dans leur site actif des résidus cystéine sensibles à l'oxydation associée notamment au peroxyde d'hydrogène. Plusieurs études ont montré que le système thiorédoxine était capable de réverser *in vitro* l'état d'oxydation de certaines de ces protéines (Arner, 2009). C'est le cas pour PKA (*cAMP-dependent protein kinase*), qui est inhibée suite à la production d' H_2O_2 lors de la lipogenèse induite par l'insuline dans des adipocytes de rats (de Pina *et al.*, 2008), de PKC (*protein kinase C*) qui est inactivée par l'oxyde nitrique dans des cellules épithéliales d'artère pulmonaire (Kahlos *et al.*, 2003), de PTP1B qui est inhibée suite à une oxydation par le peroxyde d'hydrogène produit dans des cellules A431 (cellules de carcinome épidermoïde humain) stimulées par l'EGF (Lee, Kwon *et al.*, 1998) et de PTEN dont l'activité est inhibée dans des cellules HeLa (adénocarcinome utérin humain) et NIH 3T3 (cellules fibroblastiques embryonnaires de souris) traitées par H_2O_2 . Cependant, la réversion de l'oxydation de ces protéines par le système trx/trxR dans un contexte cellulaire n'a jusqu'alors été montrée que pour la phosphatase PTEN. En effet, l'étude publiée par Lee *et al* en 2002, a montré qu'une déplétion en trx réduites intracellulaires diminuait le pourcentage de

réactivation des PTEN oxydées. Les auteurs ont également montré par une co-immunoprécipitation que les deux protéines, trx et PTEN, interagissaient spécifiquement ensemble (Lee *et al.*, 2002). Comme cité dans les chapitres *I.2.4.3.2.* et *II.1.*, ce type de régulation pourrait également s'appliquer aux phosphatases CDC25 pour lesquelles l'analyse est encore au stade *in vitro* (Rudolph, 2005). L'étude de cette régulation dans des cellules de cancer du sein sera l'objet du travail de thèse exposé dans ce manuscrit.

II.2.3. Les défenses antioxydantes dépendantes du système trx/trxR

II.2.3.1. Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (*prx*) sont des petites protéines (22-27 kDa) qui appartiennent à la famille des peroxydases dépendantes de la thiorédoxine. Il existe six isoformes fortement exprimées de façon ubiquitaire dans toutes les cellules des mammifères. Les peroxyrédoxines catalysent la réduction d' H_2O_2 , des hydroperoxydes organiques et du peroxy-nitrite par oxydation des cystéines catalytiques de leur site actif. Elles sont oxydées en présence d' H_2O_2 et réduites par le système trx/trxR (**figure 18**). Contrairement à la catalase qui n'agit principalement que dans les peroxysomes, les prx sont distribuées dans les différents compartiments intracellulaires ce qui leur permet de réguler la concentration en H_2O_2 directement à proximité des lieux de production, notamment au niveau de la mitochondrie ou des NADPH oxydases. Leur répartition dans les différents compartiments intracellulaires est dépendante de l'isoforme considérée : les peroxyrédoxines I, II et VI sont localisées dans le cytoplasme, les peroxyrédoxine III sont uniquement exprimées dans les mitochondries, les peroxyrédoxines IV sont situées dans le réticulum endoplasmique et dans les lysosomes alors que l'on trouve les peroxyrédoxines V dans le cytoplasme, dans les mitochondries et dans les peroxysomes. Toutes les peroxyrédoxines, à l'exception des peroxyrédoxines III sont retrouvées dans le noyau (Zhang *et al.*, 2009).

Les peroxyrédoxines I, II, III, IV et V contiennent deux cystéines au niveau de leur site actif alors que les peroxyrédoxines VI n'en contiennent qu'une seule. Des travaux récents suggèrent que les peroxyrédoxines possédant deux cystéines sont plus que de simples peroxydases puisqu'elles seraient capables de former des oligomères de haut poids moléculaire (décamère ou dodécamère) possédant une activité chaperonne dépourvue de fonction peroxydase (Barranco-Medina *et al.*, 2009). La perte de l'activité peroxydase se produit lors du processus catalytique suite à une hyperoxydation des cystéines du site actif en présence de fortes concentrations en H_2O_2 . Cette hyperoxydation avec formation d'un acide

sulfonique n'est pas résoluble par le système trx/trxR mais par des protéines récemment mises en évidence, les sulfirédoxines (**figure 18**) (Rhee *et al.*, 2005; Rhee *et al.*, 2007; Cox *et al.*, 2010).

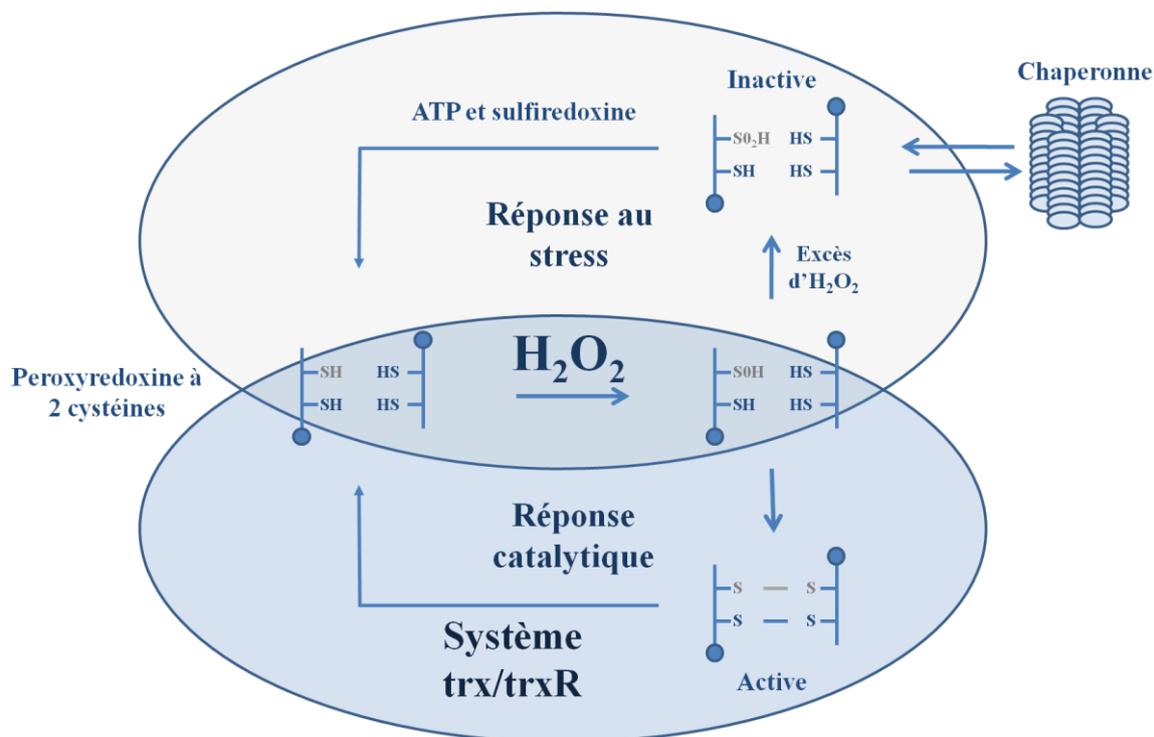


Figure 18 : Intervention du système trx/trxR dans la réponse catalytique des peroxyrédoxines (Kang *et al.*, 2005).

Cette propriété d'alternance entre la fonction de peroxydase et la fonction de chaperonne, associée à la capacité d'interaction des prx actives, particulièrement de la peroxyrédoxine 1, avec des protéines impliquées dans les voies de signalisation comme cAbl, JNK, PTEN ou ASK1 ont conduit à l'hypothèse que les prx et surtout les prx 1 fonctionneraient comme des senseurs redox transmettant un signal en réponse à une variation du niveau intracellulaire d'H₂O₂ (Fourquet *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009; Neumann *et al.*, 2009).

II.2.3.2. Les méthionine sulfoxyde réductases

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre II.1 les résidus méthionine des protéines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les ERO. L'oxydation des résidus méthionine des protéines engendre la formation d'isomères S- et R- de méthionine sulfoxyde (Met-(S)-SO et Met-(R)-SO). Les méthionine sulfoxyde réductases (MSR) catalysent la réduction des résidus méthionine oxydés. Il existe deux familles de MSR, MSR A et MSR B qui diffèrent par leur spécificité de substrat. MSR A catalyse la réduction des formes S de

méthionine sulfoxyde (*MetSO*) alors que MSR B est uniquement capable de réduire les formes R. Ces deux familles d'enzymes catalysent la réduction des *MetSO* au sein des protéines mais MSR A est également capable de réduire les *MetSO* libres. Le mécanisme catalytique des MSR est basé sur la chimie des acides sulféniques grâce à la présence d'une cystéine ou d'une sélénocystéine catalytique selon l'isoenzyme considérée. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de MSR B, MSR B1 qui contient une sélénocystéine et MSR B2 et B3 qui possèdent, comme MSR A, une cystéine catalytique. MSR B1 est présente dans le noyau et le cytosol, MSR A et B2 sont localisées dans la mitochondrie et MSR B3 est retrouvée dans la mitochondrie et dans le réticulum endoplasmique.

Le mécanisme catalytique est composé de trois étapes : premièrement, la cystéine ou la sélénocystéine est attaquée par le groupement sulfoxyde de la *MetSO* pour être oxydée en acide sulfénique, cette attaque s'accompagne d'une libération du résidu méthionine; deuxièmement, une autre cystéine (cystéine de résolution) interagit avec l'acide sulfénique pour former un pont disulfure intramoléculaire et troisièmement, ce pont disulfure est réduit par la thiorédoxine.

L'oxydation des résidus méthionine des protéines engendre une augmentation des charges négatives qui peut être à l'origine de changements structuraux, donc à l'origine d'une perte de fonction. En réduisant ces résidus *MetSO*, les MSR permettent de protéger l'activité des protéines concernées. De plus, les MSR peuvent travailler indirectement comme des « scavengers » d'ERO à travers l'oxydation et la réduction cyclique des méthionines. Le système méthionine/MSR peut donc assister d'autres systèmes redox comme le système *trx/trxR* ou le système du glutathion pour maintenir l'équilibre redox intracellulaire (Lee *et al.*, 2009; Aachmann *et al.*, 2010).

II.2.4. Les inhibiteurs du système *trx/trxR*

L'intervention du système thiorédoxine/thiorédoxine réductase dans des mécanismes cellulaires aussi importants que variés comme la réplication, l'apoptose, l'angiogenèse ou la régulation du statut redox en font une cible intéressante pour le développement de traitements anticancéreux. La littérature relate les effets de nombreuses molécules inhibitrices d'origine naturelles ou synthétiques. La stratégie de ce travail de thèse est basée sur l'utilisation d'inhibiteurs chimiques du système *trx/trxR*. C'est pourquoi une liste non exhaustive des inhibiteurs existants et de leurs effets cellulaires a été établie.

II.2.4.1. Les inhibiteurs de thiorédoxine réductase

II.2.4.1.1. Composés dérivé du platine

Les complexes métalliques à base de platine comme le cisplatine (cis-diaminedichloroplatine(II) (**figure 19**), le carboplatine ou l'oxaliplatine sont des composés couramment utilisés en chimiothérapie anticancéreuse (Boulikas and Vougiouka, 2004). Ce sont des agents alkylants de l'ADN (Wang and Lippard, 2005). Les dommages causés à l'ADN par ces composés engendrent l'activation ou l'inactivation de différentes voies de signalisation menant à un arrêt du cycle cellulaire, à une réparation de l'ADN ou à l'apoptose (Cepeda *et al.*, 2007). L'action cytotoxique du cisplatine serait de plus médiée par une inhibition irréversible de la trxR. En effet, une étude réalisée *in vitro* et dans des cellules HeLa a montré que le cisplatine induit une inhibition, dépendante de la dose et du temps de traitement, de la trxR humaine. Cette inhibition a d'ailleurs été corrélée avec une diminution de la viabilité cellulaire (Arner *et al.*, 2001). Contrairement au carboplatine qui n'induit aucune inhibition, l'oxaliplatine montre les mêmes propriétés inhibitrices de trxR que le cisplatine. L'action du cisplatine sur trxR serait localisée au niveau de la sélélocystéine située en C terminale de la protéine. En effet, le cisplatine n'a pas d'effet sur l'activité glutathion réductase, protéine de structure similaire à la trxR mais qui ne possède pas de sélénium (Witte *et al.*, 2005).

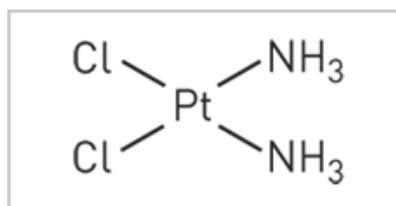


Figure 19 : Structure du cisplatine.

II.2.4.1.2. Composés dérivés de l'or

Les composés dérivés de l'or ont été utilisés au cours du siècle dernier pour traiter de nombreuses maladies mais leur usage moderne est restreint au traitement de l'arthrite rhumatoïde (Kean and Kean, 2008; Nobili *et al.*, 2010). Leurs capacités cytotoxiques récemment mises en évidence sur de nombreuses lignées cellulaires de cancers humains en font des candidats intéressants pour le développement de nouvelles chimiothérapies

anticancéreuses (Ronconi *et al.*, 2005; Ronconi *et al.*, 2006; Milacic *et al.*, 2008; Gandin *et al.*, 2010). Bien que leur mécanisme d'action global ne soit pas complètement élucidé, les composés dérivés de l'or sont susceptibles de s'intercaler dans l'ADN, d'inhiber différentes enzymes, d'induire un stress oxydant et/ou un arrêt du cycle cellulaire (Casini *et al.*, 2008; Nobili, Mini *et al.*, 2010). L'or est connu pour sa haute affinité avec les groupements thiols qui sont probablement les premières cibles de ces composés dans les cellules. Le groupement sélénoate nucléophile des trxR réduites est donc susceptible d'être le premier site modifié par ces métaux (Urig and Becker, 2006). Soutenant cette hypothèse, de nombreuses études ont montré une inhibition des thiorédoxines réductases par des composés dérivés de l'or (Rigobello *et al.*, 2004; Omata *et al.*, 2006; Marzano *et al.*, 2007; Viry *et al.*, 2008; Vergara *et al.*, 2010).

L'Auranofine (S-triethylphosphinegold (I)-2,3,4,6-tetra-Oacetyl-1-thio- β -D-glucopyranoside) (**figure 20**) est un composé dérivant de l'or (I) utilisé pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde sous le nom de « *Ridoura* ». *In vitro*, l'Auranofine inhibe la forme réduite de la trxR1, isolée à partir de placenta humain, à des concentrations de l'ordre du nM, avec un K_i de 4 nM en présence de 50 μ M de trx (Gromer *et al.*, 1998). Un traitement par l'Auranofine génère une production d'ERO et un relargage du cytochrome c (Marzano, Gandin *et al.*, 2007). Un tel traitement sur des mitochondries purifiées induit une inhibition de la trxR2 mitochondriale qui s'accompagne d'une altération de la perméabilité membranaire, d'une perte du potentiel de membrane et d'un relargage de protéines proapoptotiques telles que le cytochrome c (Rigobello *et al.*, 2002; Rigobello, Scutari *et al.*, 2004). De plus, une inhibition de la trxR2 mitochondriale par l'Auranofine induit une accumulation de peroxyde d'hydrogène (Rigobello *et al.*, 2005). Le traitement de cellules Jurkat humaines, issues d'un lymphome de lymphocytes T, par l'Auranofine induit une inhibition de trxR1 et de trxR2 qui s'accompagne d'une accumulation d' H_2O_2 comme observée *in vitro* (Rigobello *et al.*, 2008). En plus des composés dérivés de l'or (I) comme l'Auranofine, de nombreux autres dérivés avec différents degrés d'oxydation et différentes configurations « ligand-substrat » ont été évalués (Nobili, Mini *et al.*, 2010). Tous permettent une importante inhibition de la trxR1 à des concentrations de l'ordre du nM mais la puissance de l'inhibition semble être davantage affectée par la configuration « ligand-substrat » que par l'état d'oxydation des composés (Omata, Folan *et al.*, 2006).

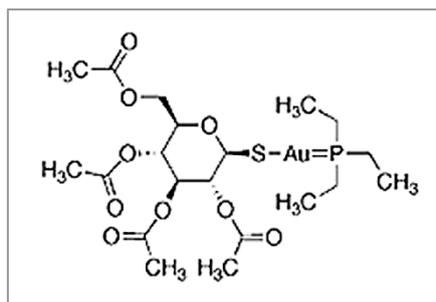


Figure 20 : Structure de l'Auranofine.

II.2.4.1.3. Composés nitroaromatiques

On trouve parmi les composés nitroaromatiques les premiers inhibiteurs de trxR qui ont été identifiés : le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (**figure 21**), le 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) ou le 1-bromo-2,4-dinitrobenzene (BDNB). Ils appartiennent à la classe des dinitrohalobenzenes. Le CDNB inhibe irréversiblement l'activité trxR par une dérivatisation dinitrophenyl au niveau du motif sélénothiol de l'extrémité C-terminale de la trxR réduite (Nordberg *et al.*, 1998). De plus, ce composé électrophile provoque une génération d'anion superoxyde en induisant une activité NADPH oxydase au niveau de la trxR inhibée. Le mécanisme moléculaire de cette activité implique une production de nitro-anions catalysée par le FAD au niveau des groupements dinitrophénol issus de la dérivatisation de l'enzyme. Ces radicaux vont réagir avec l'oxygène pour produire l'anion superoxyde (Nordberg, Zhong *et al.*, 1998; Cenas *et al.*, 2004).

Un traitement des cellules HeLa par le CDNB et d'autres composés nitroaromatiques (juglone, tetryl) induit une importante cytotoxicité par apoptose avec activation des caspases 3 et 7. De même, le CDNB est un puissant inducteur de l'apoptose dans des cellules HeLa ou dans des cellules A549 (Cellules de carcinome pulmonaire humain) surexprimant Bcl2 (Cenas *et al.*, 2006). Dans des cellules PC12 neuronales, le CDNB induit une apoptose des cellules corrélée à l'apparition d'un important stress oxydant (Seyfried and Wullner, 2007). L'inhibition de trxR par des composés nitroaromatiques pourrait donc contribuer à l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses humaines exposées.

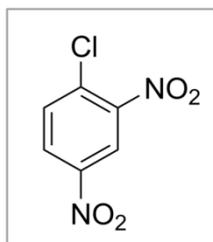


Figure 21 : Structure du CDNB.

II.2.4.1.4. L'arsenic trioxyde

L'arsenic trioxyde (ATO) (**figure 22**) est utilisé en chimiothérapie anticancéreuse sous le nom de « *Trisenox* » pour le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire récurrente ou réfractaire (Douer and Tallman, 2005). L'ATO exercerait son action cytotoxique *via* l'induction de la voie apoptotique mitochondriale (Miller, 2002). Les protéines contenant un taux élevé de cystéine avec des groupements thiols accessibles semblent être des cibles de l'ATO (Miller *et al.*, 2002). L'inhibition irréversible de *trxR in vitro* par l'arsenic trioxyde ($IC_{50} = 0,25 \mu M$) confirme cette hypothèse d'autant plus que seule la *trxR* réduite est inhibée. L'inhibition est donc dépendante de l'état redox de la protéine et une analyse en spectrométrie de masse suggère que le dithiol du site actif *N*-terminal et le séléniothiol du site actif *C*-terminal réagissent avec l'ATO. Une inhibition irréversible de *trxR* par l'arsenic trioxyde a également été mise en évidence dans des cellules MCF7 après 48 h de traitement. Cette inhibition s'accompagne d'une sévère oxydation de *trx* (Lu *et al.*, 2007).

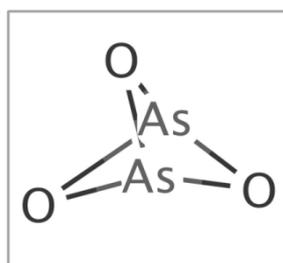


Figure 22 : Structure de l'arsenic trioxyde.

II.2.4.1.5. Le motexafin gadolinium

Le motexafin gadolinium (MGd) est une texaphyrine (molécule de la famille des porphyrines) complexée avec le gadolinium (III) (**figure 23**). Le MGd est actuellement testé en essais cliniques de phase III sous le nom de « *Xcytrin* » pour le traitement de différents types de cancers (poumon, cerveau, pancréas...). Les propriétés anticancéreuses de ce

composé sont dues à son métabolisme intracellulaire qui fait intervenir un cycle redox avec production d'anion superoxyde et d'autres ERO. Cette production d'espèces réactives de l'oxygène lors du métabolisme du MGd va engendrer l'oxydation d'autres métabolites tels que le NADPH, le GSH ou l'acide ascorbique, qui pour être actifs doivent impérativement être sous forme réduite (Magda and Miller, 2006). Ainsi, en rendant le milieu intracellulaire pro-oxydant, il est capable de respectivement promouvoir ou induire la cytotoxicité de la dexaméthasone dans des lignées cellulaires de myélomes multiples qui y sont sensibles ou à l'inverse hautement résistantes (Evens *et al.*, 2005).

Le MGd est également capable d'inhiber l'activité réductase de trxR1 et d'induire l'activité oxydase, générant ainsi de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Le MGd est réduit par le sélénothiol du site actif en C-terminal de la trxR1 et non pas par le FAD ou le dithiol N-terminal (Hashemy *et al.*, 2006). Il est ainsi plutôt un substrat non protéique de trxR1 qu'un inhibiteur (Arner, 2009). Le MGd est aussi un puissant inhibiteur de ribonucléotide réductase. Ses effets inhibiteurs sur ces activités enzymatiques contribuent probablement de façon importante aux effets anticancéreux. En effet, d'un part, l'inhibition du système trx/trxR associée à une production d'ERO est susceptible d'induire un important stress oxydant qui a pour conséquence le déclenchement de l'apoptose *via* l'oxydation des trx et le déclenchement de la voie ASK1. D'autre part, l'inhibition de la ribonucléotide réductase provoque un arrêt de la synthèse et de la réparation de l'ADN et donc un arrêt de la multiplication cellulaire (Hashemy, Ungerstedt *et al.*, 2006).

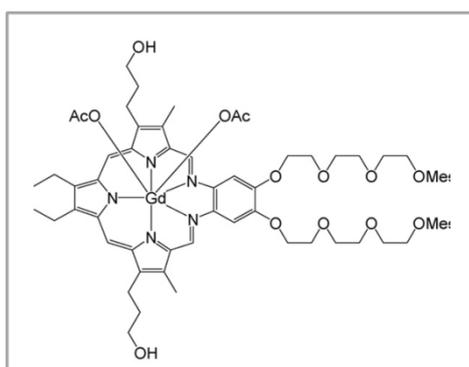


Figure 23 : Structure du motexafin gadolinium.

II.2.4.1.6. Curcumine et flavonoïdes

La Curcumine et les flavonoïdes sont des polyphénols, composés naturels issus des plantes, qui ont été identifiés comme des agents anticancéreux potentiels grâce à leur action inhibitrice de trxR.

La curcumine (**figure 24**) inhibe irréversiblement l'activité trxR *in vitro* ($IC_{50} = 3,6 \mu M$) et dans les cellules HeLa ($IC_{50} = 15 \mu M$) en alkylant les cystéines 496 et 497 du site actif redox en C terminal de la protéine. L'enzyme modifiée est convertie en enzyme pro-oxydante avec une activité NADPH oxydase (Fang *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes tels que la myricétine (**figure 24**) et la quercétine (**figure 24**) ont un mode d'action similaire avec une production d'ERO et une inhibition de la trxR avec des IC_{50} , *in vitro*, équivalents à 0,62 et 0,97 μM respectivement. Ces composés ont une action cytostatique sur les cellules A549 corrélée à une inhibition de trxR et une oxydation de trx. La quercétine induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S alors que la myricétine stoppe le cycle en phase sub-G1 (Lu *et al.*, 2006).

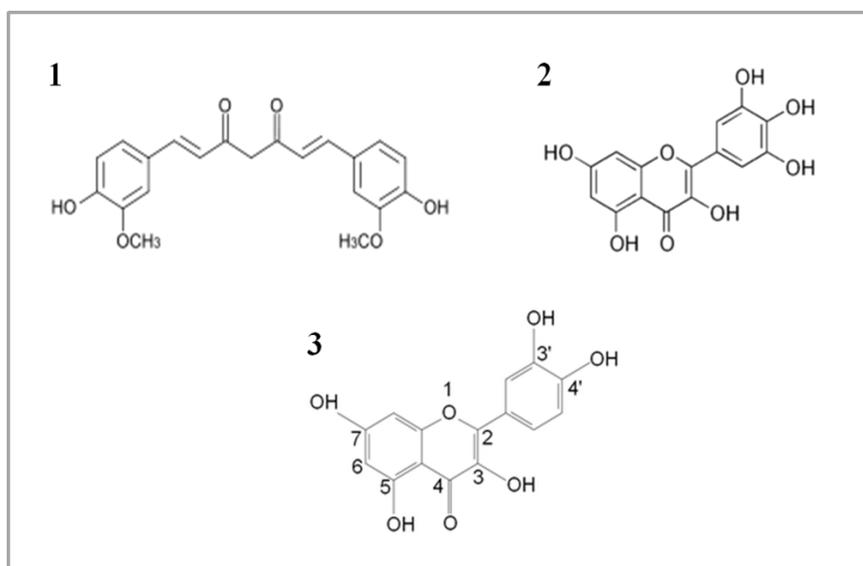


Figure 24 : Structure de la curcumine (1) et de la myricétine (2) et de la quercétine (3).

II.2.4.2. Les inhibiteurs de thiorédoxine

II.2.4.2.1. 1-méthyl-propyl-2-imidazolyl disulfide

Le 1-méthyl-propyl-2-imidazolyl disulfide (PX-12) (**figure 25**) est un composé de synthèse présentant une importante activité antitumorale (Kirkpatrick *et al.*, 1998; Baker *et al.*, 2006). En effet, le 1-méthyl-propyl-2-imidazolyl disulfide possède des capacités cytostatiques et cytotoxiques sur différentes lignées cellulaires en culture (Kunkel *et al.*, 1997). Le PX-12 inhibe de façon dose-dépendante la croissance de xénogreffes de cellules MCF7 et de cellules HL-60 (cellules de leucémie promyélotiques) dans des souris SCID (Kirkpatrick *et al.*, 1999).

Le PX-12 provoque une thioalkylation réversible des Cystéine 32 et 35 du site catalytique de *trx1* et une thioalkylation irréversible de la Cystéine 73 qui est à l'extérieur du site catalytique. Ces modifications empêchent la thiorédoxine réductase 1 de reconnaître *trx1* en tant que substrat. Sa réduction n'étant plus possible, cette dernière est inactivée (Kirkpatrick, Kuperus *et al.*, 1998). Dans des lignées de cellules cancéreuses (MCF7, HT29), cette inactivation induit une diminution du niveau intracellulaire de la protéine HIF-1 α et bloque la formation de VEGF (Welsh *et al.*, 2003). Chez des patients porteurs de tumeurs solides, cette inactivation induit une diminution du taux plasmatique de *trx1* et de VEGF (Baker, Dragovich *et al.*, 2006). De plus, l'inactivation de *trx1* par le PX-12 interrompt l'interaction entre *trx-1* et ASK1 entraînant l'activation de la voie apoptique *via* l'activation de JNK (Lee *et al.*, 2002). Après avoir été testé en phase I d'essais clinique (Ramanathan *et al.*, 2007), le PX-12 a récemment été évalué en phase II pour le traitement du cancer du pancréas mais il s'est révélé inefficace en tant que monothérapie dans les conditions testées (Ramanathan *et al.*, 2010).

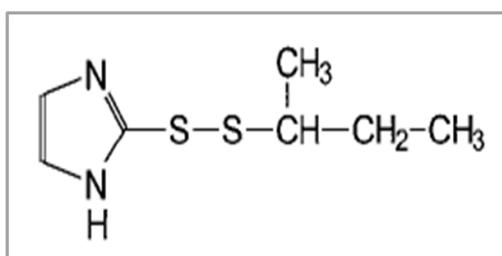


Figure 25 : Structure du PX-12.

II.2.4.2.2. 4-(benzothiazol-2-yl)-4-hydroxycyclohexa-2,5-dienone (AW464)

Le « AW464 » également appelé « PMX464 » est une quinone substituée par un benzothiazol (**figure 26**). Une analyse du « National Cancer Institute » montre que sur un panel de 60 lignées cellulaires, le AW464 est particulièrement actif sur les cellules de cancer du colon, de cancer rénal ou de cancer du sein (MCF7, MDA-MB231, MDA-N). Sur plus de 10000 gènes testés dans les cellules HCT116 (cellules d'adénocarcinome colloïde) traitées par 1 mM de AW464 pendant 24 h, seul le gène codant pour *trxR* est surexprimé de plus de 3 fois. Le AW464 est capable de se lier aux cystéines 32 et 35 du site actif de *trx* et cette liaison engendre une inhibition de l'activité de *trx* (Bradshaw *et al.*, 2005). Le AW464 possède des effets antiprolifératifs et antiangiogéniques sur des cellules de cancer colorectal (HT29, SW480, SW620) et sur des cellules endothéliales normales. Ces effets sont favorisés en

conditions d'hypoxie. Par contre, cet inhibiteur de trx n'a pas d'effet sur des fibroblastes (Mukherjee *et al.*, 2005). Le AW464 diminue l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α , la liaison à l'ADN et l'expression de VEGF bien que le taux de HIF-1 α intracellulaire augmente, probablement par inhibition de sa dégradation (Jones *et al.*, 2006).

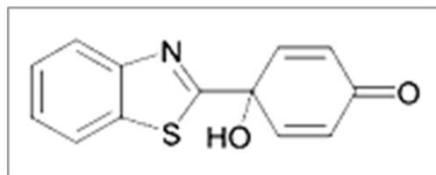


Figure 26 : Structure du AW464.

II.2.4.3. Polluants environnementaux : Acroléine et Chrome hexavalent, deux inhibiteurs de thiorédoxine et de thiorédoxine réductase

L'acroléine (**figure 27**), encore appelée 2-propenal est un aldéhyde aliphatique insaturé, extrêmement réactif et toxique par inhalation et ingestion. C'est un irritant majeur présent dans la fumée de cigarette. L'acroléine trouve son origine dans les phénomènes de combustion (combustion du bois, combustion interne des moteurs, combustion des acides gras...). Dans les cellules, c'est un produit endogène de la peroxydation lipidique et un métabolite des polyamines, en particulier de l'allylamine (Wang *et al.*, 2011). De plus, l'acroléine est un métabolite secondaire des cyclophosphamides fréquemment utilisé en chimiothérapie anticancéreuse dans le traitement du cancer du sein (Ludeman, 1999). L'acroléine est hautement toxique pour de nombreux types cellulaires incluant les cellules épithéliales bronchiques humaines, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses des vaisseaux et les cellules endothéliales.

L'acroléine est électrophile, et réagit donc rapidement avec les groupements nucléophiles, en particulier les thiols intracellulaires comme ceux des thiorédoxines réductases. Dans des cellules humaines d'épithélium bronchique (BEAS-2B), l'activité trxR est inhibée de façon irréversible à plus de 85% lorsque les cellules sont traitées par 5 μ M d'acroléine pendant 30 min. Cette inhibition de trxR est concomitante avec une oxydation des thiorédoxines 1 et 2 (Myers and Myers, 2009).

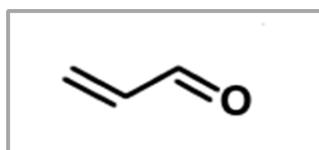


Figure 27 : Structure de l'Acroléine.

Le chrome hexavalent ou chrome VI (6^e état d'oxydation du chrome) est produit et utilisé dans l'industrie de l'acier et du textile. C'est un composé particulièrement toxique par inhalation et qui peut provoquer d'importantes réactions allergiques par contact avec la peau. Le chrome VI entre facilement dans les cellules où il est réduit en espèces réactives du chrome qui contribueront à la production d'ERO. De par son état d'oxydation, il est susceptible d'influencer le statut redox et la balance des thiols intracellulaires. Ainsi, un traitement de cellules épithéliales bronchiales humaines par le chrome VI induit une oxydation dépendante de la dose et du temps des trx1 et trx2 qui est reversée suite à l'ajout d'agent réducteur comme le TCEP (Myers *et al.*, 2008). Cette oxydation est consécutive à une inhibition de l'activité trxR qui n'est pas restituée après retour des cellules dans du milieu complet ou après ajout de NADPH. De plus, l'inhibition de la trxR par le chrome hexavalent n'induit pas la synthèse *de novo* de trxR (Myers and Myers, 2009).

III. ERO, SYSTEME TRX/TRXR ET PHOSPHATASES CDC25 DANS LE CANCER

III.1. Statut redox des cellules cancéreuses

Comparés aux cellules normales, de nombreux types de cellules cancéreuses semblent fonctionner avec un haut niveau d'ERO intracellulaires aussi bien en culture que *in vivo* (Pelicano *et al.*, 2004; Schumacker, 2006; Trachootham *et al.*, 2009; Wondrak, 2009). Par exemple, le taux d'ERO intracellulaire est plus élevé dans des cellules de leucémies que dans des lymphocytes normaux (Zhou *et al.*, 2003). C'est également le cas pour différents types de tumeurs solides (cancer du sein, du poumon, de la prostate, des reins...), issus de prélèvements cliniques ou issus de cultures cellulaires, pour lesquelles des études ont montré une augmentation des ERO pouvant être accompagnée par une augmentation des produits issus des dommages oxydants tels que des bases oxydées de l'ADN comme la 8OHdG (8-hydroxy-désoxyguanosine) ou des produits de peroxydation lipidique (Toyokuni *et al.*, 1995; Ray *et al.*, 2000; Hileman *et al.*, 2004; Tas *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2007; Tsao *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008). Bien que les voies conduisant à une élévation du taux d'ERO dans les cellules cancéreuses ne soient pas encore totalement élucidées, de nombreux mécanismes susceptibles de causer un stress oxydant lors du développement et de la progression d'un cancer sont incriminés. L'activation d'oncogènes, une dérégulation métabolique, un dysfonctionnement mitochondrial, une diminution de l'expression de certaines enzymes antioxydantes ou une perte de fonction de la protéine p53 sont des facteurs connus pour engendrer une importante production d'ERO dans les cellules cancéreuses (Pelicano, Carney

et al., 2004; Tas, Hansel *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Olovnikov *et al.*, 2009; Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009). Aux stades les plus avancés de la transformation maligne, stress oxydant et mutagénèse se succèdent dans un cercle vicieux selon lequel les ERO induisent des mutations dans l'ADN nucléaire et mitochondrial, provoquant des dysfonctionnements métaboliques associés à une augmentation de la production d'ERO (**figure 28**) (Pelicano, Carney *et al.*, 2004; Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009; Ralph *et al.*, 2010).

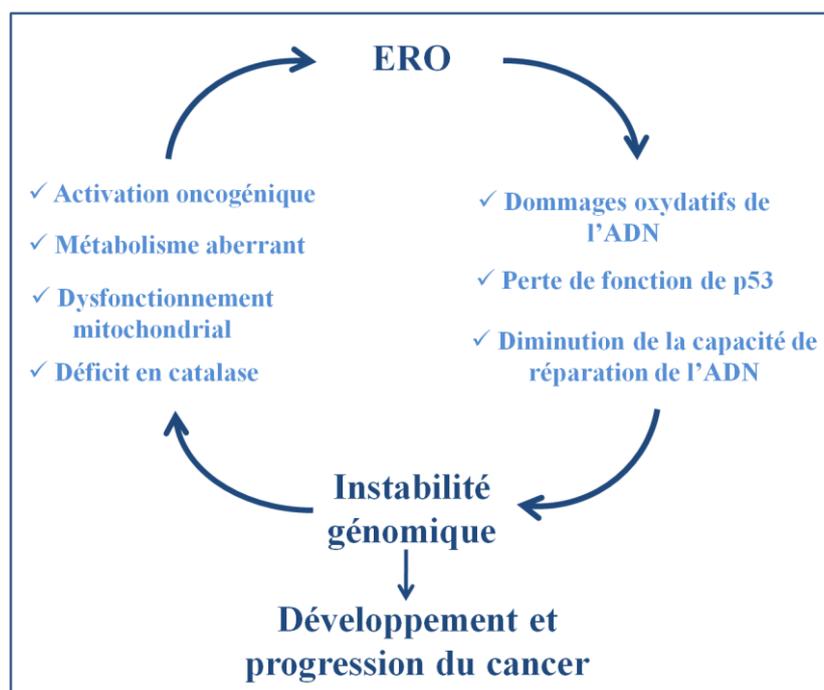


Figure 28 : Cercle vicieux de la production d'ERO dans les cellules cancéreuses (Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009).

L'installation d'un déséquilibre redox est susceptible d'induire différentes réponses biologiques dépendantes de l'intensité du stress et des capacités d'adaptation des cellules concernées. L'effet induit (prolifération, arrêt de la croissance cellulaire, sénescence, apoptose, nécrose) dépendra des voies de signalisation activées. Il semblerait que les cellules cancéreuses aient acquis des mécanismes d'adaptation au stress oxydant afin de contrecarrer les effets toxiques des ERO et de promouvoir les voies de survie cellulaire. En effet, sous la pression sélective imposée par leur statut redox élevé, une population de cellules cancéreuses pourrait s'enrichir en cellules capables de survivre en présence d'une forte quantité d'ERO. Il est ainsi concevable que durant la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale, les oncogènes induisent à la fois un signal qui engendre la production d'ERO pour augmenter la prolifération cellulaire et un signal qui induit le développement de mécanismes adaptatifs

pour minimiser les dommages oxydatifs. Bien qu'il ait été observé que la diminution de l'expression de certaines enzymes éliminatrices d'ERO comme la catalase puisse participer à l'instauration du stress oxydant dans certaines tumeurs, de nombreux auteurs considèrent au contraire que le mécanisme d'adaptation prédominant des cellules cancéreuses contre la surproduction d'ERO est la surexpression ou l'augmentation de l'activité d'une ou plusieurs enzymes antioxydantes (Pelicano, Carney *et al.*, 2004; Valko, Rhodes *et al.*, 2006; Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009). Le cas du système trx/trxR en est un exemple d'importance.

III.2. Système thiorédoxine/thiorédoxine réductase et cancer

Une augmentation de l'expression des trx et/ou des trxR a été mise en évidence dans des cancers solides tels que des cancers colorectaux, hépatiques, pancréatiques, pulmonaires et des cancers du sein (Berggren *et al.*, 1996; Lincoln *et al.*, 2003; Biaglow and Miller, 2005; Cha *et al.*, 2009). Une surexpression des trx a également été mise en évidence dans des lymphomes ou des leucémies (Shao *et al.*, 2001) ou dans différentes lignées cellulaires cancéreuses telles que MCF7 (adénocarcinome mammaire humain) ou HT29 (adénocarcinome humain de colon), suite à une stimulation par un apport de sérum (Berggren, Gallegos *et al.*, 1996). L'activité élevée du système trx/trxR, engendrée par la surexpression de ses membres, est souvent associée à des phénotypes tumoraux plus agressifs (Arner, 2009). Ainsi, l'augmentation de l'expression de la trx1 dans des cellules issues de patients atteints de cancers colorectaux est corrélée à une diminution de la survie de ces patients (Raffel *et al.*, 2003). En 2003, Lincoln *et al* ont montré que le système trx/trxR était surexprimé dans différents types de cellules tumorales agressives, résistantes à l'apoptose et présentant un potentiel métastatique élevé. De plus, l'utilisation d'ARN interférent pour la trxR1 conduit des carcinomes de poumon vers un phénotype similaire aux cellules normales (Yoo *et al*, 2006). Cette corrélation entre l'expression des trx/trxR et le phénotype plus ou moins agressif des tumeurs suggère que le système trx/trxR pourrait être impliqué dans les processus d'oncogenèse et de tumorigenèse.

Dans un article décrivant les caractéristiques du cancer, Hanahan et Weinberg ont souligné que la malignité d'une cellule tumorale reflète six capacités nouvelles, à savoir, une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, un échappement à l'apoptose, un potentiel illimité de réplication, une stimulation de l'angiogenèse et un pouvoir d'invasion et de dissémination à distance

(Hanahan and Weinberg, 2000). Selon la littérature, il semblerait que le système trx/trxR pourrait intervenir dans l'acquisition et le maintien de la plupart, voir de toutes ces aptitudes sans pour autant que son rôle et son importance dans ces différents phénomènes soit clairement défini (Farina *et al.*, 2001; Welsh *et al.*, 2002; Biaglow and Miller, 2005; Enoksson *et al.*, 2005; Gan *et al.*, 2005; Arner and Holmgren, 2006; Marks, 2006). Le rôle du système trx/trxR dans le développement tumoral semble être lié au stade d'évolution du cancer. Ainsi, avant la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse, les thiorédoxines jouent davantage un rôle protecteur puisqu'elles contrecarrent le stress oxydant susceptible d'être induit par de nombreux carcinogènes. Une fois le phénotype cancéreux apparu, une expression importante des trx ou des trxR pourrait promouvoir la croissance tumorale grâce à leurs fonctions anti-apoptotiques et pro-répliquatives. Par exemple, il a été montré qu'une surexpression des thiorédoxine réductase 1 dans des tumeurs mammaires est associée à un mauvais pronostic clinique (Cadenas *et al.*, 2010). Trx et trxR pourraient finalement intervenir dans l'installation du stade métastatique du cancer en favorisant l'angiogenèse et l'invasion tissulaire (Tonissen and Di Trapani, 2009).

De plus, la surexpression des acteurs du système trx/trxR dans des cellules cancéreuses semble favoriser le développement de résistance à certains médicaments. En effet, un niveau intracellulaire élevé en trx1 est associé à une résistance au cisplatine dans des lignées cellulaires issues de cancers de la vessie, de la prostate, de l'estomac ou du colon (Yamada *et al.*, 1996). Dans la lignée MCF7, la résistance à l'apoptose induite par le cisplatine est liée à une surexpression de la thiorédoxine 1 nucléaire qui induirait une surexpression de la protéine anti-apoptotique p53 (Chen *et al.*, 2007). Une résistance de cette même lignée cellulaire au tamoxifène est quant à elle associée à une surexpression d'un panel de protéines antioxydantes, dont la trx, suite à l'activation au niveau de l'ADN de l'élément de réponse « ARE » (*antioxydant response element*) par la protéine Nrf2 (*NF-E2-related factor 2*) (Kim *et al.*, 2008). Dans des tumeurs de sein issues de patientes, Kim *et al.* ont montré en 2005 qu'une surexpression des trx est associée à un phénomène de résistance au traitement par le Docetaxel (Kim *et al.*, 2005). A l'inverse, la diminution du niveau de trx1, par l'utilisation d'ARN antisens, conduit à une augmentation de la sensibilité de différentes lignées cellulaires cancéreuses non seulement au cisplatine mais aussi à d'autres agents anticancéreux comme la doxorubicine et l'étoposide (Yokomizo *et al.*, 1995). Cependant, une seule surexpression de trx ne semble pas être suffisante pour le phénomène de résistance puisqu'une transfection de cellules cancéreuses ovariennes avec trx1 n'augmente pas la résistance de ces cellules au cisplatine, à la doxorubicine ou à la mitomycine (Yamada *et al.*, 1997).

III.3. Phosphatases CDC25 et cancer

Comme cela a été évoqué dans le premier chapitre, les phosphatases CDC25 jouent un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire en assurant le maintien, dans le temps et dans l'espace, de l'activité des complexes cycline/CDK. Les CDC25 font elles-même l'objet d'une fine régulation afin d'être inactivées au niveau des « checkpoints » du cycle cellulaire pour laisser à la cellule le temps de réparer d'éventuels dommages au niveau de son ADN. Une dérégulation de ce processus, au même titre qu'une surexpression des CDC25, est susceptible d'induire une accumulation d'anomalies génétiques, premier pas vers la transformation cancéreuse. Illustrant ce postulat, une étude récente sur des souris transgéniques a montré qu'une surexpression de CDC25A coopère avec les oncogènes « ras » et « neu » dans la promotion de la tumorigenèse de glandes mammaires murines en favorisant l'instabilité génomique (Ray *et al.*, 2007; Ray and Kiyokawa, 2008).

Une surexpression des phosphatases CDC25A et B a été mise en évidence dans de nombreux types de cancers solides tels que des cancer du sein, de la thyroïde, du foie, des ovaires, du colon, de la prostate, des poumons, de l'œsophage, du larynx, de l'estomac, du pancréas, de l'endomètre, de la tête et du cou mais également dans des neuroblastomes et glioblastomes ou dans des lymphomes non-Hodgkinien (**figure 29**). Une surexpression des CDC25C est moins fréquemment observée, mais elle a toutefois été mise en évidence dans des échantillons issus de lymphomes non-Hodgkinien, de cancer colorectaux, endométrial et vulvaire (Kristjansdottir and Rudolph, 2004; Boutros, Lobjois *et al.*, 2007; Aressy and Ducommun, 2008; Kiyokawa and Ray, 2008; Xing *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Cependant, la surexpression mise en évidence au niveau des ARNm ne se traduit pas toujours par une surexpression des protéines et inversement. Par exemple, dans une étude sur des biopsies de neuroblastomes, les ARNm de CDC25B étaient surexprimés à 80 % alors que le taux de surexpression des protéines n'était que de 5% dans les mêmes échantillons (Wu *et al.*, 1998; Takemasa *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2001). Dans de nombreuses études, la surexpression des CDC25 est corrélée avec un mauvais pronostic clinique associé à un cancer agressif (Aressy and Ducommun, 2008). Toutefois, dans le cas du cancer du sein notamment, cette corrélation n'est pas absolue puisqu'elle n'a pas été retrouvée dans tous les types de tumeurs étudiées (Galaktionov *et al.*, 1995; Cangi *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2004).

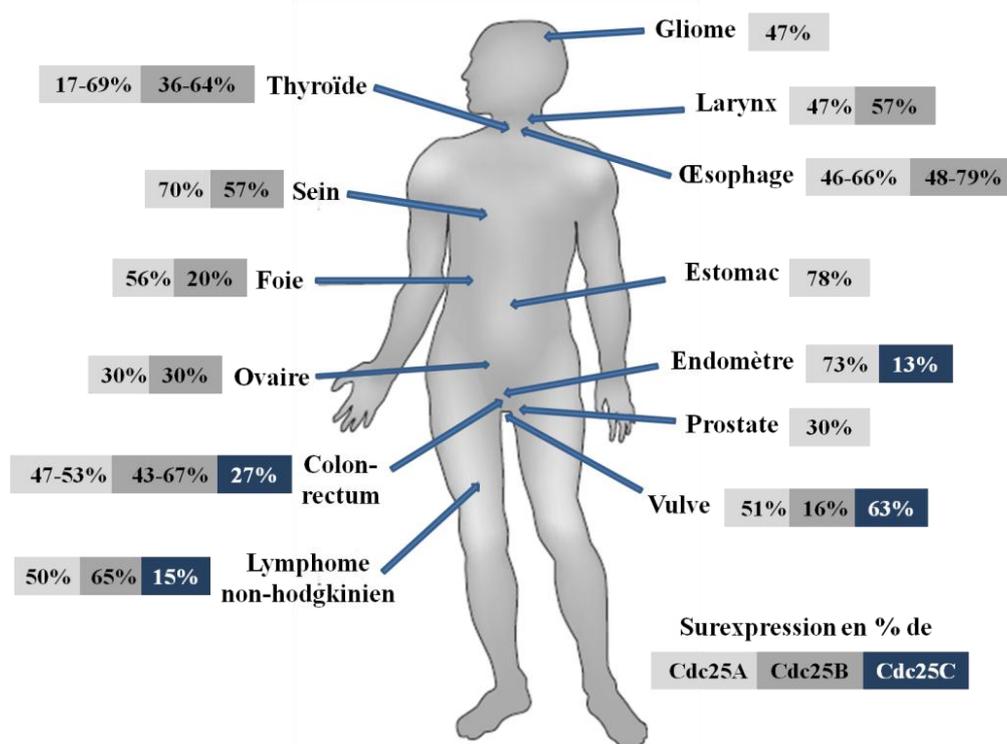


Figure 29 : Surexpression des phosphatases CDC25 dans différents cancers humains (Boutros, Lobjois *et al.*, 2007; Wang, Trope *et al.*, 2010).

Les mécanismes qui modifient la régulation de l'expression des CDC25 durant la tumorigenèse n'ont pas encore été clairement élucidés. Il n'y a actuellement aucune preuve qui montrerait que la surexpression des CDC25 dans le cancer serait due à une amplification, une mutation ou des réarrangements génétiques. De plus, le manque de corrélation entre les niveaux de transcrits et de protéines suggère que la variation de la quantité de CDC25 peut prendre place à n'importe quel niveau entre la transcription et la traduction, ou encore être due à des modifications post-traductionnelles. D'un point de vue transcriptionnel, la surexpression des transcrits de CDC25A est corrélée avec l'activation du proto-oncogène *c-myc* dans le cancer du sein (Boutros, Lobjois *et al.*, 2007). D'un point de vue post-traductionnel, la surexpression des CDC25A dans des lignées cellulaires de cancer du sein est corrélée avec une augmentation de leur demi-vie (Loffler *et al.*, 2003). Pour expliquer un tel gain de stabilité, des pistes récentes ont été mises en évidence. Ainsi, l'équipe de Pereg *et al.* a montré l'existence d'une corrélation entre la surexpression de CDC25A et la surexpression de la protéine Dub3 (*enzyme de dé-ubiquitinylation 3*) dans un panel de tumeurs mammaires. Dub3 est une ubiquitine hydrolase empêchant la dégradation de la phosphatase par le protéasome. Sa surexpression a pour conséquence une accumulation anormale de CDC25A (Pereg *et al.*, 2010). De même, une corrélation entre la surexpression de CDC25A et

l'inactivation de la protéine GSK-3 β a été mise en évidence dans des tissus tumoraux humains lors d'une étude réalisée par Kang *et al* en 2008. L'inactivation de cette kinase qui favorise l'ubiquitylation de CDC25A (*cf 1.2.4.1.*) permet elle aussi un accroissement aberrant de la quantité de CDC25A (Kang, Wei *et al.*, 2008).

OBJECTIFS ET STRATEGIE

I. Objectifs

La dérégulation de l'expression des phosphatases CDC25 (Boutros, Lobjois *et al.*, 2007) et des éléments du système trx/trxR (Mukherjee and Martin, 2008) dans le cancer ainsi que leurs rôles supposés dans la tumorigenèse en font des cibles de choix pour l'élaboration de thérapeutiques anticancéreuses. Comme nous l'avons précisé dans l'introduction de ce travail, les phosphatases CDC25 sont inactivées, *in vitro*, par le peroxyde d'hydrogène et réactivables par le système trx/trxR (Sohn and Rudolph, 2003). L'existence d'une telle régulation fonctionnelle dans les cellules cancéreuses permettrait à ces dernières de profiter pleinement du potentiel oncogénique des CDC25 afin de se diviser sans relâche. En effet, comme nous l'avons précisé dans le chapitre II.1., les cellules cancéreuses semblent présenter fréquemment un statut redox intracellulaire plus pro-oxydant que les cellules normales (Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009). Cependant, de telles conditions pro-oxydantes pourraient être délétères pour l'activité des phosphatases CDC25. De ce fait, la protection de l'activité de ces dernières par le système trx/trxR pourrait constituer un mécanisme adaptatif primordial pour la prolifération des cellules tumorales. De plus, le maintien de l'activité des CDC25 par le système trx/trxR en conditions de stress oxydant pourrait être un mécanisme impliqué dans la résistance des cellules cancéreuses à certains traitements chimiothérapeutiques générateurs d'ERO tels que la doxorubicine.

Bien qu'une ancienne étude, datant de 1993, ait suggéré l'existence d'une telle régulation dans des cellules embryonnaires (Natsuyama, Noda *et al.*, 1993), aucune étude récente n'a clairement démontré l'inactivation des CDC25 par les ERO et leur réactivation par les trx *in cellulo* et en particulier dans des cellules cancéreuses.

Ainsi ce travail de thèse a pour objectif de **préciser l'influence du système trx/trxR sur la modulation redox de l'activité CDC25 dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire humain**. Ce travail permettra d'apporter des éléments de réponse aux questions suivantes pour ces lignées cellulaires :

- L'activité CDC25 est-elle inhibée en condition de stress oxydant dans des cellules issues d'adénocarcinome mammaire ?
- Une inhibition du système trx/trxR a-t-elle un impact sur l'activité CDC25 dans les cellules cancéreuses ?

Mettre en évidence un tel mécanisme de régulation et comprendre les modalités par lesquelles il s'opère fourniraient des informations utiles afin de définir quelle est la cible thérapeutique de plus grand intérêt entre les CDC25 ou le système trx/trxR. En effet, si l'existence d'une

telle régulation dans les cellules cancéreuses se confirme, une inhibition du système trx/trxR pourrait suffire à induire un arrêt du cycle cellulaire *via* notamment une inhibition redox des phosphatases CDC25, et ceci particulièrement en présence d'un traitement anticancéreux pro-oxydant.

II. Stratégie

La stratégie adoptée afin de répondre aux objectifs énoncés consiste à étudier dans un premier temps la régulation des CDC25 par le peroxyde d'hydrogène et le système trx/trxR *in vitro* avant de continuer dans un deuxième temps cette étude sur des lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire.

En 2003, le travail de Sohn et Rudolph a démontré, *in vitro*, le rôle du système trx/trxR dans la réactivation des CDC25 suite à leur oxydation par le peroxyde d'hydrogène et ce, sur les domaines catalytiques des CDC25B et C. Ainsi, avant de commencer l'étude *in cellulo*, il sera intéressant de vérifier également la sensibilité de l'isoforme A dans nos conditions de travail. Pour cela, l'étude sera réalisée avec des protéines de fusion GST-CDC25 préalablement purifiées et les activités enzymatiques seront réalisées en spectrofluorimétrie en présence de peroxyde d'hydrogène.

L'étude *in cellulo* commencera par le choix des lignées cellulaires d'intérêt. Pour cela, le niveau d'expression des thiorédoxines et des thiorédoxines réductases sera évalué dans différentes lignées d'adénocarcinome mammaire (MCF7, MDA-MB 231, VCREMS, DOXOR...). Le but étant de choisir et d'utiliser deux lignées possédant des profils d'expression différents afin de pouvoir discerner d'éventuelles variations au niveau des réponses cellulaires aux traitements qui seront effectués.

Ainsi, la sensibilité des CDC25 au peroxyde d'hydrogène sera évaluée dans les lignées cellulaires choisies mais également dans une lignée MCF7 surexprimant la MnSOD, enzyme productrice de peroxyde d'hydrogène. Le développement préalable de cette lignée sera un outil expérimental intéressant car la surexpression de la MnSOD devrait engendrer la production endogène de plus grande quantité d'H₂O₂, rendant le milieu intracellulaire davantage pro-oxydant.

Ensuite, afin d'étudier le rôle du système trx/trxR dans la régulation redox des CDC25, nous évaluerons les effets d'une inhibition chimique soit de la thiorédoxine réductase avec l'Auranofine, soit de la thiorédoxine avec l'Acroléine, sur l'activité CDC25 dans les lignées cellulaires choisies. Ces deux inhibiteurs, Auranofine et Acroléine ont été choisis parmi les

composés cités dans le chapitre « *Introduction, II.2.4.1* », pour leurs effets démontrés dans d'autres lignées cellulaires et leur disponibilité commerciale.

Afin d'évaluer l'impact des différentes conditions de traitement précédemment citées sur le cycle cellulaire et notamment sur l'activité CDC25, la viabilité cellulaire, la quantité relative des ERO intracellulaires, l'activité trxR ou encore l'analyse du contenu en glutathion et en ADN seront mesurés. L'activité des CDC25 sera évaluée grâce à l'estimation du niveau de phosphorylation de ses substrats naturels : CDK1 et CDK2.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. MODULATION REDOX DE L'ACTIVITE CDC25 PAR LE PEROXYDE D'HYDROGENE

I.1. Modulation redox de l'activité CDC25 par H₂O₂ *in vitro*

I.1.1. Inhibition des phosphatases CDC25 par H₂O₂

En 2003, Sohn et Rudolph ont montré que les domaines catalytiques des CDC25B et C sont sensibles à l'oxydation par H₂O₂ ce qui inhibe leur activité enzymatique, *in vitro*. Dans notre étude, nous avons étudié l'effet d'un traitement par H₂O₂ sur l'activité des protéines de fusion GST-CDC25A et C tout en contrôlant notre travail avec une protéine de fusion GST couplé avec le domaine catalytique de CDC25B. Comme le montre la **figure 30**, le peroxyde d'hydrogène inhibe l'activité CDC25 de façon dose-dépendante. Les activités de **CDC25A et CDC25B** présentent une importante sensibilité à H₂O₂ avec respectivement une CI₅₀ de 100 ± 4.6 µM et 75 ± 3.3 µM. Par contre, l'activité de CDC25C est moins sensible que celle des autres isoformes avec une CI₅₀ de 300 µM.

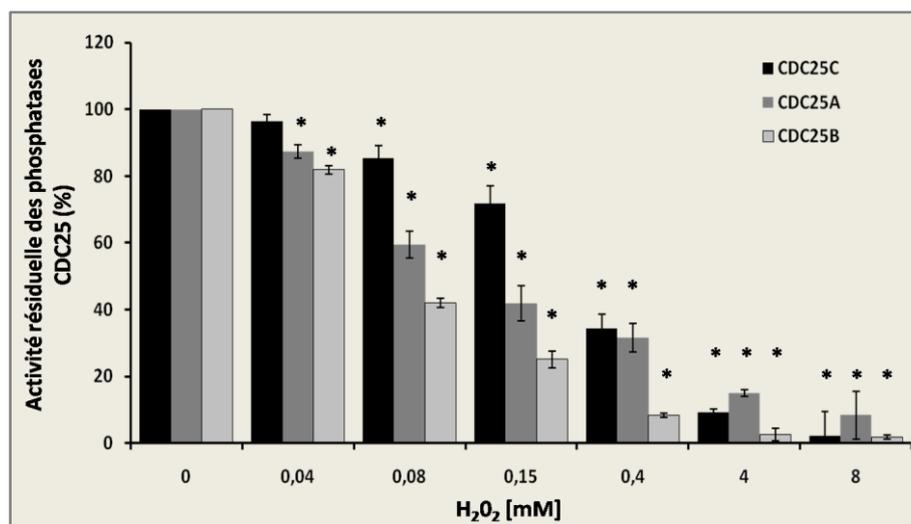


Figure 30 : Inhibition de l'activité phosphatase des protéines de fusion GST - CDC25A, B et C par le peroxyde d'hydrogène, *in vitro*.

L'activité des phosphatases CDC25A, B et C a été évaluée par la mesure spectrophotométrique de la déphosphorylation de l'OMFP. Les phosphatases CDC25 ont été mises en présence de concentrations croissantes [0-8 mM] de H₂O₂ pendant 2 min à 37°C. L'excès d'H₂O₂ a été éliminé par ajout de catalase (25U). La mesure de l'activité enzymatique a été réalisée en cinétique à 37°C durant 15 min. L'activité résiduelle est exprimée en % du contrôle qui correspond à l'activité des CDC25 non traitées. Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : P < 0.05, (n = 3).

I.1.2. Réactivation de CDC25A par le TCEP et le système trx/trxR

Le travail réalisé par Sohn et Rudolph a montré que l'oxydation inhibitrice des CDC25B par le peroxyde d'hydrogène est réversible en présence d'éléments réducteurs tels

que le DTT ou les agents du système trx/trxR mais pas après l'addition de glutathion. Nous avons voulu vérifier si le même type de réversion existait avec l'isoforme A. Les résultats obtenus montrent qu'après une inhibition de 67 % de l'activité CDC25A avec 0,5 mM de peroxyde d'hydrogène, l'addition de TCEP, un composé réducteur plus stable que le DTT, ou de trx et trxR permet de totalement restaurer l'activité phosphatase (figure 31).

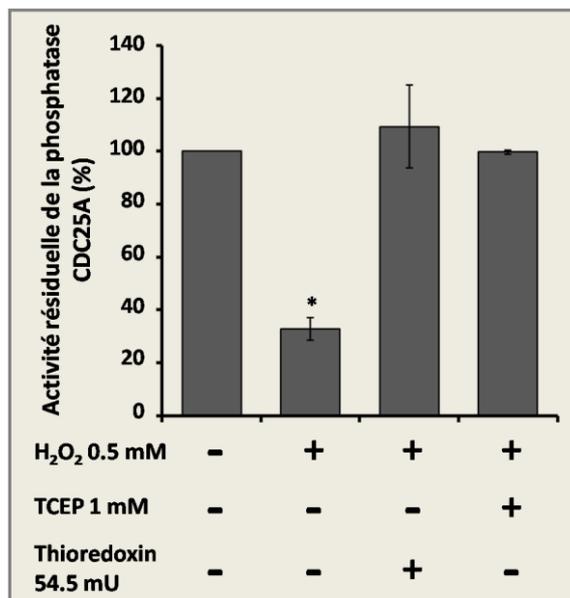


Figure 31 : Réversion de l'inhibition des protéines de fusion GST – CDC25A par le TCEP et le système trx/trxR, *in vitro*.

Les phosphatases CDC25 ont été mises en présence de 0,5 mM d'H₂O₂ pendant 2 min. La réaction a été arrêtée par l'ajout de catalase (25U) puis 1 mM TCEP ou 54,5 mU trx, 47,3 mU trxR, 12 mM NADPH ont été ajoutés au milieu réactionnel pendant 10 min avant de réaliser la mesure de l'activité enzymatique en cinétique à 37°C pendant 15 min.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : P < 0.05, (n = 3).

Ces résultats sont similaires à ceux établis par Sohn et Rudolph qui ont montré qu'un traitement de CDC25B par le peroxyde d'hydrogène induit la formation d'un pont disulfure entre la cystéine catalytique (Cys⁴³¹) et une cystéine voisine du site actif (Cys³⁸⁴). La formation d'un tel pont disulfure lors d'une oxydation par H₂O₂ a également été montré, *in vitro*, pour d'autres PTPs comme PTEN, LMW-PTP, PRL-1 (Caselli, Marzocchini *et al.*, 1998; Lee, Yang *et al.*, 2002; Cho, Lee *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). La thiorédoxine et le TCEP restaureraient l'activité enzymatique des CDC25 en réduisant ce pont. L'importante réactivité des CDC25 avec H₂O₂ a été attribuée à l'exposition de la cystéine catalytique susceptible de faciliter la formation du pont disulfure. En effet, d'autres phosphatases comme PTP1B sont moins sensibles à l'oxydation par H₂O₂ que les CDC25 probablement parce que leur site actif est plus enfoui au sein de leur structure tridimensionnelle (Sohn and Rudolph, 2003).

I.2. Régulation de l'activité CDC25 par un apport exogène d'H₂O₂ dans des cellules d'adénocarcinome mammaire humain

Après avoir évalué les effets du peroxyde d'hydrogène sur les phosphatases CDC25 *in vitro*, nous avons étudié ses conséquences sur le cycle cellulaire et sur l'activité CDC25 dans deux lignées issues d'adénocarcinome mammaire humain, les cellules MCF7 et MDA-MB 231. Ces lignées cellulaires ont été choisies car elles présentent des profils d'expression opposés pour la trx1. En effet, les cellules MCF7 surexpriment fortement trx1 par rapport aux cellules MDA-MB 231 alors que le niveau d'expression de la thiorédoxine réductase est comparable dans les deux lignées (**figure 32**). Une telle différence d'expression de trx1 est intéressante pour l'étude du rôle du système trx/trxR dans la régulation de l'activité des CDC25.

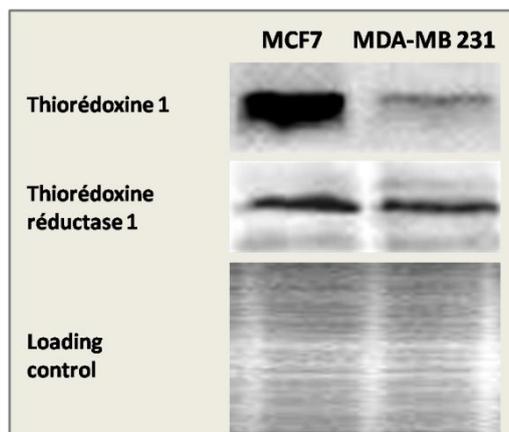


Figure 32 : Niveau d'expression de la thiorédoxine 1 et de la thiorédoxine réductase 1 dans les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231.

Le niveau d'expression de trx1 et de trxR1 a été évalué par western blotting. La coloration au Rouge de Ponceau indique que la même quantité de protéines a été déposée pour chaque échantillon. Le résultat présenté est représentatif des résultats obtenus pour 3 expériences indépendantes.

Pour étudier les effets de H₂O₂ sur l'activité CDC25 *in cellulo*, il est nécessaire de générer un stress oxydant dans les lignées cellulaires d'intérêt. Les conditions de traitement optimales pour induire un tel stress ont donc été déterminées par l'étude de la cytotoxicité et de la production d'ERO après un traitement par le peroxyde d'hydrogène.

I.2.1. Cytotoxicité du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est un produit endogène du métabolisme cellulaire. Cependant, lorsqu'il est présent en quantité importante, il est connu pour être toxique. Afin de

déterminer la sensibilité des cellules MCF7 et MDA-MB 231 à ce composé, ces dernières ont été traitées par des concentrations croissantes d' H_2O_2 [0-3 mM] pendant 24 h. La cytotoxicité résultante a été évaluée par cytométrie en flux avec deux sondes fluorescentes, le H_2DCFDA et l'IP (Cf. *Matériel et Méthodes*, IV). La courbe de cytotoxicité obtenue révèle que les deux lignées cellulaires testées présentent la même sensibilité au traitement par H_2O_2 avec une CI_{50} de $1,46 \pm 0,02$ mM dans les cellules MCF7 et de $1,43 \pm 0,03$ mM dans les cellules MDA-MB 231 (figure 33).

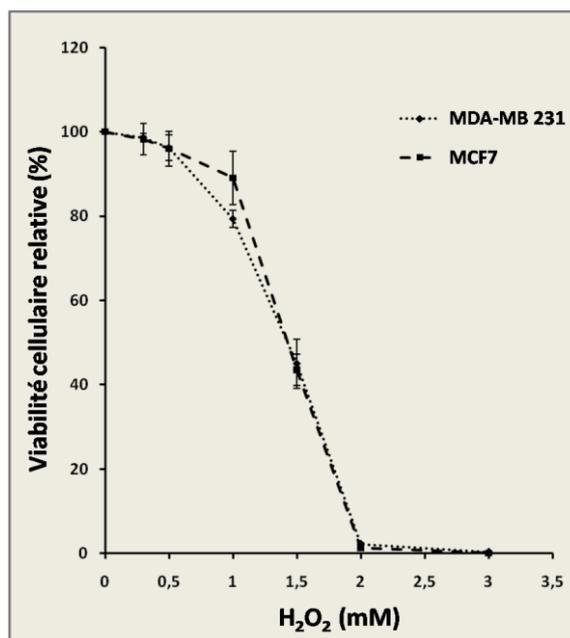


Figure 33 : Evaluation de la cytotoxicité du peroxyde d'hydrogène sur des cellules MCF7 et MDA-MB 231 après 24 h de traitement.

Les effets de H_2O_2 sur la viabilité des cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été évalués par une analyse en cytométrie en flux avec le H_2DCFDA et l'IP comme sonde. Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d' H_2O_2 [0-3 mM] pendant 24 h. $n=3$.

D'après les résultats obtenus, il semble que les effets cytotoxiques de H_2O_2 soient indépendants de *trx1* puisque les deux lignées cellulaires présentent la même sensibilité au peroxyde d'hydrogène alors qu'elles possèdent des niveaux d'expression différents pour la *trx1*.

La cytotoxicité de H_2O_2 dans les lignées cellulaires étudiées est due à sa capacité d'oxydation des macromolécules cellulaires (protéines, ADN, lipides) (Cf. *Introduction*, II.1). Ces oxydations sont proportionnelles à la quantité d'ERO présentes dans le milieu intracellulaire. Il est donc intéressant d'évaluer le taux de ces ERO dans les cellules traitées.

I.2.2. Evaluation de la quantité d'ERO intracellulaires

Si l'on connaît la quantité de peroxyde d'hydrogène apporté aux cellules, on ne connaît pas la quantité d'ERO intracellulaires résiduelle. En effet, la quantité d'espèces réactives de l'oxygène présent dans les lignées dépend de l'apport extérieur, de la production par le métabolisme cellulaire et de la dégradation d' H_2O_2 par les peroxydases intracellulaires (catalase, prx, gpx). Or, comme nous l'avons vu pour *trx1*, les niveaux d'expression des peroxydases mais également des enzymes génératrices d'ERO peuvent différer d'un type cellulaire à l'autre. Les deux lignées cellulaires sont donc susceptibles de présenter des taux d'ERO intracellulaires différents pour une même dose d' H_2O_2 reçue.

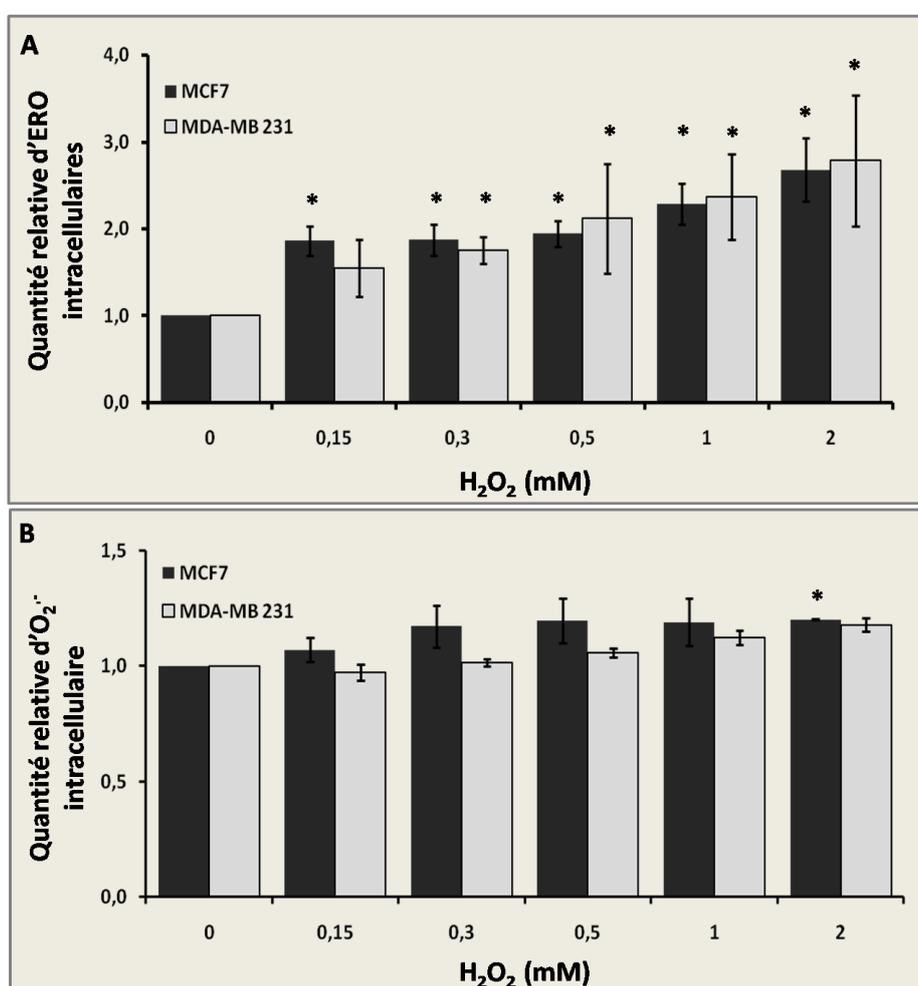


Figure 34 : Effet de H_2O_2 sur les taux intracellulaires d'ERO et d'anion superoxyde dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d' H_2O_2 [0-2 mM] pendant 15 min. La quantité relative d'ERO (A) et la quantité relative d'anions superoxyde (B) ont été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H_2DCFDA et le DHE comme sondes fluorescentes.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, (n = 3).

Afin d'évaluer ces taux, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes de peroxyde d'hydrogène [0-2 mM] pendant 15 min et les quantités d'ERO globales et d'anions superoxyde intracellulaires ont été mesurées par cytométrie en flux dans ces lignées à l'aide de deux sondes fluorescentes qui sont respectivement le H₂DCFDA et le DHE (Cf. *Matériel et Méthodes*, V). Le temps de traitement choisi a été déterminé lors d'une précédente expérience réalisée en cinétique au cours de laquelle nous avons pu établir que lors d'un traitement par H₂O₂, la quantité maximale d'ERO est mesurable après 15 min (résultats non présentés).

Les résultats obtenus montrent que dans les deux lignées cellulaires, **la quantité d'ERO intracellulaires augmente avec la dose d'H₂O₂ reçue**. Cependant, le taux d'anions superoxyde ne varie pas (**figure 34 A et B**). **Un traitement par 1 mM d'H₂O₂ est donc susceptible d'induire un stress oxydant** car il génère une augmentation de 2,3 fois du taux d'ERO intracellulaires dans les deux lignées cellulaires étudiées (**figure 34**).

L'équivalence des taux d'ERO observés dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 lors d'un traitement par H₂O₂ peut être mise en parallèle avec la concordance des CI₅₀ des deux lignées pour le peroxyde d'hydrogène.

I.2.3. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire

Si les effets *in vitro* du peroxyde d'hydrogène sur l'activité CDC25 existent également *in cellulo*, alors l'augmentation d'ERO dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 est susceptible d'engendrer un arrêt du cycle cellulaire. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules ont été traitées par 1 mM d'H₂O₂ pendant 48 h et une mesure de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle a été réalisée par cytométrie en flux avec un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (Cf. *Matériel et Méthodes*, IX).

Dans les deux lignées cellulaires, **H₂O₂ induit une accumulation des cellules en phase G2-M**. Cependant, cette dernière est plus marquée dans la lignée MDA-MB 231 que dans la lignée MCF7. En effet, le traitement induit une augmentation de 2,7 fois du nombre de cellules MDA-MB 231 en phase G2-M contre une augmentation de 1,9 fois dans le cas des cellules MCF7 (**figure 35**). L'augmentation du pourcentage de cellules en phase G2-M s'accompagne d'une nette diminution du pourcentage de cellules en phase G0-G1 et en phase S (**figure 35**).

De plus, dans le cas des cellules MDA-MB 231 traitées, on observe l'apparition d'une phase sub-G1 caractéristique d'une population cellulaire en apoptose.

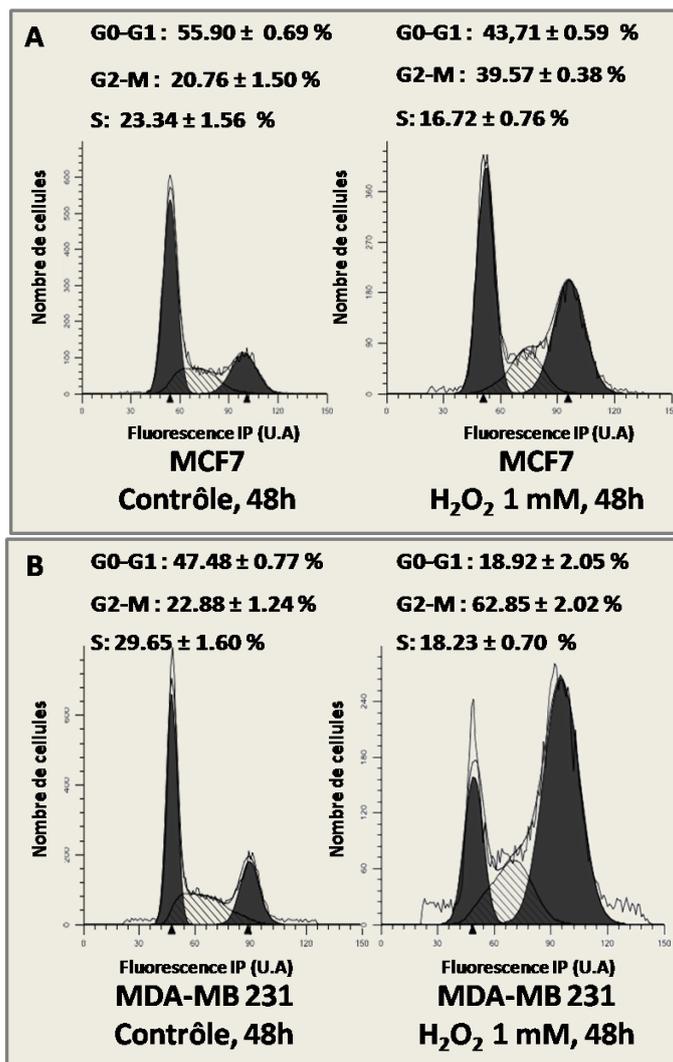


Figure 35 : Effet de H₂O₂ sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cellules ont été traitées par 1 mM d'H₂O₂ pendant 48 h puis la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation de l'iodure de propidium dans l'ADN. Le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase a été calculé à l'aide du logiciel « modfit ».

Les valeurs rapportées ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Afin d'étudier la cinétique d'accumulation des cellules en phase G2-M, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 1 mM de H₂O₂ et une mesure de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle a été réalisée après 3, 6, 12, 24 et 48 h de traitement. Les résultats obtenus montrent que l'arrêt du cycle en phase G2-M se produit plus rapidement et de façon plus intense pour les MDA-MB 231 que pour les MCF7. En effet, les cellules MDA-MB 231 traitées commencent à s'accumuler en phase G2-M à partir de 12 h de traitement alors que cette accumulation ne s'initie qu'après 24h dans le cas des cellules MCF7 (**Figure 36**). Après 24 h de traitement, le pourcentage de cellules traitées en phase G2-M est

multiplié par 1,8 pour MCF7 et 1,9 pour MDA-MB 231. Ensuite, pour les cellules MDA-MB 231, le taux de cellules traitées en phase G2-M continue d'augmenter jusqu'à 48 h de traitement alors qu'il reste constant dans le cas des cellules MCF7 (**figure 36**).

Sachant que les cellules MDA-MB 231 présentent un faible niveau d'expression de la *trx1* alors leur réponse accrue au traitement par H_2O_2 suggère une intervention possible de la thioredoxine dans la régulation de la phase G2-M du cycle cellulaire.

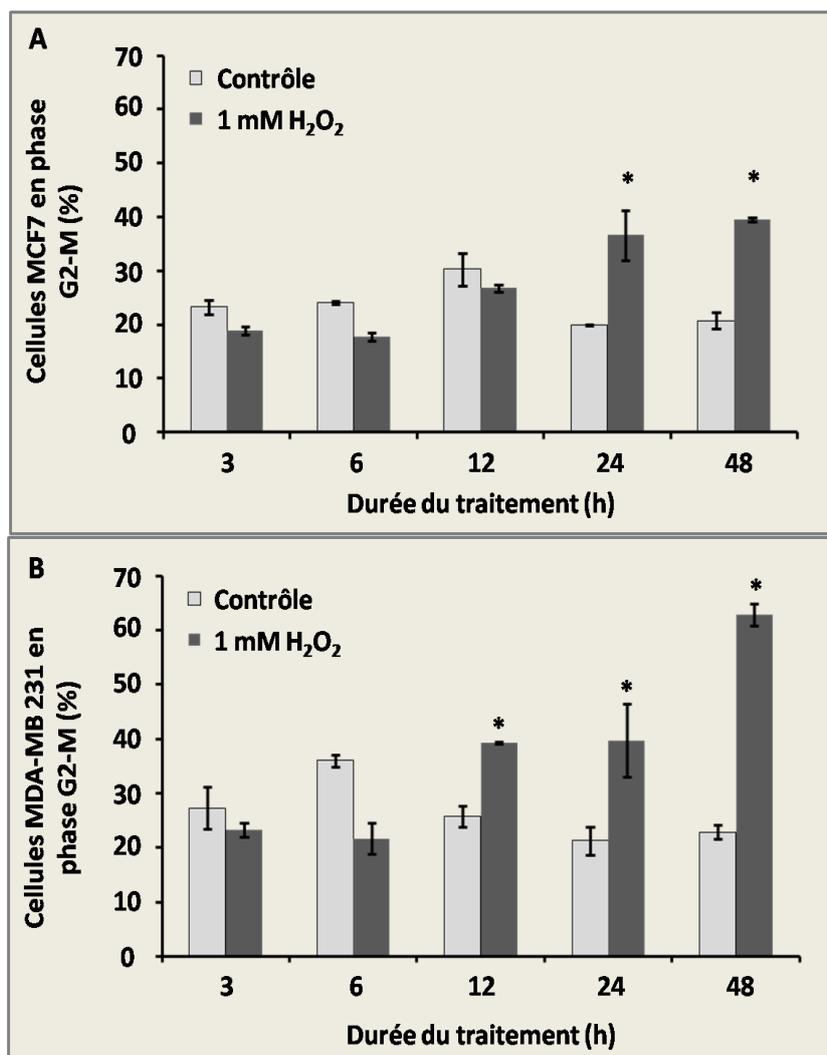


Figure 36 : Evolution du taux de cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) en phase G2-M au cours du temps lors d'un traitement par H_2O_2 .

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 1 mM d' H_2O_2 pendant 3, 6, 12, 24 et 48 h. Le pourcentage de cellules en phase G2-M a été évalué par une analyse de l'incorporation de l'iodure de propidium dans l'ADN en cytométrie en flux et calculé avec le logiciel Modfit.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, (n = 3).

L'accumulation des cellules en phase G2-M pourrait être liée à une oxydation des CDC25 par H_2O_2 . Nous avons donc ensuite tenté d'évaluer l'état redox des CDC25 dans les cellules traitées.

I.2.4. Etat redox des CDC25

De précédentes études réalisées *in cellulo* ont montré que les deux phosphatases, PTEN et PRL-1, étaient sensibles à l'oxydation par H_2O_2 . Les auteurs ont observé que ces PTP étaient oxydées de façon dose dépendante et que cette oxydation était réversible au cours du temps (Lee, Yang *et al.*, 2002; Yu, Kelly *et al.*, 2007). L'étude de l'état redox de ces protéines a été réalisée par électrophorèse SDS-PAGE non réductrice suivie d'un western-blotting différenciant l'état oxydé de l'état réduit grâce à une alkylation préalable des groupements thiols par le N-éthylmaléimide. Afin d'étudier l'état d'oxydation des CDC25 lors d'un stress oxydant, nous avons réalisé la même expérience avec des échantillons issus de cellules MCF7 et MDA-MB 231 qui ont été traitées par des concentrations croissantes d' H_2O_2 pendant 30 min. Aucune détection des CDC25 n'a pu être possible. Les anticorps utilisés (Cf. *Matériel et Méthode XI.3.*) se fixent au niveau du site actif des CDC25. Or, comme le montre le western-blotting présenté en **figure 37**, réalisé dans les mêmes conditions que précédemment mais avec des enzymes purifiées, il semblerait que la fixation des anticorps ne soit pas possible après une électrophorèse en condition non réductrice, probablement par manque d'accessibilité du site actif. A défaut de pouvoir déterminer l'état d'oxydation des CDC25 lors d'un traitement par H_2O_2 nous nous sommes intéressés à ce qui se passe en amont, en étudiant l'état de phosphorylation des substrats naturels des CDC25, les CDK.

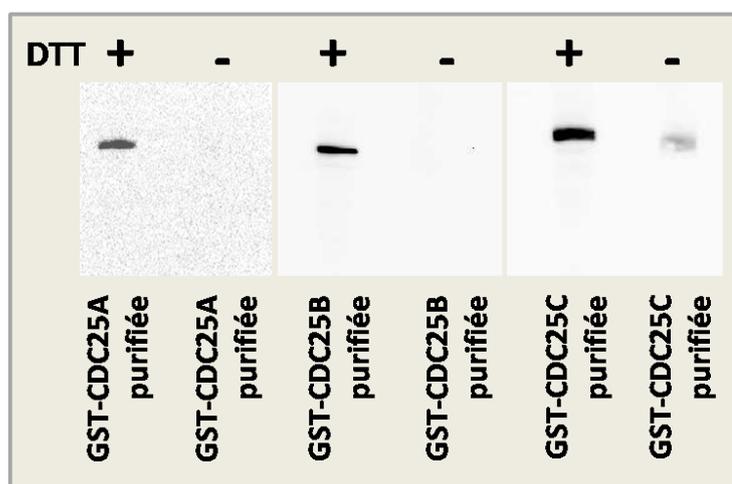


Figure 37 : Immuno-détections, en condition réductrice et non réductrice, des phosphatases CDC25A, B et C purifiées.

Les protéines de fusion GST-CDC25A, B et C ont été déposées sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Elles ont été soit diluées dans un tampon Laemmli réducteur (DTT +) soit dans un tampon Laemmli non réducteur (DTT-).

I.2.5. Détermination indirecte de l'activité CDC25

L'accumulation des cellules MCF7 et MDA-MB 231 en phase G2-M lors d'un traitement par d' H_2O_2 pourrait être la conséquence d'une inhibition de l'activité CDC25. Afin de vérifier cette théorie, nous avons évalué l'état de phosphorylation des substrats naturels des CDC25, les CDK (1 et 2), sachant qu'une hyper-phosphorylation de ces dernières serait significative d'une inhibition de l'activité des phosphatases (Cf. *Matériel et Méthodes, XII*). Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont donc été traitées par des concentrations croissantes en H_2O_2 (0,5, 1 et 2 mM) pendant 1/2, 1, 3, 6, 12 et 24 h puis des immunorépliques anti-PCDK1, anti-PCDK2, anti-CDK1 et anti-CDK2 ont été réalisées et la densité des bandes obtenues a été calculée grâce au logiciel Quantity One (Cf. *Matériel et Méthode, XII*).

Les western-blotting obtenus montrent qu'**un traitement par le peroxyde d'hydrogène n'induit pas d'augmentation de la phosphorylation de CDK1 et CDK2 (figure 38 ; seuls les résultats pour un traitement par 1 mM d' H_2O_2 pendant 1/2, 3 et 6 h sont représentés). Les modifications précédemment observées, de la répartition des MCF7 et MDA-MB 231 dans le cycle cellulaire, ne semblent donc pas dues à une hyper-phosphorylation des CDK.**

Ainsi, toutes les PTPs n'obéissent pas aux mêmes mécanismes de régulation redox intracellulaire. Par exemple, dans le cas de PTEN, il a été montré que l'inhibition de la phosphatase par un apport exogène ou endogène d' H_2O_2 a des conséquences en amont de la voie de signalisation dans laquelle elle intervient. En effet, son inhibition engendre une augmentation du taux intracellulaire de son substrat phosphorylé (PtdIns(3,4,5) P_3) et par conséquent une activation de la cascade de phosphorylation qu'elle inhibe normalement (Leslie *et al.*, 2003).

Dans le cas de CDC25, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'absence de modification de la phosphorylation des CDK lors d'un traitement par H_2O_2 pourrait être due au maintien de l'activité CDC25 par le système trx/trxR. La thiorédoxine possède des capacités catalytiques très efficaces qui lui permettent d'agir à très faible concentration (Holmgren and Lu, 2010). Ainsi, même dans les cellules MDA-MB 231 où l'expression des trx1 est réduite, une faible quantité de thiorédoxine pourrait suffire pour maintenir l'activité CDC25.

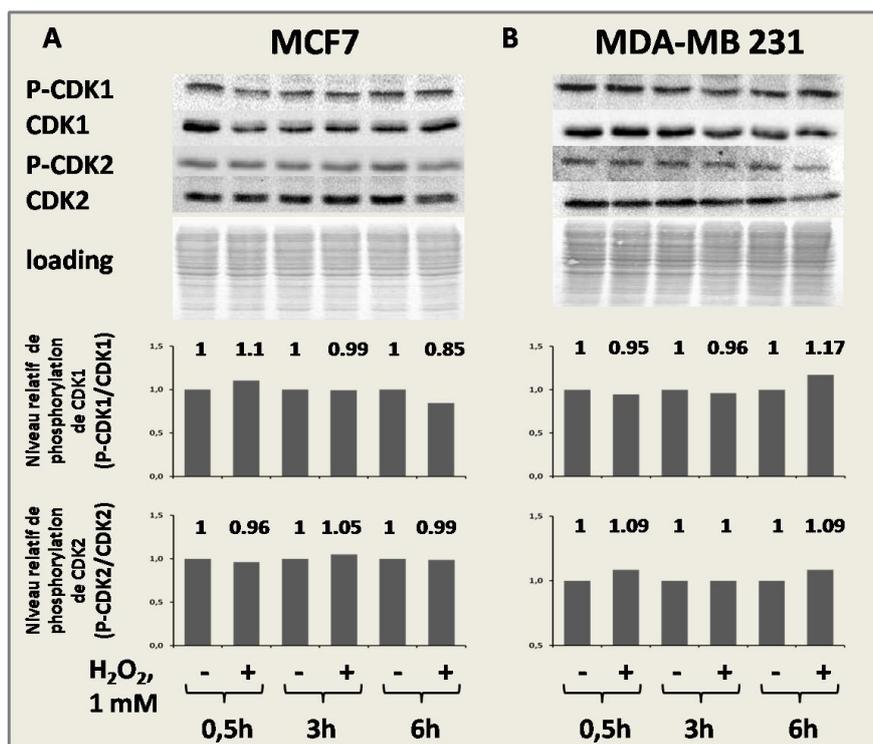


Figure 38 : Effet de H_2O_2 sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B).

Les cellules ont été traitées par 1 mM d' H_2O_2 pendant 0,5, 3 et 6 h. Les immunorépliques de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été « strippées » et de nouveau immunomarquées pour visualiser respectivement la forme totale de CDK1 et CDK2. Les western-blotting obtenus ont été analysés avec le logiciel « quantity one ». Les niveaux relatifs de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été calculés par comparaison avec le niveau d'expression de CDK1 et CDK2. Western-blotting représentatif de trois expériences indépendantes.

II. ROLE DU SYSTEME TRX/TRXR DANS LA MODULATION REDOX DE L'ACTIVITE CDC25

II.1 Effets de l'inhibition de *trxR* par l'Auranofine sur l'activité CDC25

Afin de déterminer si le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase protège les phosphatases CDC25 lors d'un stress oxydant, nous avons évalué les effets d'une inhibition totale de la thiorédoxine réductase sur l'activité de ces dernières dans les cellules MCF7 et dans les cellules MDA-MB 231. Pour cela, l'inhibiteur de *trxR* choisi est l'Auranofine. Cette dernière est un composé dérivé de l'or largement utilisé dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et également connue dans la littérature pour son action cytotoxique sur différentes lignées de cellules cancéreuses. L'Auranofine est un puissant inhibiteur de *trxR* capable de générer des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules testées (Cf. *Introduction*, II.2.4.1.2.).

Comme dans le cas du peroxyde d'hydrogène, il a été nécessaire dans un premier temps de déterminer les conditions de traitement permettant d'induire un stress oxydant et une inhibition totale du système thiorédoxine dans les lignées d'intérêt. Nous avons donc tout d'abord testé l'effet de l'Auranofine sur différents paramètres tels que la cytotoxicité, la production d'ERO, l'activité trxR ou encore l'état redox des trx.

II.1.1. Cytotoxicité de l'Auranofine

Afin de tester la cytotoxicité de l'Auranofine, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes de ce composé [0-10 μM] pendant 24 h. La gamme de concentrations testées a été choisie après une analyse bibliographique des résultats obtenus sur d'autres lignées (Cf. *Introduction, II.2.4.1.2.*). Le pourcentage relatif de cellules vivantes a été évalué par cytométrie en flux avec le H₂DCFDA et l'IP comme sondes fluorescentes (Cf. *Matériel et Méthodes, IV.*).

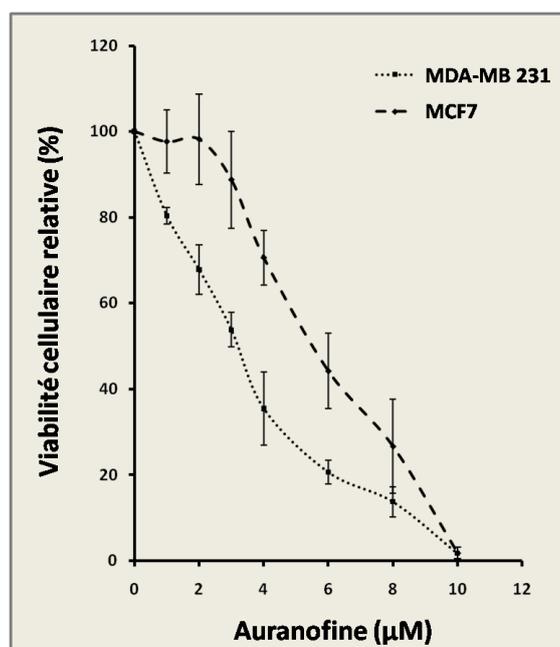


Figure 39 : Evaluation de la cytotoxicité de l'Auranofine sur des cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Auranofine [0-10 μM] pendant 24 h puis la viabilité des cellules MCF7 et MDA-MB 231 a été évaluée par une analyse en cytométrie en flux avec le H₂DCFDA et l'IP comme sondes fluorescentes.

n=3.

Les résultats obtenus montrent que les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB 231 ont une sensibilité comparable à l'Auranofine avec une CI₅₀ de $5,77 \pm 0,52 \mu\text{M}$ pour les cellules MCF7 et de $3,15 \pm 0,17 \mu\text{M}$ pour les cellules MDA-MB 231 (Figure 39).

II.1.2. Inhibition de l'activité trxR par l'Auranofine

L'or est connu pour sa haute affinité pour les groupements thiols. Le groupement sélénoate nucléophile des trxR réduites est donc susceptible d'être un des premiers sites attaqué par l'Auranofine. Afin de déterminer le rôle du système trx/trxR dans la régulation redox des CDC25 il est indispensable de générer une inhibition totale de ce système. Pour cela, nous avons défini la concentration en Auranofine permettant d'inhiber complètement l'activité trxR. Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Auranofine [0-3 μ M] pendant 30 min. Les concentrations testées et le temps de traitement ont été choisis d'après la littérature. La mesure de l'activité a été réalisée sur des homogénats cellulaires par mesure spectrophotométrique de la réduction du DTNB (Cf. *Matériel et Méthodes, VI*).

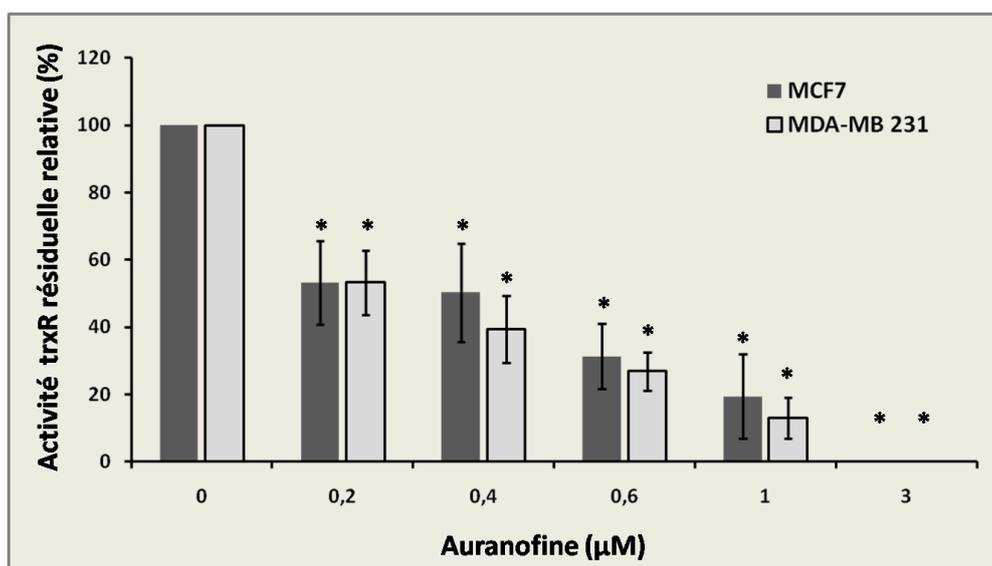


Figure 40 : Inhibition de l'activité trxR par l'Auranofine dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Auranofine [0-3 μ M] pendant 30 min. L'activité résiduelle de trxR a été évaluée par la mesure de la réduction du DTNB. La concentration finale en DMSO (0,2 % v/v) dans le milieu de culture était identique pour les cellules traitées et les cellules contrôles.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, (n = 3).

Les résultats obtenus révèlent que pour une même concentration en Auranofine les pourcentages d'inhibition de la trxR sont similaires dans les cellules MCF7 et dans les cellules MDA-MB 231 (**Figure 40**). **Dans les deux lignées cellulaires l'activité trxR est totalement inhibée lors d'un traitement des cellules par 3 μ M d'Auranofine.**

II.1.3. Production d'ERO par l'Auranofine

Du fait du rôle antioxydant de la *trxR*, l'inhibition de cette dernière par l'Auranofine est susceptible d'induire une augmentation du taux d'ERO intracellulaires. Afin de vérifier cette hypothèse, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Auranofine [0-8 μ M] pendant 30 min et les quantités d'ERO globales et d'anions superoxyde intracellulaires ont été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H_2DCFDA et le DHE comme sondes fluorescentes (Cf. *Matériel et Méthodes, V*). La mesure révèle qu'un traitement par l'Auranofine induit une augmentation de la production d'ERO mais pas d'anions superoxyde dans les deux lignées cellulaires. **Une concentration de 3 μ M, correspondant à une inhibition totale de la thiorédoxine réductase, provoque une augmentation équivalente de la quantité d'ERO dans les deux lignées cellulaires avec une multiplication par 1,7 de la production d'ERO dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles (figure 41).**

Cette production d'espèces réactives de l'oxygène est un critère expérimental important pour notre étude. En effet, elle nous exempte de co-traiter les cellules avec du peroxyde d'hydrogène, le milieu intracellulaire pro-oxydant généré par l'Auranofine étant déjà favorable à une possible oxydation des CDC25.

L'augmentation de la quantité d'ERO générées par l'Auranofine peut avoir différentes origines. Comme l'a montré l'équipe de Cox *et al.*, la perte de l'activité antioxydante du système *trx/trxR* est susceptible d'induire une inactivation des peroxyrédoxines suite à leur oxydation. Or, comme nous l'avons précisé en introduction, ces protéines sont essentielles pour la dégradation des peroxydes cytoplasmiques (Cox *et al.*, 2008). Magherini *et al.* ont également montré dans une étude protéomique que l'Auranofine est capable d'induire des changements dans l'expression des peroxyrédoxines avec une surexpression de la peroxyrédoxine 1 et une diminution de l'expression de la peroxyrédoxine 6 ayant pour conséquence d'importants changements du statut redox intracellulaire (Magherini *et al.*, 2010). En plus de l'oxydation des peroxyrédoxines, une oxydation des glutathion peroxydases due à l'inhibition des *trxR* pourrait également contribuer à l'accumulation des ERO (Park *et al.*, 2005). Nous pouvons également présumer que le métabolisme intracellulaire de l'Auranofine pourrait induire une production d'ERO. Par contre, nous pouvons exclure l'hypothèse que l'Auranofine induise une augmentation des ERO *via* une altération mitochondriale car la mesure du taux intracellulaire d'anions superoxyde dans les cellules traitées montre que l'Auranofine ne stimule pas la production de cet ERO primaire généré

principalement au niveau de la mitochondrie. Cette observation est concordante avec une étude de Rigobello *et al.* dans laquelle il a été montré que l'augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène dans des cellules de foie de rat après un traitement par l'Auranofine n'est pas due à une altération de la membrane des mitochondries (Rigobello, Folda *et al.*, 2005).

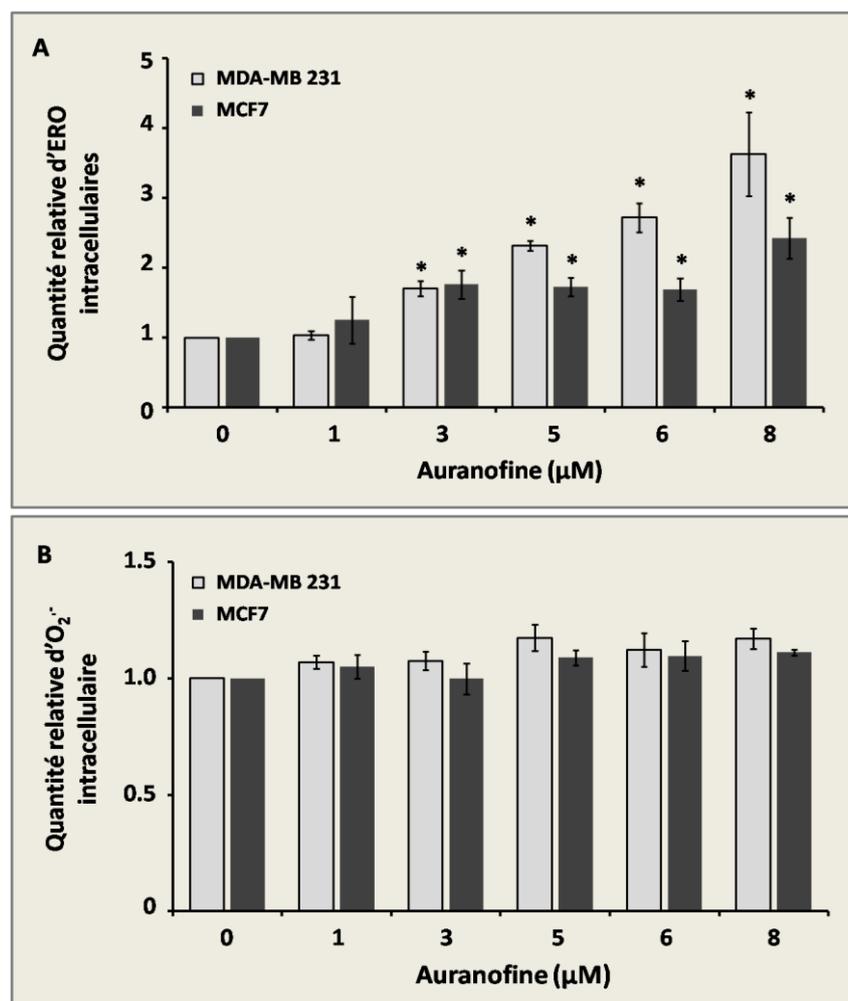


Figure 41 : Production d'ERO dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 traitées par l'Auranofine.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Auranofine [0-8 µM] pendant 30 min. La quantité relative d'ERO (A) et la quantité relative d'anions superoxyde (B) ont été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H₂DCFDA et le DHE comme sondes fluorescentes.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : P < 0.05, (n = 3).

II.1.4. Etat redox des thiorédoxines 1

Selon le principe de fonctionnement du système trx/trxR, une inhibition des thiorédoxines réductases devrait provoquer une oxydation des thiorédoxines. Cette dernière devrait être d'autant plus marquée lorsque le milieu intracellulaire devient pro-oxydant. Pour engendrer une inhibition fonctionnelle des trx, leur oxydation doit être totale. Pour évaluer le

rôle du système *trx/trxR* dans la régulation redox des CDC25, il donc est strictement nécessaire que nous nous placions dans de telles conditions d'oxydation.

Ainsi, pour déterminer l'état d'oxydation des *trx1*, les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Auranofine [0-5 μ M] pendant 30 min et un western blot permettant de distinguer les différents états redox de la *trx* a été réalisé. Trois états redox des *trx1* pourront être mis en évidence : un état réduit, un état d'oxydation partielle et un état d'oxydation totale (Cf. *Matériel et Méthodes*, VII). En effet, les groupements thiol libres des thiorédoxines réduites vont être alkylés par de l'acide iodoacétique ajouté lors de la préparation des échantillons. La liaison covalente de l'acide iodoacétique aux groupements thiol libres des *trx1* confère à ces dernières une charge négative qui leur permet une migration facilitée dans un gel d'électrophorèse non réducteur et non dénaturant. L'état d'oxydation partielle correspond à l'oxydation du dithiol du site actif en C32/C35 et l'état d'oxydation totale correspond à l'oxydation des deux dithiols C32/C35 et C62/C69, pour la thiorédoxine humaine. Les thiorédoxines totalement oxydées migrent moins vite sur le gel que celles partiellement oxydées qui migrent-elles-mêmes moins vite que les *trx* réduites (Watson *et al.*, 2003).

Dans un premier temps, afin de valider la méthode utilisée, nous avons mesuré l'état d'oxydation de thiorédoxines d'*E.Coli* purifiées soumises à une oxydation par 2 mM d' H_2O_2 ou à une réduction par 1 mM de TCEP ou 50, 100 ou 500 mM de DTT pendant 10 min.

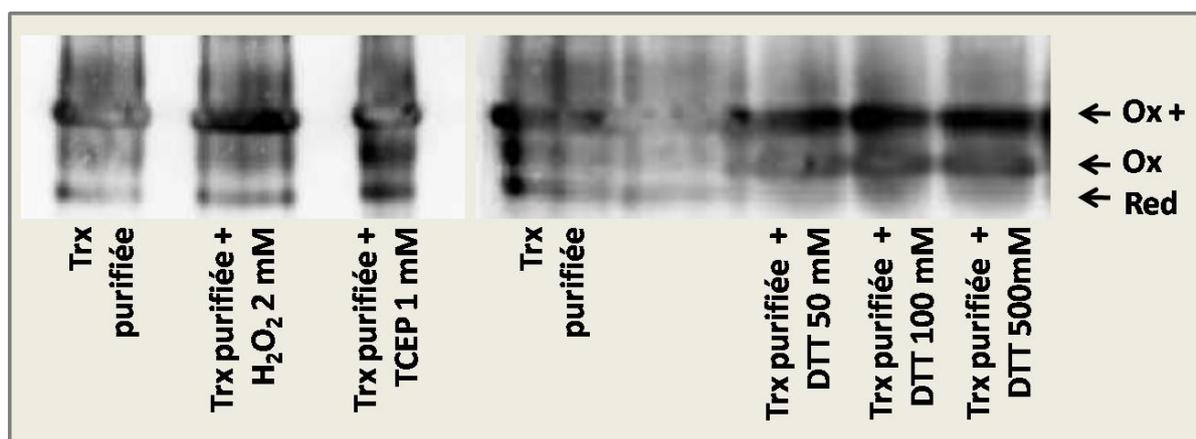


Figure 42 : Evaluation de l'état redox de la thiorédoxine purifiée d'*E.Coli*.

La *trx* purifiée a été soumise à un traitement pro-oxydant par 2 mM d' H_2O_2 ou à un traitement réducteur par 1 mM de TCEP ou 50, 100 ou 500 mM de DTT pendant 10 min. La thiorédoxine purifiée a ensuite été diluée dans un tampon contenant de l'acide iodoacétique et son état redox a été déterminé selon la méthode décrite dans le chapitre *Matériel et Méthodes*, VII. Les formes redox de *trx* sont indiquées de la façon suivante : « Red » pour la forme réduite ; « Ox » pour la forme partiellement oxydée et « Ox+ » pour la forme totalement oxydée.

Sur la **figure 42**, on constate que la trx purifiée d'*E.Coli* d'origine commerciale est fournie dans un état totalement oxydé. Cette dernière est donc non fonctionnelle, c'est pourquoi il est essentiel de l'utiliser en combinaison avec de la trxR et du NADPH (Cf. *Résultats, I.1.2.*). L'ajout de 2 mM d' H_2O_2 pendant 10 min ne change donc pas son statut redox totalement oxydé. Par contre, l'ajout de TCEP engendre une réduction de la trx visualisée par une augmentation de la densité des bandes correspondant à un état intermédiaire d'oxydation et à un état réduit. L'ajout de DTT permet lui aussi une réduction partielle des trx bien que seule une augmentation de la proportion des formes oxydées intermédiaires ne soit visible (**figure 42**).

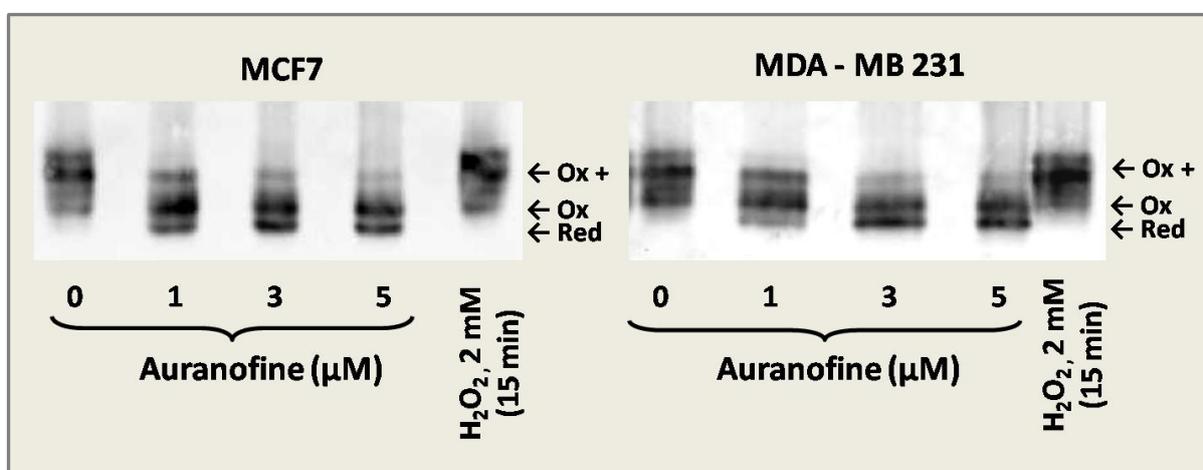


Figure 43 : Effet de l'Auranofine sur l'état redox des trx1 dans des cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Auranofine [0-5 μM] pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été récupérées dans un tampon contenant de l'acide iodoacétique et le statut redox des trx1 a été déterminé selon la méthode décrite dans le chapitre *Matériel et Méthodes, VII*. Les formes redox de trx sont indiquées de la façon suivante : « Red » pour la forme réduite ; « Ox » pour la forme partiellement oxydée et « Ox+ » pour la forme totalement oxydée. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

Dans le cas du traitement des cellules MCF7 et MDA-MB 231 par l'Auranofine, les résultats obtenus montrent que **malgré l'inhibition des trxR et la génération d'un stress oxydant, le traitement ne provoque pas l'oxydation de trx1**. Au contraire, le traitement semble provoquer une augmentation des formes partiellement oxydées et des formes réduites des trx1 dans les deux lignées cellulaires (**figure 43**). Cette augmentation de la proportion de trx1 réduites lors d'un traitement par l'Auranofine doit toutefois être commentée avec précaution car nous remarquons que dans les cellules contrôles (0 μM), les trx1 semblent totalement oxydées ce qui est en opposition avec les résultats obtenus pour les contrôles de la même manipulation réalisée avec l'Acroléine (**figure 51**). En effet, lors la mesure de l'état

redox des trx1 dans le cadre d'un traitement par l'Acroléine, on constate que dans les cellules contrôles, les trx1 sont dans un état réduit ou partiellement oxydé. Cette différence de résultats pour les cellules contrôles pourrait s'expliquer par la présence de 0,2 % v/v de DMSO dans le cas des traitements par l'Auranofine. En effet, Sanmartín-Suárez *et al* ont montré que le DMSO a la capacité d'augmenter le niveau d'oxydation des groupements thiols protéiques (Sanmartin-Suarez *et al.*, 2011). On peut donc ainsi émettre l'hypothèse que les trx1 des cellules non traitées par l'Auranofine ont été oxydées au contact du DMSO. Dans les cellules traitées, il est possible que le DMSO n'ait pas agi sur l'état redox des trx1 car il peut s'être complexé avec l'Auranofine. En effet, il a été montré que le DMSO possède la capacité de se complexer avec des métaux (Casali *et al.*, 2011). Prenant en compte ces hypothèses, il est probable qu'en absence de DMSO, il n'existe pas réellement de différence entre l'état d'oxydation des trx1 dans les cellules contrôles et dans les cellules traitées par l'Auranofine.

La capacité de l'Auranofine à oxyder les trx1 est relativement controversée dans la littérature. D'une part, nos résultats sont corroborés par l'étude de Prast-Nielsen *et al* qui a montré qu'un traitement des cellules A549 par l'Auranofine affecte l'activité trxR mais pas l'activité trx (Prast-Nielsen *et al.*, 2010). De plus, il a été mis en évidence qu'un *knockdown* de trxR n'induit pas une oxydation des trx1 dans les cellules Hela (Watson *et al.*, 2008). D'autre part, d'autres études ont décrit l'existence d'une oxydation partielle des trx1 lors d'un traitement par l'Auranofine mais les résultats sont très variables en fonction des lignées cellulaires étudiées. Par exemple, dans les cellules HL-60 (cellules de leucémie promyélocytaire humaine), de fortes doses d'Auranofine induisent une faible oxydation des trx1. Cette oxydation est plus importante dans des cellules de cancer d'ovaire sensibles au cisplatine traitées par 2 μ M d'Auranofine et encore plus forte dans des cellules C13* (cellules de cancer d'ovaire résistantes au cisplatine). Cependant, dans tous les cas cités, l'oxydation des trx1 est limitée et la part des trx1 réduites reste prédominante (Rigobello *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2010).

L'oxydation incomplète des trx1 en dépit de l'inhibition totale des trxR et de l'augmentation d'ERO intracellulaires pourrait s'expliquer par l'intervention anti-oxydante du système du glutathion. En effet, le système thiorédoxine et le système du glutathion sont les deux systèmes antioxydants majeurs dans les cellules mammifères. Ils possèdent chacun des partenaires spécifiques mais leurs rôles sont proches et des interconnexions existent entre les deux systèmes (Trachootham, Lu *et al.*, 2008). En effet, comme l'a montré l'équipe de Casagrande *et al*, en conditions de stress oxydant modéré, la thiorédoxine peut être glutathionylée au niveau de la cystéine 73 qui n'appartient pas au site actif de l'enzyme. Cette

glutathionylation inhibe réversiblement l'activité enzymatique de la *trx1* probablement suite à une modification de la conformation de l'enzyme (Casagrande *et al.*, 2002). Une telle modification conformationnelle pourrait engendrer un enfouissement du site actif, protégeant ainsi les cystéines catalytiques de l'oxydation. Afin d'apporter un élément de réponse à cette hypothèse, nous avons estimé, dans le chapitre suivant, l'impact d'un traitement par l'Auranofine sur le taux intracellulaire de glutathion.

II.1.5. Dosage intracellulaire du glutathion réduit

Le glutathion, est le thiol non protéique le plus abondant des cellules mammifères. Les groupements thiol étant des cibles potentielles de l'Auranofine, il est possible que le contenu intracellulaire en glutathion soit affecté par le traitement. De plus, le glutathion réduit (GSH) est un agent antioxydant majeur car c'est un substrat des glutathion peroxydases, qui le transforme en glutathion oxydé. Une diminution de la concentration intracellulaire en GSH traduit donc l'existence d'un stress oxydant conséquent. Afin de savoir si l'Auranofine et l'augmentation d'ERO qu'elle génère affecte le taux de GSH intracellulaire, les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB 231 ont été traitées par 3 μM d'Auranofine pendant 30 min. L'analyse du contenu des cellules en glutathion réduit a ensuite été réalisée par CLHP (Cf. *Matériel et Méthodes, VIII*). Les résultats présentés en **figure 44** montrent que **l'Auranofine n'induit pas de variations de la quantité de glutathion réduit dans les cellules étudiées**. Ainsi, l'inhibition totale des thiorédoxine réductases par l'Auranofine et l'accumulation d'ERO associée semble induire un stress oxydant plutôt modéré puisque les cellules parviennent à maintenir constant leur taux de GSH. Rigobello *et al* et Mitozo *et al* (Rigobello, Folda *et al.*, 2008; Mitozo *et al.*, 2011) ont rapporté des résultats similaires avec des traitements par de plus faibles doses d'Auranofine (1 et 0,1 μM) sur des cellules Jurkat T ou des coupes d'hippocampe de rat respectivement. Ces auteurs attribuent l'invariabilité du taux de GSH lors d'un traitement par l'Auranofine à l'incapacité de cette dernière à inhiber la glutathion réductase.

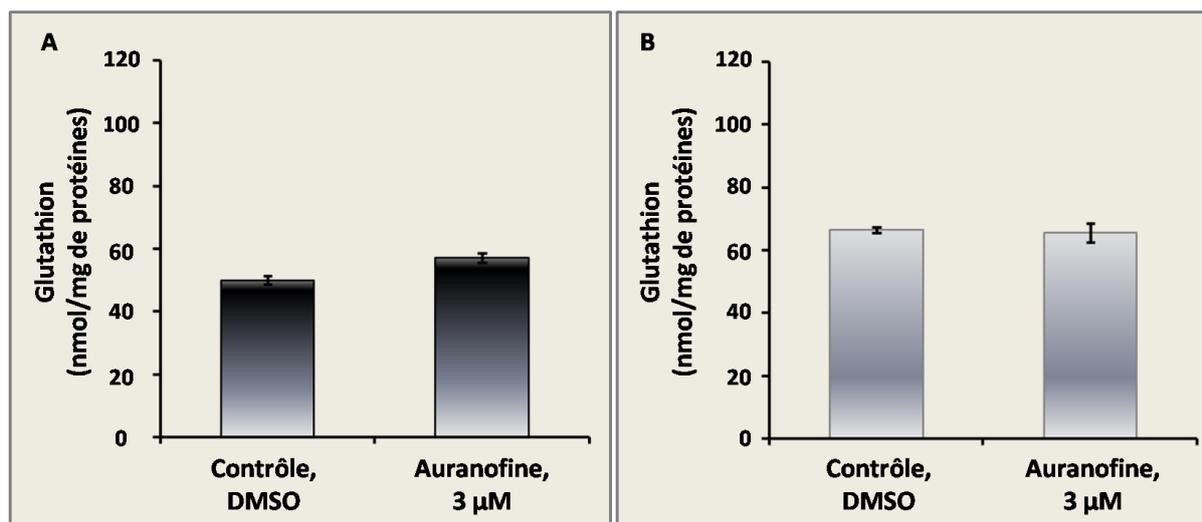


Figure 44 : Effet de l’Auranofine sur le contenu intracellulaire en glutathion réduit des cellules MCF7 (A) et des cellules MDA-MB 231 (B).

Les cellules ont été traitées par 3 μM d’Auranofine pendant 30 min puis le dosage du glutathion intracellulaire a été réalisé par CLHP (Cf. *Matériel et Méthode, VIII*).

Les valeurs rapportées ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Le système du glutathion ne semble donc aucunement affecté par l’Auranofine. Il est donc envisageable que lors d’un tel traitement, le système du glutathion compense la perte de l’activité antioxydante des *trxR* dans les cellules traitées. Ainsi, comme nous l’avons évoqué dans le chapitre précédent, l’oxydation incomplète des *trx1* malgré l’inhibition totale des *trxR* pourrait s’expliquer par une protection de ces dernières par le système du glutathion ou encore par le fait que le milieu intracellulaire ne serait pas suffisamment pro-oxydant pour induire une oxydation totale des *trx1*.

Dans le cas d’une protection des *trx* par le système du glutathion, deux hypothèses sont concevables. La première serait une réduction directe des *trx1* oxydés par les glutarédoxines (*grx*). Ce type de régulation a déjà été montré chez les plantes mais pas chez les mammifères. En effet, l’équipe de Jacquot *et al* a montré que la thiorédoxine « popTrxh4 » du peuplier pouvait être réduite non seulement, par la glutarédoxine du peuplier mais également par trois types de glutarédoxine de *E.Coli* (Gelhay *et al.*, 2003). De plus, l’équipe de Reichheld *et al* a montré que la thiorédoxine « h3 » de *Arabidopsis thaliana* pouvait être réduite par la glutarédoxine lors d’un *knockout* des thiorédoxines cytosolique et mitochondriale (Reichheld *et al.*, 2007).

Comme nous l’avons suggéré dans le chapitre précédent, la deuxième intervention possible du système du glutathion serait une protection par glutathionylation. Dans les premières études sur le sujet, la glutathionylation était associée à une diminution du taux de GSH en

condition de stress oxydant majeur, ce qui ne correspond pas aux résultats obtenus. Cependant, de plus récentes études ont montré que la glutathionylation s'opère également lors de stress oxydant modéré et même en condition physiologique, le taux de GSH n'étant alors pas altéré (Dalle-Donne *et al.*, 2009). Ainsi, l'hypothèse émise dans le chapitre précédent, selon laquelle une glutathionylation préventive de la cystéine 73 de la thiorédoxine pourrait protéger les cystéines du site actif d'une oxydation définitive lors d'un stress oxydant mineur, reste plausible.

II.1.6. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire

Les résultats obtenus précédemment ont révélé que l'Auranofine ne permet pas d'inactiver totalement le système *trx/trxR*. Cependant, nous avons tenu à vérifier quels pouvaient être les effets de l'inhibition des *trxR* et de l'augmentation d'ERO généré par l'Auranofine sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. Pour cela, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 3 μM d'Auranofine pendant 48 h. Nous avons ensuite calculé la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle par cytométrie en flux avec un marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (Cf. *Matériel et Méthodes*, IX). Afin d'obtenir des résultats fiables il est nécessaire de traiter les cellules à une concentration qui provoque une cytotoxicité modérée à 24 h, située entre l'IC₂₀ et l'IC₅₀, pour ne pas observer de phénomène dit de « *freezing* » (gel complet de toutes les fonctions métaboliques de la cellule sans rapport avec l'effet moléculaire supposé ou attendu d'un composé).

Une concentration de 3 μM , comprises entre l'IC₂₀ et l'IC₅₀ pour chaque lignée, et qui induit une inhibition totale de l'activité *trxR* et une multiplication par 2 de la quantité d'ERO correspond à ces critères. Nous avons constaté que dans les deux lignées cellulaires testées, **l'Auranofine n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire après 48 h de traitement (figure 45)**. Afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu un arrêt du cycle suivi d'une reprise, nous avons répété l'expérience en cinétique avec un traitement des cellules par 3 μM pendant 6, 12 et 24 h. **Aucune modification de la répartition des cellules dans le cycle n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées aux différents temps testés** (résultats non présentés). Toutefois, nous avons noté l'**apparition d'une phase sub-G1 après 48 h de traitement chez les cellules MDA-MB 231**. Cette phase est caractéristique de l'entrée de cellules en apoptose.

L'analyse de ces résultats nous permet de supposer que le stress oxydant induit par un traitement par l'Auranofine n'est pas suffisamment important pour déclencher l'activation des « *checkpoint kinase* » classiquement responsable d'un arrêt du cycle. Cette hypothèse est

d'autant plus vraisemblable que Rigobello *et al* ont montré que le stress oxydant induit par l'Auranofine reste modéré dans des cellules Jurkat T car il ne génère pas de peroxydation lipidique ni de production d'oxyde nitrique (Rigobello, Folda *et al.*, 2008). De plus, une autre étude récente a montré qu'un knockdown de *trxR* dans les cellules A549 n'induisait pas de modifications du cycle cellulaire (Eriksson *et al.*, 2009).

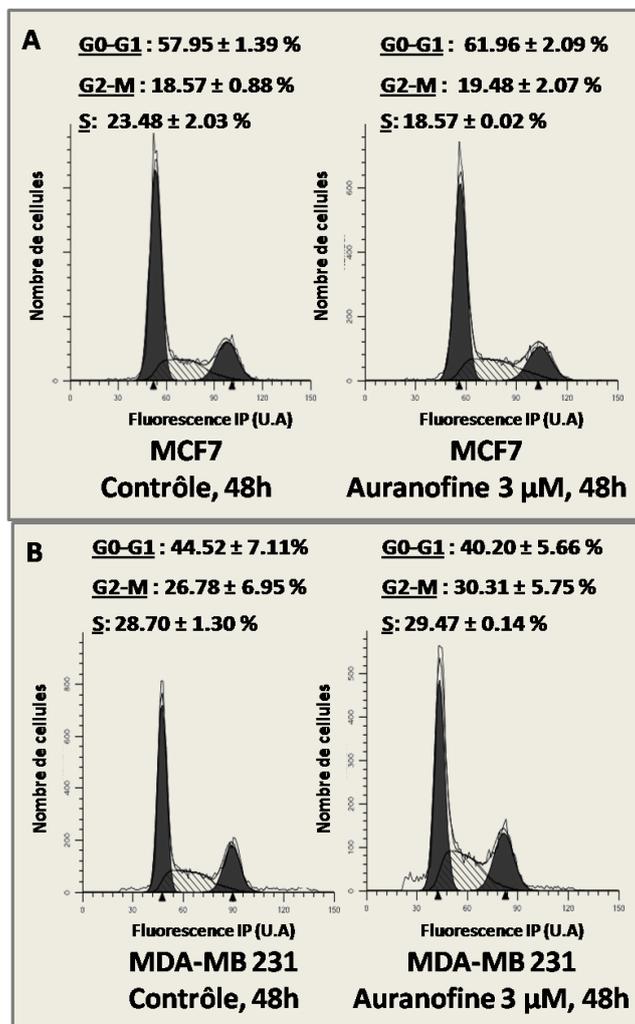


Figure 45 : Effet de l'Auranofine sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cellules ont été traitées par 3 µM d'Auranofine pendant 48 h puis la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation de l'iodure de propidium dans l'ADN. Le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase a été calculé à l'aide du logiciel « modfit ». Les valeurs rapportées ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

L'apparition d'une phase sub-G1 lors d'un traitement par l'Auranofine ou par des composés dérivés de l'or a également été mise en évidence par d'autres auteurs dans d'autres lignées cellulaires (Hedstrom *et al.*, 2009; Gandin, Fernandes *et al.*, 2010). Cette accumulation en phase sub-G1 traduit le déclenchement d'un processus apoptotique qui pourrait être lié à des

altérations cellulaires dues à d'autres causes que la génération d'un stress oxydant. L'Auranofine pourrait par exemple induire des altérations de l'ADN non réparables. Nous répondrons à cette hypothèse dans le paragraphe suivant.

II.1.7. Dommage à l'ADN

Afin de vérifier si le pic sub-G1 précédemment observé lors de l'analyse du cycle des cellules MDA-MB 231 est relatif à un processus apoptotique déclenché par une altération majeure de l'ADN, nous avons évalué la phosphorylation de l'histone H2AX (γ -H2AX). Ce marqueur est sensible et spécifique à des cassures double brins de l'ADN (Mah *et al.*, 2010). En effet, au cours de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, les kinases ATM, ATR et DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) catalysent la phosphorylation de l'histone H2AX sur la Ser139, ce qui conduit à la formation de foyers γ -H2AX au niveau des sites de cassures doubles brins. La présence de ces foyers est essentielle pour l'assemblage de la machinerie de réparation de l'ADN ainsi que pour la transduction des signaux de dommage à l'ADN (Mah, El-Osta *et al.*, 2010).

Afin de vérifier si l'Auranofine provoque l'apparition de ce type de foyer dans les cellules MDA-MB 231 et les cellules MCF7, ces dernières ont été traitées par 3 μ M du composé pendant 24 h puis l'induction de γ -H2AX a été étudiée par immunofluorescence (Cf. *Matériel et Méthodes*, X). L'analyse microscopique réalisée révèle la présence de foyers γ -H2AX dans les noyaux des deux types de cellules traitées avec **69 % de cellules marquées positivement pour la lignée MDA-MB 231 et 76 % pour la lignée MCF7 (figure 46)**. Cependant, l'intensité du marquage est très différente entre les deux lignées : **la fluorescence émise par le marquage des cellules MDA-MB 231 traitées est très intense, signifiant une importante accumulation de la protéine γ -H2AX alors que l'intensité du marquage des cellules MCF7 est nettement plus faible permettant de distinguer des foyers γ -H2AX ponctiformes (figure 46)**.

Ces résultats démontrent que **l'Auranofine induit de nombreuses cassures de la double hélice d'ADN dans les cellules MDA-MB 231**. Du fait de leur nombre conséquent, ces cassures sont probablement irréparables, déclenchant alors l'apoptose des cellules traitées. Ce processus apoptotique est clairement mis en évidence par le marquage des cellules traitées au DAPI. En effet, ce composé qui possède la propriété de se fixer à l'ADN révèle la **présence d'une importante fragmentation de ce dernier dans les noyaux des cellules MDA-MB 231 traitées par l'Auranofine**. A l'inverse, en corrélation avec la faible intensité du marquage des foyers γ -H2AX révélant un nombre de cassure de l'ADN plus restreint, le

noyau des cellules MCF7 traitées ne semble pas contenir d'ADN fragmenté (Figure 46).

L'absence de fragmentation de l'ADN nucléaire et l'absence de pic sub-G1 lors de l'étude du cycle cellulaire des cellules MCF7 traitées par l'Auranofine laisse supposer que cette dernière n'exerce pas son action cytotoxique *via* un processus apoptotique dans cette lignée. Les cellules MCF7 n'expriment pas la caspase 3, le déroulement de l'apoptose dans cette lignée ne peut donc pas empreinter la même voie que dans les cellules MDA-MB 231.

De précédentes études ont montré que dans des cellules Jurkat T et des cellules monocytiques U937, l'Auranofine est susceptible de déclencher l'apoptose *via* l'activation de la voie Bax/Bak qui provoque un relarguage du cytochrome c mitochondrial induisant une activation des caspases (Cox, Brown *et al.*, 2008; Rigobello, Folda *et al.*, 2008; Rackham *et al.*, 2011).

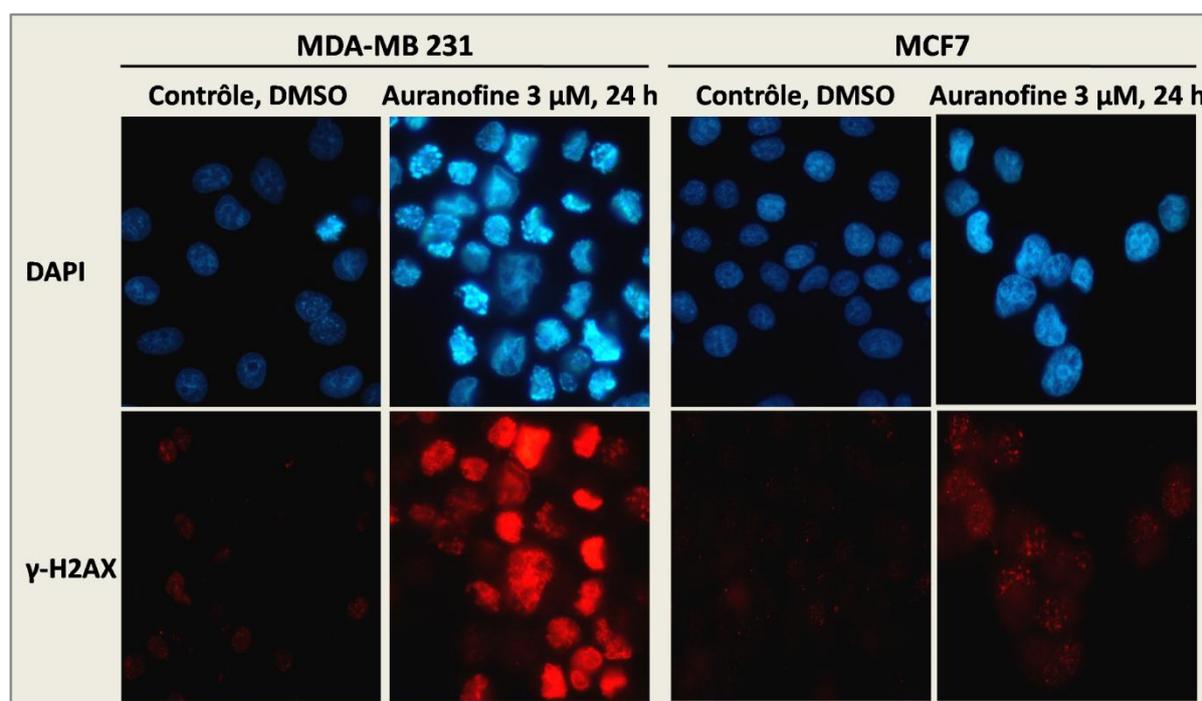


Figure 46 : Mise en évidence de la formation de foyers γ -H2AX dans les cellules MDA-MB 231 et MCF7 traitées par l'Auranofine.

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 3 μ M d'Auranofine ou par 0,2 % de DMSO (contrôle) pendant 24 h, puis incubées en présence d'un anticorps anti- γ -H2AX couplé à un anticorps secondaire (anti-mouse, Alexa fluor 594) qui fluoresce en rouge (Cf. *Matériel et Méthodes*, X ». Les noyaux ont également été marqués au DAPI (fluorescence bleu). Les marquages γ -H2AX et DAPI sont visualisés par microscopie à fluorescence.

II.1.8. Activité CDC25

L'absence de modification du cycle cellulaire après un traitement par l'Auranofine suggère que l'activité CDC25 n'a pas été totalement affectée par l'inhibition de la *trxR*. Afin de confirmer cette hypothèse, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 3 μ M

d'Auranofine pendant 1/2, 3, 6, 12, 24 et 48 h puis des immunorépliques anti-PCDK1, anti-PCDK2, anti-CDK1 et anti-CDK2 ont été réalisées et la densité des bandes obtenues a été calculée (Cf. *Matériel et Méthode*, XII).

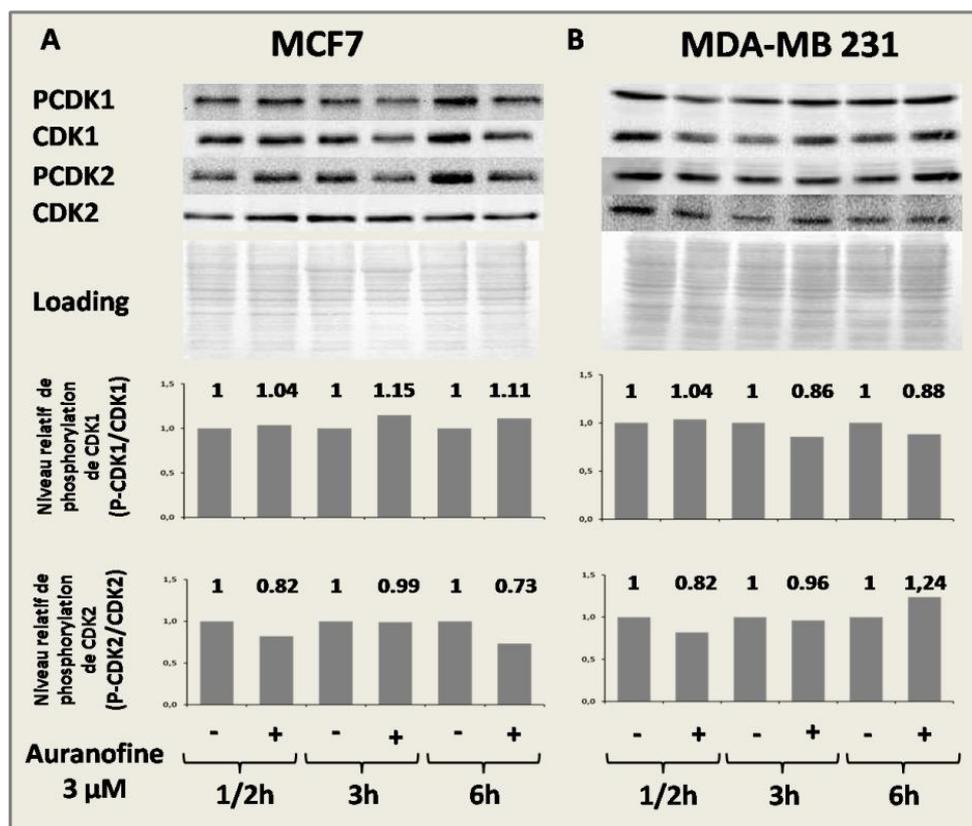


Figure 47 : Effet de l'Auranofine sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B).

Les cellules ont été traitées par 3 μM d'Auranofine pendant 0,5, 3 et 6 h. Les immunorépliques de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été « strippées » et de nouveau immunomarquées pour visualiser respectivement la forme totale de CDK1 et CDK2. Les western-blotting obtenus ont été analysés avec le logiciel « quantity one ». Les niveaux relatifs de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été calculés par comparaison avec le niveau d'expression de CDK1 et CDK2. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

Comme nous le supposons, **pour l'ensemble des conditions testées, le traitement par l'Auranofine ne cause pas d'augmentation de la phosphorylation des CDK1 et CDK2 (figure 47, seul les résultats pour un traitement par 3 μM d'Auranofine pendant 1/2, 3 et 6 h sont représentés). Une inhibition de la trxB seule ne semble donc pas avoir de conséquence sur l'activité CDC25 en dépit de la mise en évidence d'un stress oxydant.** Toutefois, ce résultat n'exclut pas l'intervention du système trx/trxB dans la régulation redox des CDC25 puisque en théorie, les trxB non affectées par l'inhibition des trxB par l'Auranofine possèdent toujours la capacité de protéger le site actif des CDC25.

II.1.9. Conclusion

L'Auranofine est un puissant inhibiteur de l'activité trxR dans les deux lignées MCF7 et MDA-MB 231 puisque 3 μ M d'Auranofine induisent une inhibition totale de l'enzyme. Cette inhibition est associée à une augmentation de la quantité d'ERO dans les deux lignées cellulaires mais le maintien du taux de GSH dans les cellules traitées laisse supposer que cette augmentation ne provoque pas de stress oxydant majeur dans les cellules. Malgré l'inhibition complète de la trxR et l'augmentation du taux d'ERO, l'Auranofine est incapable d'induire une oxydation des trx1 et n'inhibe donc pas totalement le système trx/trxR. L'inhibition de l'activité trxR par l'Auranofine n'a pas de répercussions sur la répartition des cellules MCF7 et MDA-MB 231 dans le cycle cellulaire. Par contre, dans les cellules MDA-MB 231, l'Auranofine induit un processus apoptotique caractérisé par l'apparition d'un pic sub-G1. L'induction de cette apoptose est probablement due à la capacité de l'Auranofine à briser l'ADN nucléaire double-brins des cellules MDA-MB 231.

Finalement, l'utilisation de l'Auranofine nous a permis de montrer qu'une inhibition seule des trxR n'a pas de conséquence sur le déroulement du cycle cellulaire et n'empêche pas les CDC25 d'assurer leur fonction de déphosphorylation des CDK dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231. Dans la suite de notre étude, nous avons donc cherché à inhiber totalement les thiorédoxines réductases et les thiorédoxines afin d'évaluer la contribution de ce système dans le maintien de l'activité CDC25 dans ces cellules.

II.2 Effets de l'inhibition de trxR et de trx par l'Acroléine sur l'activité CDC25

La caractérisation du rôle du système trx/trxR dans la régulation redox des CDC25 nécessite une inhibition totale des thiorédoxines. Or, comme nous l'avons vu précédemment, une inhibition de la thiorédoxine réductase par l'Auranofine ne permet pas d'obtenir une telle inhibition fonctionnelle des trx par oxydation. Une inhibition directe de ces dernières a donc été envisagée. Pour cela, nous avons utilisé un composé aldéhydique, l'Acroléine, dont l'activité inhibitrice de trxR et le potentiel oxydatif de trx1 ont déjà été démontrés dans différents types cellulaires, notamment dans des cellules BEAS-2B, HMEC-1 ou A549 (Cf. *Introduction II.2.4.3.*).

De la même façon que pour l'Auranofine, nous avons déterminé les conditions de traitement permettant d'induire un stress oxydant et une inhibition totale du système thiorédoxine dans

les deux lignées cellulaires. Puis, nous avons observé les effets de ces altérations sur le cycle cellulaire et l'activité CDC25.

II.2.1. Cytotoxicité de l'Acroléine

Pour évaluer la cytotoxicité de l'Acroléine, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes de ce composé [0-50 μM] pendant 24 h puis la viabilité relative des cellules traitées a été déterminée par cytométrie en flux avec le H_2DCFDA et l'IP comme sondes (Cf. *Matériel et méthodes*, IV).

L'Acroléine étant un aldéhyde instable en présence de milieu de culture, les solutions d'Acroléine utilisées pour le traitement ont été préparées dans du PBS puis mises en contact avec les cellules pendant 30 min avant d'être éliminées et remplacées par du milieu complet pendant 23h30. La gamme de concentration testée a été choisie en fonction d'une analyse bibliographique (Cf. *Introduction II.2.4.3.*).

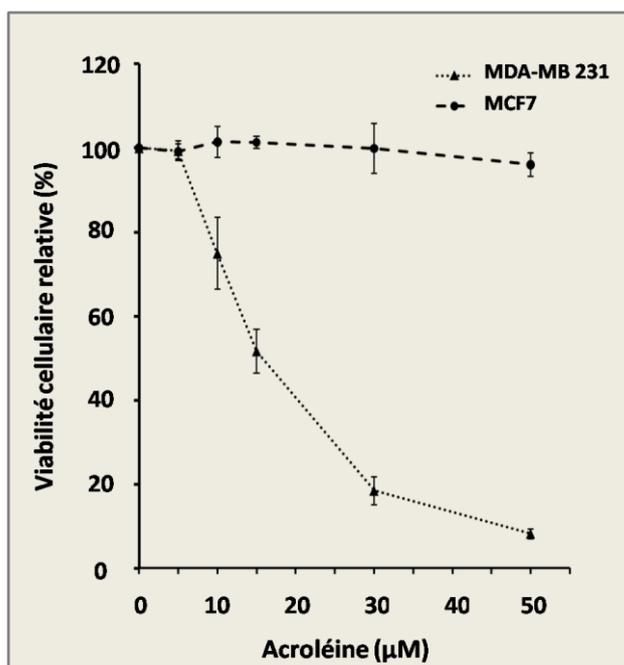


Figure 48 : Evaluation de la cytotoxicité de l'Acroléine sur les cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Acroléine [0-50 μM] pendant 24 h puis la viabilité des cellules MCF7 et MDA-MB 231 a été évaluée par une analyse en cytométrie en flux avec le H_2DCFDA et l'IP comme sondes. $n=3$.

Les résultats obtenus montrent que l'Acroléine n'est pas toxique dans la lignée MCF7 alors que sa CI_{50} est de $13,47 \pm 0,81 \mu\text{M}$ dans la lignée MDA-MB 231 (**figure 48**). Cette importante différence de sensibilité pourrait être liée aux niveaux d'expression de la *trx1*. En effet, pour une même concentration de produit testée, les cellules MCF7 qui surexpriment *trx1*

seraient mieux armées pour résister à une attaque par l'Acroléine. Les expériences qui suivront permettront d'apporter des éléments de réponse à cette hypothèse.

II.2.2. Inhibition de l'activité enzymatique de *trxR1* par l'Acroléine

L'Acroléine est un aldéhyde α , β insaturé hautement électrophile capable de réagir avec de nombreuses molécules nucléophiles en conditions physiologiques. La réaction la plus fréquente est une addition sur le carbone éthylénique terminal de l'Acroléine. Parmi les groupements nucléophiles cibles, on trouve les groupements sulfhydryle des cystéines, les groupements imidazole des histidines et les groupements ϵ aminés des lysines. L'addition nucléophile des groupements sulfhydryle à l'Acroléine a pour principale conséquence l'inhibition de certaines enzymes antioxydantes porteuses de groupements thiols « -SH » dans leur site actif telles que les *trxR* et les *trx*. Ainsi, afin de vérifier si l'activité *trxR* des cellules MCF7 et MDA-MB 231 est encline à ce type d'altération fonctionnelle, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Acroléine [0-30 μ M] pendant 30 min. L'activité *trxR* a ensuite été déterminée sur des homogénats cellulaires en mesurant la réduction du DTNB par spectrophotométrie (Cf. *Matériel et méthodes*, VI).

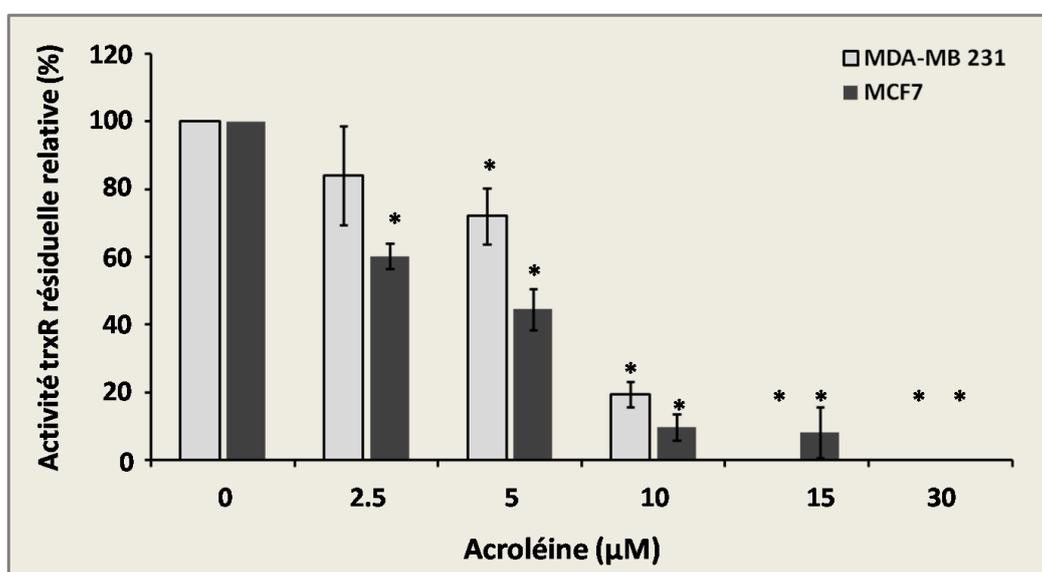


Figure 49 : Inhibition de l'activité *trxR* par l'Acroléine dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Acroléine [0-30 μ M] pendant 30 min. L'activité résiduelle de *trxR* a été évaluée par la mesure de la réduction du DTNB.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, ($n = 3$).

La mesure de l'activité trxR résiduelle révèle que dans les deux lignées cellulaires, trxR est inhibée de façon dose dépendante par l'Acroléine (**figure 49**) avec une inhibition légèrement plus importante dans les cellules MCF7 que dans les cellules MDA-MB 231. Par exemple, pour une concentration de 10 μM , le pourcentage d'activité trxR résiduelle est de $19 \pm 4 \%$ chez MDA-MB 231 et de $10 \pm 4 \%$ chez MCF7. **Les plus fortes doses d'Acroléine, 15 et 30 μM , provoquent une inhibition totale de l'activité trxR (figure 47).**

D'après les résultats cités dans le paragraphe précédent (Cf. II.2.1), il est intéressant de noter que l'inhibition de l'activité trxR par l'Acroléine ne déclenche pas de processus de mort cellulaire dans les cellules MCF7.

II.2.3. Production d'ERO par l'Acroléine

En plus de son action inhibitrice de trxR, l'Acroléine est également connue dans la littérature pour engendrer une déplétion en GSH dans les cellules traitées (Cf. *Introduction II.2.4.3.*). Cet affaiblissement des défenses antioxydantes est susceptible d'engendrer un accroissement de la quantité d'ERO intracellulaires. Afin de déterminer si tel est le cas, les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Acroléine [0-30 μM] pendant 30 min. Les quantités d'ERO et d'anion superoxyde intracellulaires ont ensuite été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H_2DCFDA et la DHE comme sondes (Cf. *Matériel et méthodes, V.*). Les résultats obtenus révèlent **une augmentation significative d'ERO mais pas d'anions superoxyde dans les cellules MDA-MB 231 traitées par l'Acroléine.** En effet, pour l'ensemble des concentrations testées on observe une multiplication comprise entre 1,5 et 1,8 de la quantité d'ERO par rapport aux cellules non traitées (**figure 50**). Par contre, dans les cellules MCF7, la légère augmentation de la quantité d'ERO observée pour les cellules traitées n'est pas significativement différente de celle des cellules contrôles. Ainsi, selon les résultats obtenus il semble que l'Acroléine soit capable d'induire un stress oxydant dans les cellules MDA-MB 231 mais pas dans les cellules MCF7. Cette différence de statut redox pourrait être associée à la plus grande sensibilité des cellules MDA-MB 231 en terme de cytotoxicité. Comme dans le cas de l'Auranofine, l'altération de l'activité trxR par l'Acroléine pourrait contribuer à l'installation d'un stress oxydant *via* l'oxydation des peroxyrédoxines. En effet, Myers *et al* ont montré qu'un traitement par l'Acroléine induit une oxydation dose dépendante des peroxyrédoxines 1 et 3 (Myers and Myers, 2009). De plus, l'invariabilité du taux d' O_2^- dans les cellules traitées suggère que pour les doses testées, le stress oxydant induit par l'Acroléine est imputable à une accumulation d'ERO plutôt qu'à une production à partir de l'anion

superoxide. Toutefois, une telle production pourrait exister pour des doses plus importantes puisqu'il a été montré qu'un traitement par 30 et 100 μM d'Acroléine induit une augmentation significative de la quantité d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine et des cellules endothéliales d'aorte bovine (Jaimes *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006).

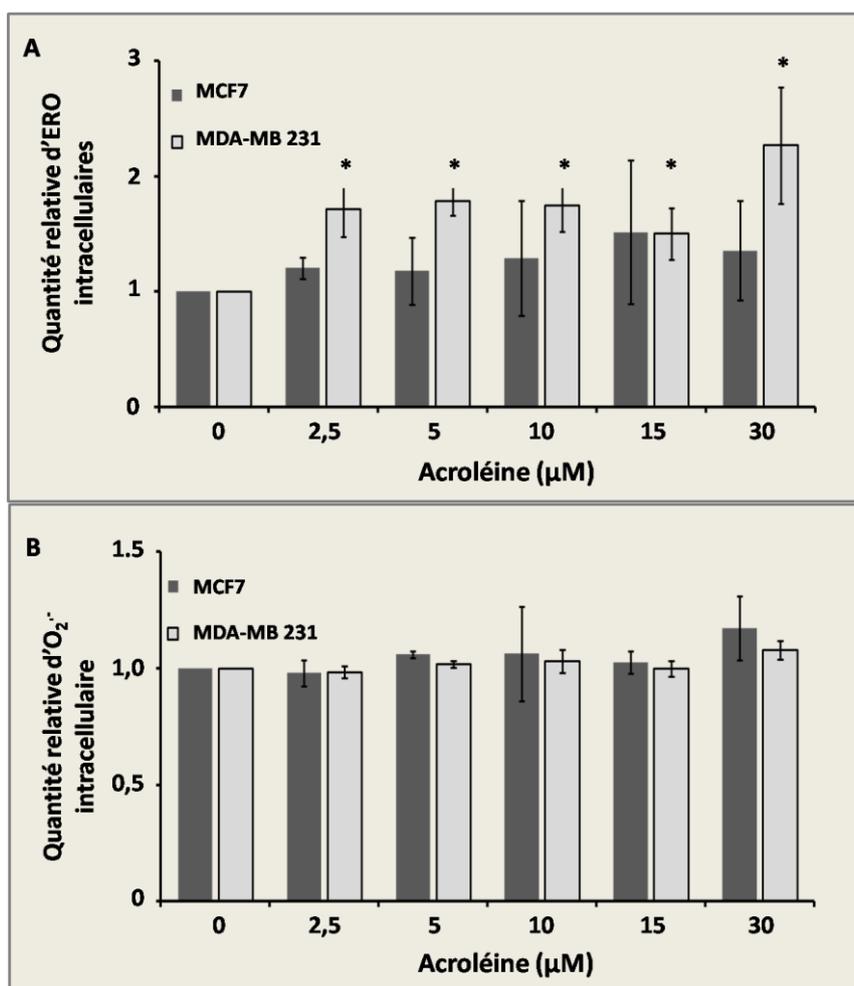


Figure 50 : Production d'ERO dans les cellules MCF7 et MDA-MB 231 traitées par l'Acroléine.

Les cellules ont été traitées par des concentrations croissantes d'Acroléine [0-30 μM] pendant 30 min. Les quantités relatives d'ERO (A) et d'anions superoxyde (B) ont été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H_2DCFDA et le DHE comme sondes fluorescentes.

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, ($n = 3$).

II.2.4. Etat d'oxydation des thiorédoxines 1

La réactivité de l'Acroléine avec les groupements thiol, sa capacité à inhiber l'activité trxR1 et l'augmentation associée de la quantité d'ERO observée précédemment dans les cellules MDA-MB 231 semblent être des conditions favorables à une oxydation des trx1 dans cette lignée cellulaire. Par contre, dans la lignée MCF7, le manque de cytotoxicité et le

manque de production significative d'ERO présage d'un profil d'oxydation des trx1 plus modéré. Pour vérifier ces hypothèses, les deux lignées cellulaires ont été traitées par des concentrations croissantes d'Acroléine [0-30 μM] pendant 30 min puis l'état d'oxydation des trx1 a été évalué (Cf. *Matériel et Méthodes*, VII).

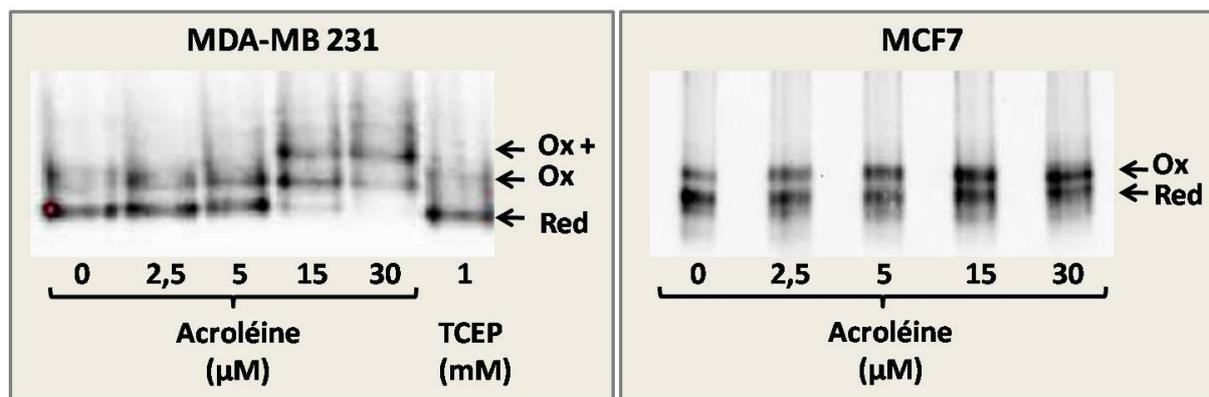


Figure 51 : Effet de l'Acroléine sur l'état redox des trx1 des cellules MCF7 et MDA-MB 231.

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par des concentrations croissantes en Acroléine [0-30 μM] pendant 30 min. Les cellules ont ensuite été récupérées dans un tampon contenant de l'acide iodoacétique et le statut redox des trx1 a été déterminé (*matériel et méthodes*, VIII). Les formes redox de trx sont indiquées de la façon suivante : « Red » pour la forme réduite ; « Ox » pour la forme partiellement oxydée et « Ox+ » pour la forme totalement oxydée. Un traitement des cellules MDA-MB 231 par 1 mM de TCEP fournit un contrôle positif de la réduction des trx1. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

Après un traitement par l'Acroléine, les trx1 des cellules MCF7 présentent un profil d'oxydation opposé à celui des trx1 des cellules MDA-MB 231 (**figure 51**). Trois différents états redox sont visibles pour les cellules MDA-MB 231 contre seulement deux pour les cellules MCF7. **Pour des concentrations comprises entre 0 et 5 μM d'Acroléine, les trx1 des cellules MDA-MB 231 sont partagés entre un état réduit et un état d'oxydation intermédiaire puis à partir de 15 μM ces trx1 sont totalement oxydées.** Par contre, **dans les cellules MCF7, l'état redox des trx1 reste partagé entre un état réduit et un état intermédiaire d'oxydation quelle que soit la dose d'Acroléine testée (figure 51).** Comme nous l'avons cité dans l'introduction de cette partie, de précédentes études ont montré la capacité de l'Acroléine à oxyder des trx1 purifiées ou cellulaires dans des cellules HMEC-1, BAEC or BEAS-2B (Go *et al.*, 2007; Szadkowski and Myers, 2008; Myers and Myers, 2009). Yang *et al* ont également mis en évidence l'inhibition de l'activité trx dans des cellules A549 traitées par l'Acroléine (Yang *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude n'avait jusqu'à lors mis en évidence une telle différence d'oxydation des trx1 entre deux lignées traitées par

l'Acroléine. La résistance des cellules MCF7 à l'Acroléine pourrait être liée à la conservation de l'état réduit d'une partie de ses trx1, probablement grâce à l'important niveau d'expression de ces dernières.

II.2.5. Dosage intracellulaire du glutathion réduit

Afin de mieux caractériser l'état de stress oxydant dans lequel se trouvent les cellules traitées par l'Acroléine, nous avons évalué leur contenu en GSH intracellulaire. Les cellules ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 30 min puis le glutathion réduit a été dosé par CLHP (Cf. *Matériel et Méthode, VIII*).

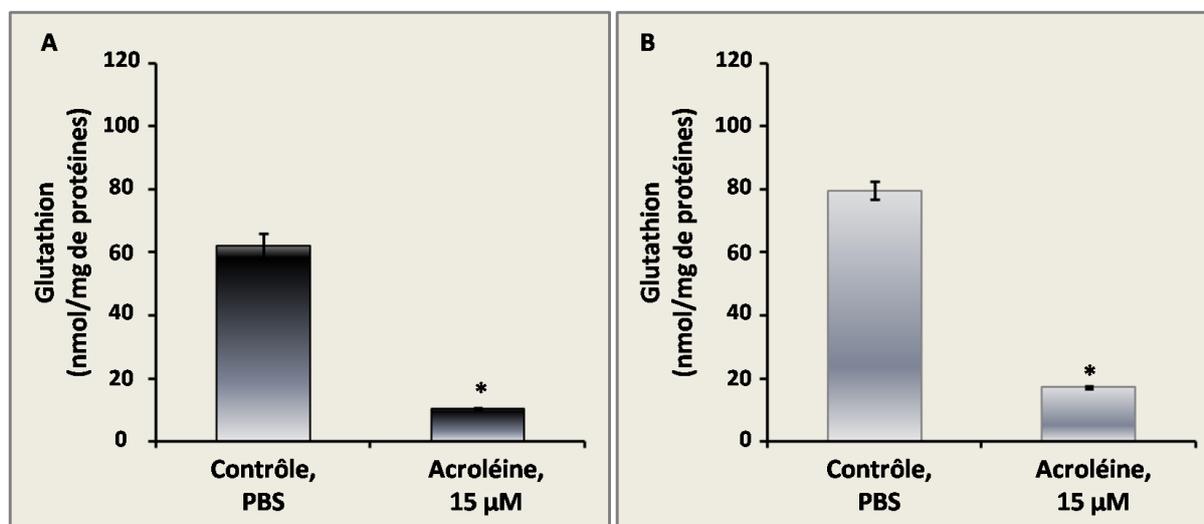


Figure 52 : Effet de l'Acroléine sur le contenu intracellulaire en glutathion réduit des cellules MCF7 (A) et des cellules MDA-MB 231 (B).

Les cellules ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 30 min puis le dosage du glutathion intracellulaire a été réalisé par CLHP (Cf. *Matériel et Méthode, VIII*).

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, (n = 3).

Les résultats présentés en **figure 52** montrent que **l'Acroléine provoque une importante déplétion du contenu intracellulaire en GSH dans les deux lignées cellulaires**. En effet, la concentration en GSH passe de $79,64 \pm 2,86$ nmol de GSH / mg de protéines dans les cellules contrôles à $17,20 \pm 0,37$ nmol de GSH / mg de protéines dans les cellules traitées pour la lignée MDA-MB 231 et de $62,10 \pm 4,10$ nmol de GSH / mg de protéines dans les cellules contrôles à $10,54 \pm 0,11$ nmol de GSH / mg de protéines dans les cellules traitées pour la lignée MCF7. Cette importante diminution de la quantité de GSH lors du traitement traduit l'existence d'un stress oxydant dans les cellules traitées. Toutefois, l'analyse des précédents résultats, concernant l'état d'oxydation des trx1 et la mesure de la quantité d'ERO intracellulaire, suggère que dans la lignée MCF7, le stress oxydant induit est probablement

nettement plus modéré que dans les cellules MDA-MB 231. De plus, la comparaison entre la faible augmentation d'ERO induite par l'Acroléine et l'importante diminution de la quantité de GSH observée dans les cellules MCF7 lors du traitement suggère que la déplétion en glutathion n'est pas due à une sur-production de peroxydes. Selon la littérature, deux mécanismes pourraient expliquer la chute du taux de GSH lors d'un traitement par l'Acroléine. Premièrement, l'Acroléine peut s'attaquer directement au pool de glutathion réduit en se liant de façon covalente aux groupements sulfhydryl du GSH (Esterbauer *et al.*, 1991). Deuxièmement, l'Acroléine est susceptible de former des adduits avec les résidus lysine des protéines or ces adduits nommés FDP-lysine (N-(3-formyl-3,4-dehydropiperidino)lysine) seraient capables de se lier au GSH, induisant une diminution du glutathion réduit libre (Furuhata *et al.*, 2002).

La déplétion en GSH observée n'est pas nécessairement à l'origine de la cytotoxicité de l'Acroléine. Pour preuve, les cellules MCF7 qui subissent une importante altération de leur contenu en GSH lors d'un traitement par l'Acroléine sont aussi particulièrement résistantes vis-à-vis de cette molécule en termes de cytotoxicité. La même observation avait été rapportée par l'équipe de Horton *et al* qui a mené son étude sur des cellules de la lignée A549 (Horton *et al.*, 1997). Si une déplétion en GSH est souvent associé à un phénomène apoptotique, il semblerait que le déclenchement du processus dépende du pool de GSH atteint (mitochondrial et/ou cytosolique), de la durée de la déplétion. En effet, une reconstitution rapide du pool de GSH affecté par une synthèse *de novo* pourrait empêcher l'initiation d'un événement apoptotique (Kehrer and Biswal, 2000). On peut donc émettre l'hypothèse que l'important niveau d'expression de la thiorédoxine dans les cellules MCF7 est capable de compenser les effets délétères de la déplétion en glutathion provoqué par l'Acroléine dans ces cellules.

II.2.6. Répartition des cellules dans le cycle cellulaire

L'inhibition des *trxR*, l'oxydation des *trx1* et la modification du statut redox des cellules MDA-MB 231 par l'Acroléine sont susceptibles de provoquer des dommages cellulaires induisant un arrêt de la progression du cycle des cellules. Un tel arrêt est moins probable dans les cellules MCF7 dans lesquelles l'Acroléine induit moins de modifications. Afin de tester ces hypothèses, nous avons traité les cellules MDA-MB 231 et MCF7 par 15 μM d'Acroléine pendant 48 h puis la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux avec un marquage de l'ADN à l'IP (Cf. *Matériel et Méthodes*, IX). Suivant le même protocole que celui utilisé lors de

l'évaluation de la cytotoxicité du composé, les cellules ont été mises en contact avec l'Acroléine diluée dans du PBS pendant 30 min puis le traitement a été remplacé par du milieu frais sans acroléine pendant le temps restant. La concentration de 15 μ M a été choisie pour sa capacité à engendrer une oxydation totale des trx1 après 30 min de traitement et pour sa cytotoxicité proche de la CI_{50} dans les cellules MDA-MB 231 après 48 h de traitement. Comme nous l'avions supposé, les résultats obtenus révèlent que **l'Acroléine n'a pas d'effet sur la répartition des cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire**. Par contre, **elle provoque un arrêt du cycle des cellules MDA-MB 231 en phase G2-M**. En effet, après 48 h de traitement, 41.69 ± 3.82 % des cellules se trouvent en phase G2-M contre 19.45 ± 2.25 % dans le cas des cellules contrôles.

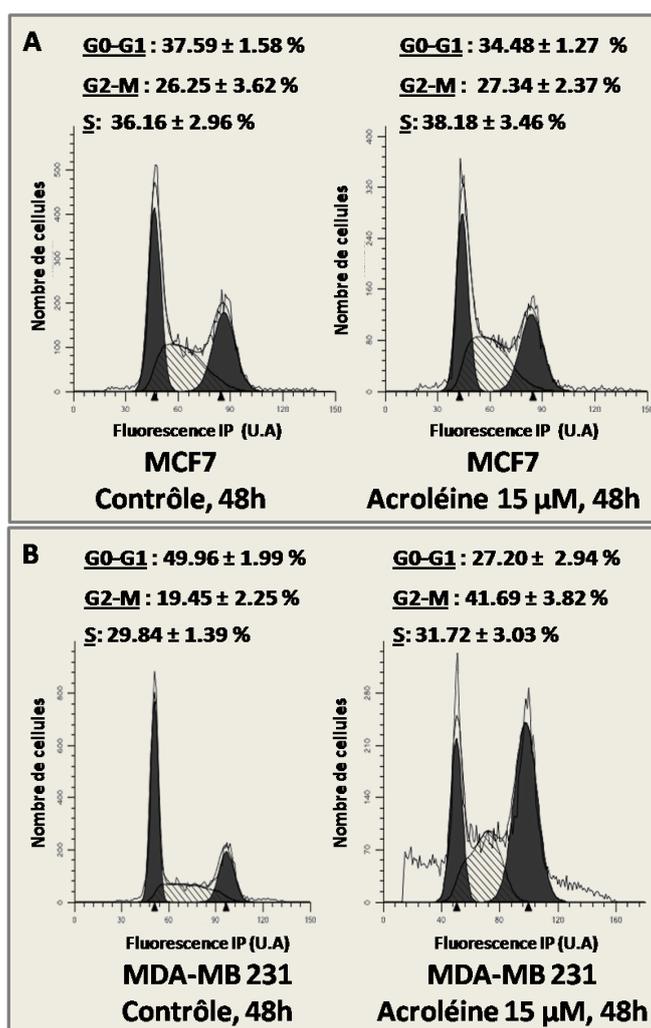


Figure 53 : Effet de l'Acroléine sur la répartition des cellules MCF7 (A) et MDA-MB 231 (B) dans les différentes phases du cycle cellulaire.

Les cellules ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 48 h puis la distribution des cellules dans le cycle cellulaire a été déterminée par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation de l'IP dans l'ADN. Le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase a été calculé à l'aide du logiciel « modfit ».

Les valeurs rapportées ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

De plus, dans le cas des cellules MDA-MB 231 traitées, on constate l'apparition d'une importante phase sub-G1 (Figure 53). Cette dernière met en évidence la capacité de l'Acroléine à induire l'apoptose de ces cellules.

Afin d'étudier la cinétique d'accumulation des cellules MDA-MB 231 en phase G2-M, les cellules ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine et une mesure de leur répartition dans les différentes phases du cycle a été réalisée après 6, 12, 24 et 48 h de traitement. Les résultats obtenus montrent que l'arrêt du cycle en phase G2-M se produit à partir de 12 h de traitement. En effet, après 6 h, le pourcentage de cellules MDA-MB 231 traitées en phase G2-M diminue légèrement par rapport au pourcentage constaté pour les cellules contrôles. Par contre, après 12 h de traitement, le pourcentage de cellules en phase G2-M augmente continuellement jusqu'à atteindre un quasi doublement de la population dans cette phase après 48 h de traitement (figure 54).

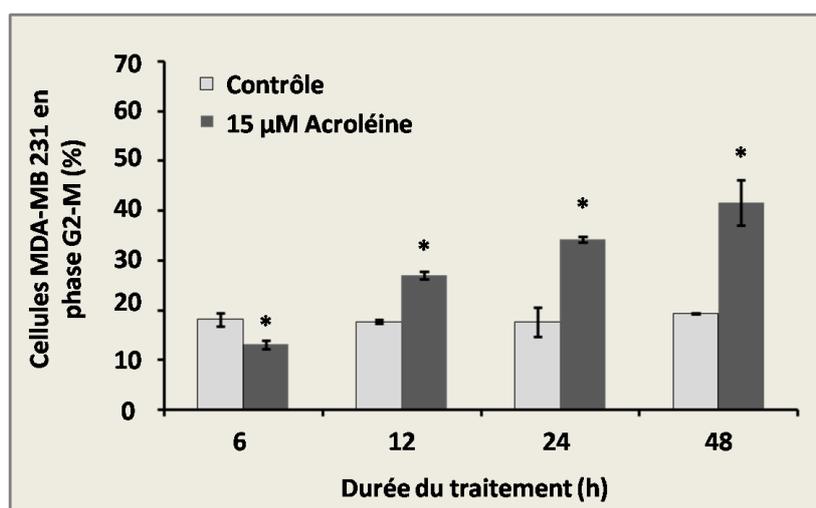


Figure 54 : Evolution du taux de cellules MDA-MB 231 en phase G2-M au cours du temps lors d'un traitement par l'Acroléine.

Les cellules MCF7 et MDA-MB 231 ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 6, 12, 24 et 48 h. Le pourcentage de cellules en phase G2-M a été évalué par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation de l'IP dans l'ADN. Le pourcentage de cellules présentes en phase G2-M a été calculé à l'aide du logiciel « modfit ».

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : $P < 0.05$, ($n = 3$).

II.2.7. Activité CDC25

Si notre hypothèse de régulation « redox » des CDC25 par les trx devait se vérifier alors l'oxydation totale des trx1 et le stress oxydant associé provoqué par l'Acroléine dans les cellules MDA-MB 231 pourrait causer une inhibition des CDC25 qui serait responsable de l'arrêt du cycle en G2-M. Afin de vérifier cette théorie, nous avons évalué l'activité des CDC25 dans la lignée MDA-MB 231 par la mesure de l'état de phosphorylation des kinases

CDK1 et CDK2 (Cf. *Matériel et Méthode, XII*). Les cellules MDA-MB 231 ont donc été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 0,5, 3, 6, 12, 24 et 48 h puis des immunorépliques anti-PCDK1, anti-PCDK2, anti-CDK1 et anti-CDK2 ont été réalisées et la densité des bandes obtenues a été déterminée.

Les résultats obtenus révèlent que **l'Acroléine n'induit pas d'hyper-phosphorylation des CDK dans les cellules MDA-MB 231 traitées quelque soit le temps de traitement considéré (figure 52, seul les résultats pour un traitement par 15 μ M d'Acroléine pendant 1/2, 3 et 6 h sont représentés)**. L'arrêt du cycle cellulaire provoqué par l'Acroléine dans les cellules MDA-MB 231 ne serait donc pas dû à une hyperphosphorylation des CDK consécutive à une inhibition des CDC25.

Cependant, d'autres mécanismes pourraient expliquer cet arrêt. Par exemple, la littérature relate la capacité de l'Acroléine à induire des cassures double brins de l'ADN et à alkyler les bases de ce dernier tel que la déoxyguanosine, engendrant la formation d'adduits ADN-protéines ou la création de « cross-linking » entre des bases des deux brins de l'ADN. Ces altérations peuvent bloquer la réplication de l'ADN et donc arrêter la progression du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2008; Stevens and Maier, 2008; Voulgaridou *et al.*, 2011). D'autres mécanismes pourraient également expliquer l'accumulation des cellules en phase G2-M. Par exemple, de récentes études ont montré qu'un stress oxydant entraîne une dérégulation de l'expression de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'homéostasie redox parmi lequel le gène *FOXM1*. La protéine FoxM1 régule la transcription d'un groupe de gènes conservés intervenant dans la régulation de la transition G2-M incluant la cycline B, la survivine, la cycline D1, p21Cip1, p27Kip1, la kinase Aurora B ou la kinase Polo-like, (Laoukili *et al.*, 2007). Or, il a été montré qu'une diminution de l'expression de FoxM1 est associée à une sous-expression des gènes régulateurs des phases S, G2 et M du cycle cellulaire (Chua *et al.*, 2009). Ainsi, l'accumulation d'ERO induite par l'Acroléine pourrait affecter l'expression de FoxM1 et donc modifier la distribution des cellules dans le cycle *via* une altération de l'expression de protéines régulatrice du cycle. Cette hypothèse est étayée par une précédente étude qui a rapporté que H₂O₂ pourrait induire des arrêts transitoires des différentes phases de cycle à travers la modulation de l'expression des cyclines D1 et de p21Cip1 dans des fibroblastes de souris (Barnouin *et al.*, 2002).

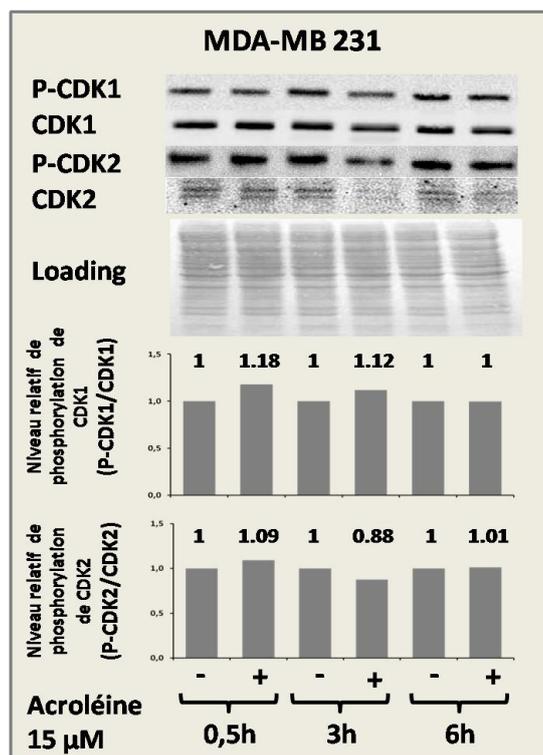


Figure 55 : Effet de l'Acroléine sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MDA-MB 231.

Les cellules ont été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 0,5, 3 et 6 h. Les immunorépliques de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été « strippées » et de nouveau immunomarquées pour visualiser respectivement la forme totale de CDK1 et CDK2. Les western-blotting obtenus ont été analysés avec le logiciel « quantity one ». Les niveaux relatifs de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été calculés par comparaison avec le niveau d'expression de CDK1 et CDK2. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

Il est possible que l'Acroléine induise également des dommages à l'ADN dans le cas des MCF7 mais on peut émettre l'hypothèse que ces altérations pourraient être très rapidement réparées dans ce type cellulaire par rapport aux cellules MDA-MB 231. En effet, les cellules MDA-MB 231 possède une protéine p53 mutée, ce qui n'est pas le cas des cellules MCF7 (Bartek *et al.*, 1990). Or, comme p53 joue un rôle important dans le recrutement des systèmes de réparation de l'ADN, nous pouvons supposer que les cellules MCF7 sont mieux armées pour résister à l'Acroléine, ce qui pourrait expliquer que cette dernière n'est pas cytotoxique pour ces cellules.

II.2.8. Dommage à l'ADN

Nous avons émis dans le chapitre précédent l'hypothèse selon laquelle, l'arrêt du cycle cellulaire engendré par l'Acroléine dans la lignée MDA-MB 231 pourrait être dû à des altérations de l'ADN telles que des cassures doubles brins. En effet, de tels dommages de l'ADN ont pu être mis en évidence par exemple dans des cellules HepG2 par l'équipe de Li *et*

al (Li, Jiang et al., 2008). Afin de tester cette hypothèse, nous avons vérifié la présence de foyers γ -H2AX dans les noyaux des cellules traitées, comme nous l'avons fait pour l'Auranofine (Cf. *Résultats*, II.1.7). Les cellules MDA-MB 231 ont donc été traitées par 15 μ M d'Acroléine pendant 24 h puis l'expression de γ -H2AX a été étudiée par immunofluorescence (Cf. *Matériel et Méthodes*, X).

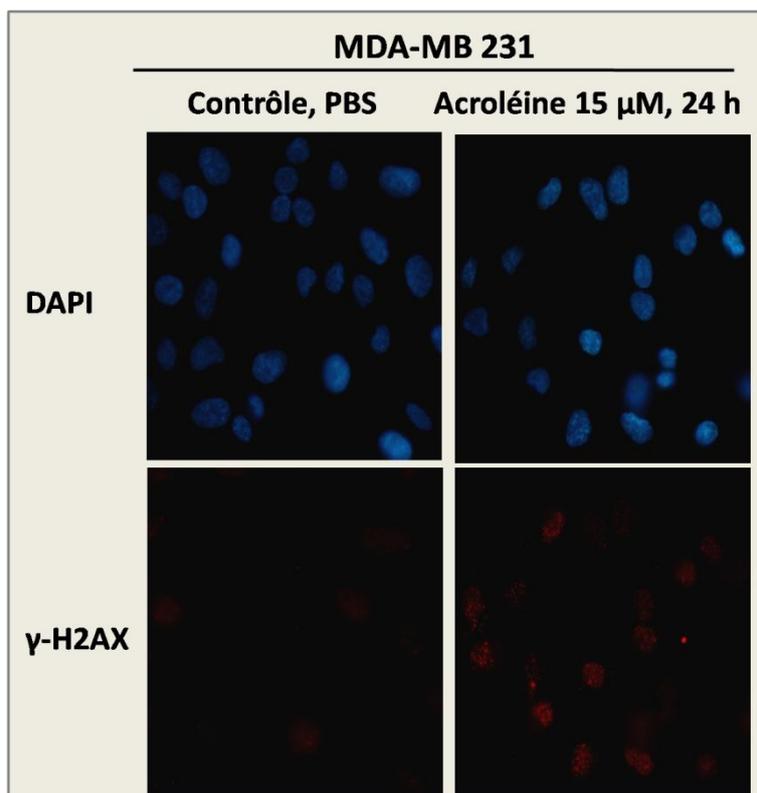


Figure 56 : Mise en évidence de la formation de foyers γ -H2AX dans les cellules MDA-MB 231 traitées par l'Acroléine.

Les cellules MDA-MB 231 ont été traitées par 15 μ M d'Auranofine ou incubées en présence de PBS (contrôle) pendant 30 min puis le traitement a été remplacé par du milieu complet pendant 23 h 30. Les cellules ont ensuite été incubées en présence d'un anticorps anti- γ -H2AX couplé à un anticorps secondaire (anti-mouse, Alexa fluor 594) qui fluoresce en rouge (Cf. *Matériel et Méthodes*, X). Les noyaux ont également été marqués au DAPI (fluorescence bleu). Les marquages γ -H2AX et DAPI sont visualisés par microscopie à fluorescence.

Les images de microscopie à fluorescence obtenues nous apprennent que 67.5 % des cellules traitées sont marquées positivement alors qu'aucune cellule marquée n'est détectable dans le cas du contrôle ce qui signifie **que l'Acroléine induit des cassures double brins dans l'ADN nucléaire des cellules MDA-MB 231 traitées**. Cependant, la faible intensité du marquage suggère **qu'après 24 h de traitement le nombre de cassures reste limité** ce qui explique probablement que nous n'observons pas de fragmentation de l'ADN dans les noyaux des cellules traitées. Nous supposons que cela peu évoluer pour un temps de

traitement plus long car nous avons noté la présence d'un important pic sub-G1 lors de l'analyse du cycle cellulaire des cellules MDA-MB 231 après 48 h de traitement.

II.2.9. Conclusion

L'Acroléine, utilisée à une concentration de 15 μM est capable d'inhiber totalement l'activité trxR dans les deux lignées cellulaires MCF7 et MDA-MB 231. Cependant, les cellules MCF7 résistent au traitement à la différence des cellules MDA-MB 231 pour lesquelles l'Acroléine est fortement cytotoxique. L'inhibition de la trxR est associée à une augmentation significative de la quantité d'ERO et à une oxydation totale des trx1 dans la lignée MDA-MB 231. Dans les deux types cellulaires, le traitement induit une forte déplétion en GSH mais seules les cellules MDA-MB 231 voient leur cycle cellulaire perturbé avec un blocage des cellules en phase G2-M et l'apparition d'une importante phase sub-G1. Nous avons montré que cet arrêt du cycle cellulaire n'est pas dû à une hyper-phosphorylation des CDK mais est associé à des altérations de l'ADN nucléaire des cellules traitées. Ainsi, malgré l'inhibition complète du système trx/trxR et l'important stress oxydant subit par les cellules MDA-MB 231, l'activité des CDC25 semble maintenue à un niveau suffisant pour assurer la déphosphorylation des CDK. Ces observations nous mènent à conclure que dans les cellules MDA-MB 231, le maintien de l'activité CDC25 n'est pas dépendante de l'état de fonctionnalité des thiorédoxines lors d'un stress oxydant.

III. Effet d'une surexpression de la MnSOD sur l'activité CDC25

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la conservation de l'état redox des CDC25 est probablement lié à l'existence d'un système protecteur ou réparateur mais l'utilité de cette protection est dépendante du taux intracellulaire de peroxyde d'hydrogène et donc de l'expression et de l'activité des enzymes qui le fabrique. Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons évalué les effets d'un stress oxydant généré grâce à un apport exogène d' H_2O_2 ou grâce à l'utilisation d'inhibiteur du système trx/trxR, sur l'activité des CDC25. Cependant, dans les cellules, H_2O_2 est notamment produit par l'action des superoxyde dismutases (SOD). Il est donc envisageable qu'en fonction du niveau d'expression de ces dernières, les CDC25 soient plus ou moins exposées au risque d'oxydation par H_2O_2 . Isolées en 1939, les SOD sont les premières enzymes dont l'activité antioxydante a été mise en évidence (Valko, Rhodes *et al.*, 2006). Chez les mammifères il existe trois types de SOD : une isoforme tétramérique de 80 kDa présente dans les mitochondries appelée MnSOD, une isoforme cytosolique dimérique de 32 kDa nommée Cu/ZnSOD que l'on retrouve également

dans l'espace intermembranaire mitochondrial et une isoforme extracellulaire, ECSOD (Malumbres and Barbacid, 2009). Les SOD catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène (3). Ce peroxyde d'hydrogène est ensuite éliminé par l'action des peroxyrédoxines, des glutathion peroxydases ou de la catalase.

SOD



L'action de la MnSOD dans la mitochondrie, où la production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ est très importante, semble être essentielle pour le maintien de la vie cellulaire contrairement à l'action de la Cu/ZnSOD dans le cytosol. En effet des souris présentant un *knockout* pour la MnSOD meurent rapidement après la naissance alors que des souris présentant un *knockout* pour la Cu/ZnSOD s'adaptent et survivent. L'importance relative de la MnSOD par rapport à la Cu/ZnSOD est également soutenue par la possibilité d'induction de son expression par un stress oxydant et par la thiorédoxine, cette induction n'existant pas pour la Cu/Zn-SOD [Nordberg & Arnér 2001].

Les SOD ont un rôle antioxydant primordial car l'anion superoxyde qu'elles éliminent est bien plus réactif que le peroxyde d'hydrogène qu'elles libèrent. Cependant, si les quantités d' H_2O_2 produites sont trop importantes, les cellules peuvent entrer en apoptose ou, à moindre échelle, leur croissance et leur cycle cellulaire peuvent être perturbés (Oberley, 2005). De nombreuses études ont d'ores et déjà montré qu'un changement d'expression de la MnSOD a un impact sur le cycle cellulaire des cellules étudiées (Kim *et al.*, 2010). Par exemple, une étude menée sur des fibroblastes de souris NIH/3T3 a montré qu'une augmentation de la quantité intracellulaire d' H_2O_2 due à une surexpression des MnSOD est corrélée avec une accumulation des cellules en phase G0-G1 (Kim *et al.*, 2004).

Une accumulation d' H_2O_2 liée à une surexpression de la MnSOD dans les lignées que nous étudions pourrait donc avoir des conséquences sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire *via* une altération de l'activité des CDC25. Ainsi, une variation du niveau d'expression des MnSOD pourrait alors engendrer une variation du niveau de la phosphorylation des CDK. Cette hypothèse est renforcée par les résultats présentés en **figure 57** puisque l'on constate que dans les cellules MDA-MB 231, qui possèdent un fort niveau d'expression de la MnSOD, le niveau de phosphorylation des CDK1 et des CDK2 est plus important que dans les cellules MCF7 dont l'expression des MnSOD est nettement plus faible. De ce fait, les CDC25 des cellules MDA-MB 231 pourraient être plus rapidement

inactivées par oxydation que celles des cellules MCF7 ce qui pourrait rendre les MDA-MB 231 davantage sensibles à un traitement pro-oxydant. C'est l'hypothèse que nous nous proposons de tester.

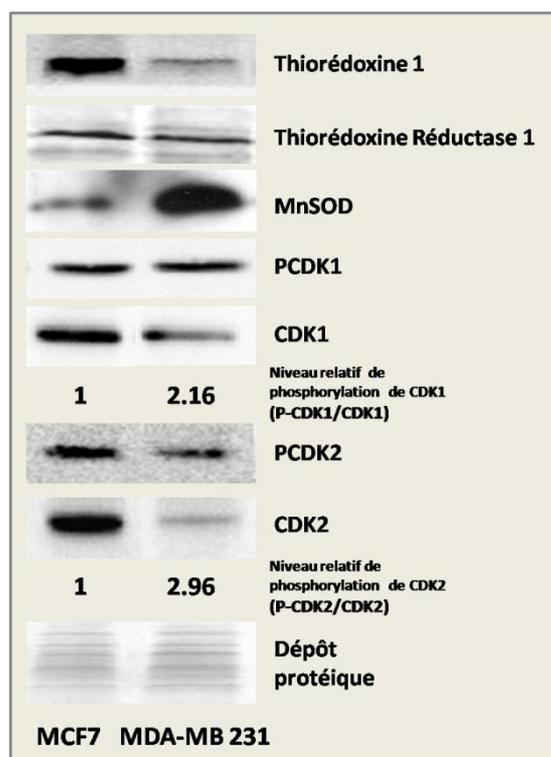


Figure 57 : Niveau d'expression de trx 1, de trxR1 et de MnSOD et phosphorylation de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7 et les cellules MDA-MB-231.

Les niveaux d'expression des protéines et le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 des PCDK1 et 2 ont été évalués par western blotting (Cf. *Matériel et Méthodes*, XI). Les immunorépliques de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été « strippées » et de nouveau immunomarquées pour visualiser respectivement la forme totale de CDK1 et CDK2. Les western-blotting obtenus ont été analysés avec le logiciel « quantity one ». Les niveaux relatifs de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été calculés par comparaison avec le niveau d'expression de CDK1 et CDK2.

Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.

Les immunoblotting précédemment évoqués n'étant pas une preuve suffisante pour attester d'une corrélation entre le niveau d'expression de la MnSOD et l'activité des CDC25, nous avons fait varier le niveau d'expression de la MnSOD dans la lignée MCF7 puis nous avons évalué l'effet de cette variation sur les phases du cycle cellulaire et la phosphorylation des CDK. Le niveau d'expression de la Cu/ZnSOD ne variant pas entre la lignée MCF7 et la lignée MDA-MB 231, le rôle de cette enzyme dans l'inactivation des CDC25 n'a pas été abordé (Ennen *et al.*, 2011). Nous avons ainsi débuté une collaboration avec l'équipe du professeur Becuwe du laboratoire SIGRETO de l'université de Nancy I qui possède un vecteur d'expression pcDNA3.1+ intégrant l'ADNc de la MnSOD. Dans le but d'étudier les effets d'une surexpression de la MnSOD, les cellules MCF7 ont été transfectées avec ce

vecteur ou avec le vecteur contrôle (pcDNA3.1+ vide) correspondant (Cf. *Matériel et Méthode*, III.6.1.1). Plusieurs clones ont pu être isolés pour lesquels nous avons évalué le niveau d'expression de la MnSOD. L'immunoréplique obtenue en **figure 58** révèle que **l'ensemble des clones sélectionnés présente une nette augmentation de l'expression de la MnSOD par rapport au niveau observé dans les cellules transfectées avec le vecteur contrôle**. Ensuite, comme une augmentation de l'expression des MnSOD n'est pas forcément corrélée à une augmentation de leur activité, nous avons évalué l'activité des enzymes surexprimées selon le protocole décrit dans le chapitre *Matériel et Méthodes*, III.6.1.1.2.2.

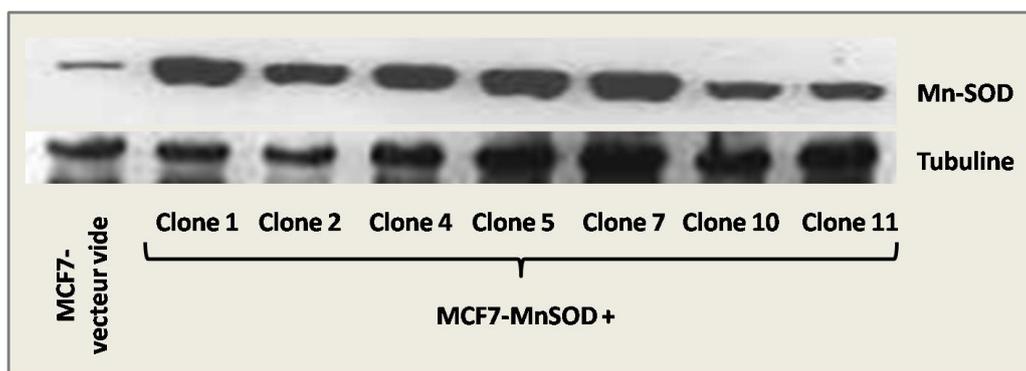


Figure 58 : Niveau d'expression de la MnSOD dans des cellules MCF7 transfectées avec un vecteur d'expression pcDNA3.1+ contenant (MCF7-MnSOD+) ou non (MCF7-vecteur vide) l'ADNc de la Mn-SOD.

Le niveau d'expression de MnSOD a été évalué par western blotting (Cf. *Matériel et Méthodes*, XI). La même quantité de protéines a été déposée pour chaque échantillon.

Selon le gel d'activité présenté en **figure 59**, seuls les clones 1, 4, 5 et 7 voient leur activité MnSOD augmenter par rapport à celle des cellules transfectées avec le vecteur vide. Le clone 1 a donc été amplifié pour mener la suite de l'étude, les cellules correspondantes seront alors nommées « MCF7-MnSOD+ » alors que les cellules ayant incorporées le plasmide vide seront appelées « MCF7-néo ».

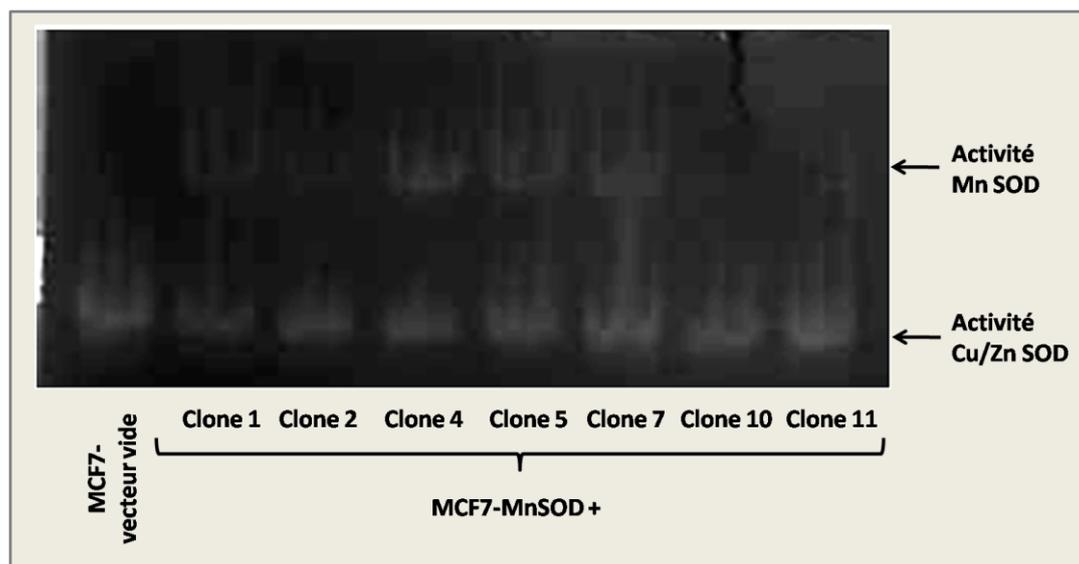


Figure 59 : Activité de la MnSOD dans les cellules MCF7 transfectées avec un vecteur d'expression pcDNA3.1+ contenant (MCF7-MnSOD+) ou non (MCF7-vecteur vide) l'ADNc de la Mn-SOD.

L'activité de la MnSOD et de la Cu/Zn SOD a été déterminée par la réalisation d'une électrophorèse non réductrice suivie d'une révélation par le nitrobleu de tétrazolium/riboflavin (Cf. *Matériel et Méthodes*, III.6.1.1.2.2.). Ce composé est réduit en bleu de formazan par l'anion superoxyde produit par le système xanthine-xanthine oxydase. En cas d'élimination d' $O_2^{\cdot -}$ par les SOD, des zones achromatiques apparaissent sur le gel. L'intensité de ces zones est proportionnelle à l'activité des SOD. La même quantité de protéines a été déposée pour chaque échantillon.

L'hypothétique impact de la surexpression de la MnSOD sur l'activité des CDC25 étant lié à une potentielle surproduction d' H_2O_2 , nous avons évalué la quantité relative d'anion superoxyde et la quantité relative d'ERO présentes dans la lignée MCF7-MnSOD+ par rapport à la quantité présente dans la lignée MCF7-néo. Nous avons pu constater que **le taux d' $O_2^{\cdot -}$ présent dans les cellules MnSOD+ est 1,2 fois plus faible que dans les cellules MCF7-néo (Figure 60, A)**. Cette diminution peut être directement corrélée avec l'augmentation de l'activité de la MnSOD dans les cellules MnSOD+. Cependant, malgré cette diminution du taux d' $O_2^{\cdot -}$ et malgré l'augmentation de l'activité MnSOD dans la lignée surexprimant cette dernière, **aucune modification de la quantité de peroxydes n'est observable entre les deux lignées cellulaires (Figure 60, B)**.

Pour expliquer ce résultat, on peut émettre l'hypothèse que la quantité de catalase et de peroxydases (peroxyrédoxines et glutathion peroxydases) présentes au niveau des mitochondries des cellules MnSOD+ pourrait être suffisamment importante pour prendre en charge le peroxyde d'hydrogène produit en excès et donc conserver le taux de peroxydes constant malgré leur surproduction. Cette hypothèse est consolidée par l'étude de Kattan *et al* (Laboratoire du professeur Becuwe) qui a montré que les activités de la catalase et la Gpx

sont plus élevées dans les cellules MCF7 que dans les cellules MDA-MB 231 et qu'il en est de même pour le niveau d'expression de la catalase et des prx 3 (Kattan *et al.*, 2008).

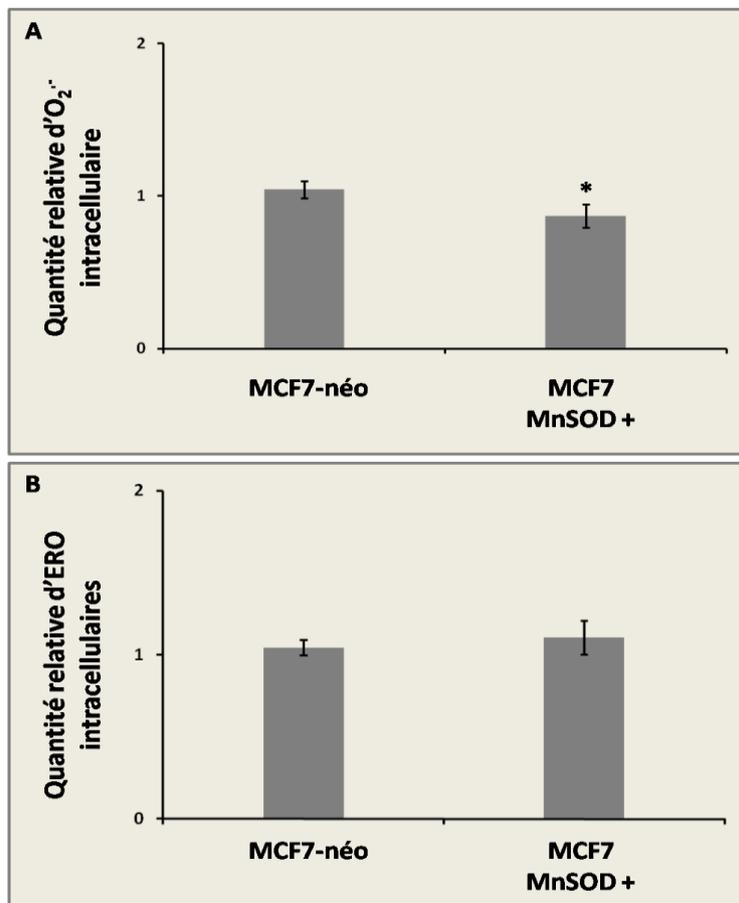


Figure 60 : Quantité relative d'anion superoxyde (A) et d'ERO (B) dans les cellules MCF7-néo et les cellules MCF7-MnSOD+.

Les quantités relatives d'ERO et d'O₂⁻ ont été évaluées par cytométrie en flux avec respectivement le H₂DCFDA (B) et le DHE (A) comme sonde fluorescentes (Cf. *Matériel et Méthodes*, V).

*Différences significatives entre le contrôle et les échantillons traités : P < 0.05, (n = 3).

D'autre part, la littérature fait état d'une fréquente adaptation des activités enzymatiques de la catalase et des peroxydases avec une augmentation de l'activité dans les cellules transfectées avec l'ADNc de la MnSOD pour lutter contre une augmentation de la production d'H₂O₂ (Li and Oberley, 1998; Ough *et al.*, 2004; Ridnour *et al.*, 2004; Venkataraman *et al.*, 2005).

Du fait qu'une surexpression de la MnSOD dans les cellules MCF7 ne semble pas avoir d'impact sur leur statut redox, il est peu probable que nous constatons des variations au niveau de leur répartition dans le cycle cellulaire ou au niveau de la phosphorylation des CDK. Pour en être certain, nous avons évalué ces paramètres dans les lignées transfectées et **les figures 61 et 62**, nous confirment que la surexpression de la MnSOD dans la lignée MCF7 n'engendre aucune modification ni du cycle cellulaire ni de la phosphorylation des CDK.

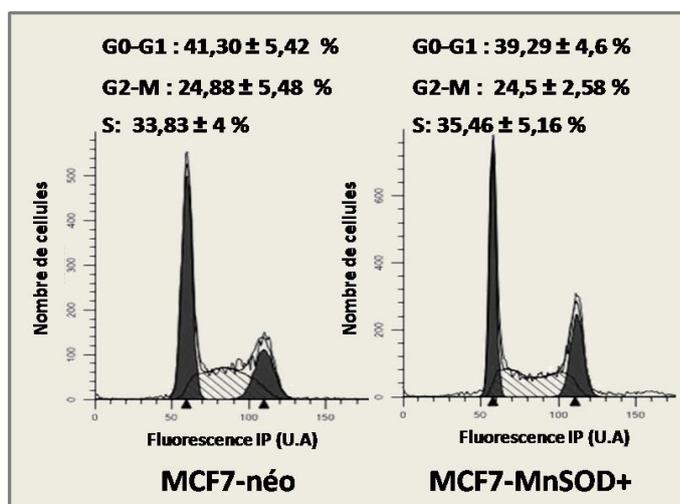
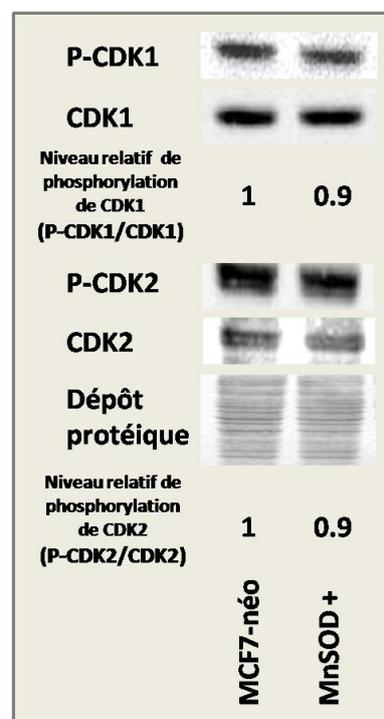


Figure 61 : Effet d'une surexpression de la MnSOD sur la répartition des cellules MCF7 dans les différentes phases du cycle cellulaire.

La distribution dans le cycle cellulaire des cellules MCF7-néo et des cellules MCF7-MnSOD+ a été déterminée par cytométrie en flux par mesure de l'incorporation de l'IP dans l'ADN (Cf. *Matériel et Méthodes*, IX). Le pourcentage de cellules présentes dans chaque phase a été calculé à l'aide du logiciel « modfit ». Les valeurs rapportées ont été calculées à partir de trois expériences indépendantes.

Figure 62 : Effet d'une surexpression de la Mn-SOD sur le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 de CDK1 et CDK2 dans les cellules MCF7.

Le niveau de phosphorylation de la tyrosine 15 des PCDK1 et 2 des cellules MCF7-néo et des cellules MCF7-MnSOD+ a été déterminé par western blotting (Cf. *Matériel et Méthodes*, XI). Les immunorépliques de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été « strippées » et de nouveau immunomarquées pour visualiser respectivement la forme totale de CDK1 et CDK2. Les western-blotting obtenus ont été analysés avec le logiciel « quantity one ». Les niveaux relatifs de Phospho-CDK1 et Phospho-CDK2 ont été calculés par comparaison avec le niveau d'expression de CDK1 et CDK2. Le western-blot montré est représentatif de trois expériences indépendantes.



Les effets d'une surexpression de la MnSOD pourraient toutefois être plus conséquents lors d'un traitement des cellules par un agent générateur d'anion superoxyde tel que la doxorubicine puisque l'apport exogène d' O_2^- pourrait accroître la quantité d' H_2O_2 produite par la MnSOD et peut être induire un dépassement des défenses antioxydantes avec une accumulation intracellulaire concomitante du peroxyde d'hydrogène. Cette hypothèse n'a pour le moment pas été testée et constitue une perspective intéressante à ce travail.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

I. CONCLUSION

Avec 52 600 nouveaux cas en 2010, le cancer du sein est le plus fréquent chez la femme. Il est aussi le cancer le plus mortel chez ces dernières avec 11 300 décès en 2010. Etudier les mécanismes impliqués dans la multiplication des cellules de cancer mammaire reste donc un enjeu majeur de la recherche en cancérologie. Dans notre étude, nous avons choisi d'examiner le rôle du système *trx/trxR* dans la régulation redox des phosphatases CDC25 dans des cellules MCF7 et MDA-MB 231 issues d'adénocarcinomes mammaires humains.

Dans une étude datant de 1993, Natsuyama *et al.* émettaient l'hypothèse que la thiorédoxine pourrait être un régulateur de la transition G2/M puisqu'un apport exogène de thiorédoxine permettait de restaurer l'activité de CDK1 dans des cellules embryonnaires de souris (Natsuyama, Noda *et al.*, 1993). Les auteurs suggéraient alors que la *trx* pourrait protéger l'activité des CDC25 dans ces cellules. En 2003, Sohn et Rudolph ont montré que les CDC25B et C pouvaient être inactivées, *in vitro*, par le peroxyde d'hydrogène et réactivées par le système *trx/trxR* (Sohn and Rudolph, 2003). Au cours de nos expérimentations, nous avons pu montrer qu'il en est de même pour les CDC25A. Notre objectif était donc de savoir si une telle régulation existait également dans des lignées cellulaires d'adénocarcinomes mammaires humains. En effet, sachant que les cellules cancéreuses présentent fréquemment un statut redox intracellulaire plus pro-oxydant que les cellules non cancéreuses (Trachootham, Alexandre *et al.*, 2009), l'existence d'une protection contre l'oxydation des CDC25 par les *trx* permettrait aux cellules tumorales de profiter pleinement du potentiel oncogénique de ces phosphatases afin de se diviser sans relâche. L'implication du système *trx/trxR* dans la régulation redox des CDC25 pourrait donc ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques. En effet, une inhibition des *trxR* et/ou des *trx* pourrait induire une altération de l'activité CDC25 provoquant de ce fait un arrêt du cycle des cellules cancéreuses et donc un arrêt de la prolifération tumorale et offrant ainsi une alternative à l'inhibition directe des CDC25 en termes de stratégie thérapeutique potentielle.

Dans un premier temps, nous avons évalué les effets d'un traitement par le peroxyde d'hydrogène sur les lignées MCF7 et MDA-MB 231. Ces deux lignées ont été choisies car elles présentent des niveaux d'expression de *trx1* très différents, les MCF7 surexprimant les *trx1* par rapport aux MDA-MB 231. Nous avons pu mettre en évidence que le traitement par H₂O₂ induit une augmentation d'ERO et une cytotoxicité comparable dans les deux lignées. Ces altérations sont associées à un arrêt du cycle cellulaire dans les deux types de cellules

avec toutefois une perturbation du cycle plus importante dans les cellules MDA-MB 231. De plus, nous avons pu montrer que l'arrêt du cycle provoqué par H_2O_2 n'est pas corrélé à une hyper-phosphorylation des CDK1 et CDK2, ce qui nous amène à conclure que dans les cellules traitées, l'activité résiduelle des CDC25 est suffisante pour déphosphoryler les CDK. Il n'est toutefois pas exclu qu'une partie des CDC25 soient oxydées par le peroxyde d'hydrogène. C'est pourquoi nous avons donc tenté d'évaluer le statut redox de ces dernières par un western blotting différenciant les niveaux d'oxydation, mais la spécificité des anticorps utilisés vis-à-vis du site actif des CDC25 n'a pas permis d'obtenir des résultats concluants. En effet, il semble que les anticorps utilisés ne puissent pas se fixer au site actif des CDC25 lorsque l'électrophorèse des protéines est réalisée en conditions non réductrices. Or ces conditions non réductrices sont nécessaires pour pouvoir différencier les formes oxydées des formes réduites. Une perspective intéressante serait donc de reproduire l'expérience avec un anticorps dont le ou les épitopes sont situés en dehors du site actif.

Dans une deuxième partie, pour vérifier si le maintien de l'activité CDC25 lors d'un traitement par H_2O_2 est dû à une intervention du système *trx/trxR*, nous avons tenté d'inactiver totalement ce système avec deux inhibiteurs chimiques, l'Auranofine et l'Acroléine. Nous avons évalué les effets de cette inactivation sur le cycle cellulaire et l'activité des CDC25. Jusqu'à présent, les effets des inhibiteurs choisis n'avaient pas été testés dans des lignées issues de cancer du sein. Nous avons donc défini les conditions de traitement qui permettent d'inhiber le système *trx/trxR* et de générer un stress oxydant dans les deux lignées choisies. Nous avons montré que 3 μM d'Auranofine provoquent une inhibition totale de *trxR* dans les deux types cellulaires. La cytotoxicité de ce composé est quasiment identique pour les MCF7 et les MDA-MB 231 mais la production d'ERO associée au traitement est plus importante dans les cellules MDA-MB 231, probablement à cause de leur plus faible taux d'expression de la *trx1*. Malgré l'inhibition de *trxR* et l'augmentation d'ERO, l'Auranofine n'induit pas d'oxydation de la thiorédoxine. Le système *trx/trxR* n'est donc pas totalement inactivé lors d'un traitement des cellules par l'Auranofine et nous supposons que cela pourrait être dû à l'activité du système du glutathion, non affecté par le traitement, qui pourrait donc contrecarrer le stress oxydant subit par les cellules et protéger les thiorédoxines, peut être par le biais d'une réaction de glutathionylation. L'Auranofine n'induit pas de modification du cycle cellulaire mais l'apparition d'un pic sub-G1 a pu être mis en évidence dans le cas des cellules MDA-MB 231. Ce pic suggère l'entrée des cellules en apoptose suite à la fragmentation de leur ADN. Cette dernière pourrait être la conséquence d'une réparation déficiente des nombreuses cassures double brins de l'ADN provoquées par l'Auranofine. Son

absence d'effet sur la distribution dans le cycle cellulaire des cellules traitées est corrélée à une conservation de l'état de phosphorylation des CDK. Une inhibition des *trxR* n'entrave donc pas le maintien de l'activité cellulaire des CDC25.

Ensuite, l'inhibition des *trxR* étant sans effet apparent sur les CDC25, nous avons choisi de cibler plus directement les thiorédoxines. Nous avons testé les effets de l'Acroléine, composé aldéhydique permettant d'inhiber à la fois les *trxR* et les *trx*. 15 μM d'Acroléine sont suffisants pour induire une inhibition totale des *trxR* dans les deux lignées cellulaires. Cette inhibition est accompagnée d'effets cytotoxiques dans la lignée MDA-MB 231 mais n'affecte pas la viabilité des cellules MCF7. Dans la lignée MDA-MB 231, le traitement par 15 μM d'Acroléine génère une augmentation significative du taux d'ERO et une oxydation totale des *trx1*. Ces effets ne sont pas visibles dans la lignée MCF7 bien que cette dernière subisse, comme les cellules MDA-MB 231, une importante déplétion en GSH. La surexpression des *trx1* dans les cellules MCF7 par rapport aux cellules MDA MB 231 pourrait expliquer les différences de sensibilité qui existent entre les deux lignées. L'inactivation totale du système *trx/trxR* dans la lignée MDA-MB 231 s'accompagne d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et de l'apparition d'un pic sub-G1. Cependant, nous avons montré que cet arrêt n'est pas associé à une hyper-phosphorylation des CDK1 et CDK2 mais plutôt à une altération de l'ADN nucléaire des cellules traitées. Une inhibition concomitante des thiorédoxine réductases et des thiorédoxines a donc des effets sur le cycle cellulaire sans affecter la déphosphorylation des CDK par les CDC25.

Il semble donc que dans les cellules issues de cancer du sein soumises à un stress oxydant, le système *trx/trxR* ne soit pas strictement essentiel pour le maintien d'un niveau stable de phosphorylation des CDK par les CDC25. Cette conclusion est corroborée par l'étude de Vogt *et al*, qui a montré que le PX-12 (Imidazolyldisulfide IV-2), un inhibiteur de thiorédoxine, aujourd'hui en phase d'étude clinique, induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M sans pour autant altérer l'activité CDK1 ou CDC25 dans la lignée MCF7 (Vogt *et al.*, 2000).

Dans la dernière partie de ce travail nous nous sommes intéressés aux effets d'une surexpression de la MnSOD sur le cycle cellulaire et l'activité des CDC25. Les SOD sont responsables d'une part importante de la production du peroxyde d'hydrogène dans les cellules. Des variations de leurs expressions et de leurs activités peuvent faire varier le taux intracellulaire d' H_2O_2 et pourrait donc avoir un impact sur l'état d'oxydation des phosphatases CDC25. Nous avons montré que les deux lignées cellulaires que nous étudions

présentent un niveau d'expression variable de la MnSOD associé à une différence de phosphorylation des CDK. En effet, les cellules MDA-MB 231 qui expriment fortement la MnSOD par rapport aux cellules MCF7 présentent un rapport PCDK/CDK plus important. Ainsi, afin de vérifier si il existe une corrélation entre le niveau d'expression de la MnSOD et le niveau de phosphorylation des CDK, nous avons établi une lignée MCF7 surexprimant la MnSOD en collaboration avec l'équipe du professeur Philippe Becuwe du laboratoire SIGRETO de l'Université Henry Poincaré-Nancy I. Selon notre hypothèse, une surexpression de la MnSOD pourrait engendrer une augmentation du taux d'H₂O₂ intracellulaire qui pourrait affecter l'activité des CDC25 provoquant des changements de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire dus à une hyper-phosphorylation des CDK. Nos résultats ont révélé qu'il n'en était rien puisqu'une surexpression de la MnSOD dans les cellules MCF7 induit une diminution de la quantité d'anions superoxydes mais pas une augmentation concomitante de la quantité d'H₂O₂. Il serait toutefois intéressant de vérifier si une telle augmentation d'ERO est observable lors d'un traitement des cellules par un composé chimiothérapeutique dont le métabolisme produit des anions superoxydes tel que la doxorubicine.

Dans ce travail nous avons donc pu mettre en évidence que le rôle des CDC25 dans la régulation du cycle cellulaire n'est pas dépendant de l'état de fonctionnalité du système trx/trxR ou du niveau d'expression des MnSOD mais qu'il existe un système protecteur puissant qui permet de maintenir au moins en partie l'activité de déphosphorylation des CDC25 en milieu pro-oxydant dans les cellules de cancer du sein MCF7 et MDA-MB 231.

II. PERSPECTIVES

II.1. Altération moléculaire stable de l'expression de *trx1* dans la lignée MCF7

En parallèle de l'inhibition chimique des *trxR* et des *trx*, l'analyse des effets d'une répression de l'expression des thiorédoxines dans la lignée MCF7 a été envisagée. En effet, du fait de la résistance des cellules MCF7 à l'Acroléine, une approche moléculaire est très intéressante dans cette lignée. L'établissement d'une lignée stable de MCF7 sous-exprimant la *trx1* a donc été initié avec l'utilisation de vecteurs porteurs de séquences shRNA (Cf. *Matériel et Méthode III.6.1.2.*). Un vecteur contrôle contenant le gène codant pour la GFP a été utilisé pour tester l'efficacité de la transfection. Jusqu'à présent, le meilleur pourcentage de transfection obtenu est de 8 % avec l'agent de transfection JET-PEI (*Polyplus transfection*). Ce pourcentage est très faible et n'a pas permis l'isolement d'une colonie de cellules après

une sélection en présence de puromycine. Les vecteurs d'expression qui portent les séquences shRNA de *trx1* sont des vecteurs lentiviraux ayant donc une taille élevée qui pourrait être la cause de nos difficultés. Notre laboratoire n'est pas habilité pour la réalisation de transfection à l'aide de lentivirus, toutefois le fournisseur des vecteurs assure que la transfection peut être réalisée à l'aide d'agents classiques. Ainsi, face aux faibles taux de transfection obtenu avec le JET-PEI, nous testons actuellement d'autres agents de transfection.

II.2. Mise en évidence d'une interaction CDC25-*trx*

Si les phosphatases CDC25 sont effectivement réduites par les thiorédoxines lors d'un stress oxydant alors une interaction entre ces deux protéines devrait pouvoir être mise en évidence lorsque l'on traite les cellules avec du peroxyde d'hydrogène. Dans ce but, des essais préliminaires ont déjà été menés lors de cette thèse mais n'ont pas encore abouti. En effet, pour vérifier l'existence d'une interaction CDC25-*trx1*, nous avons transfecté la lignée cellulaire MCF7 avec un plasmide « pEBG » (**figure 67**) permettant l'expression d'une protéine de fusion GST couplée à un dominant négatif de la thiorédoxine 1 (Cf. *Matériel et Méthode*, III.6.2). Ce dominant négatif contient une mutation « C35S », de la cystéine 35 du site actif de la *trx1* en sérine. Cette mutation empêche le relargage des substrats de la *trx1* après leur réduction. Les plasmides (vecteur vide, vecteur contenant le cDNA de la protéine sauvage et vecteur codant pour la thiorédoxine 1 mutée « C35S ») ont été gracieusement donnés par le professeur K-S Kwon (Center for Systems Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Corée) (Hwang, Ryu et al. 2004). Après la transfection, nous avons induit un stress oxydant dans les cellules transfectées puis nous avons purifié, par une chromatographie d'affinité sur un gel d'agarose-GSH, les protéines de fusion « GST-*trx1* mutée C35S » couplées à leur substrat. La présence de CDC25 parmi ces substrats peut alors être testée par un western blotting anti-CDC25 réalisé avec les échantillons contenant la protéine purifiée. Jusqu'à présent, la transfection des cellules a été réalisée avec succès mais la purification n'a pas permis de collecter suffisamment de protéines de fusion pour détecter la GST ou la *trx1* par western blotting. Des expériences complémentaires sont donc actuellement en cours de réalisation pour contrecarrer ce problème.

II.3. Intervention des peroxirédoxines et/ou de la sulfirédoxine dans la régulation redox de l'activité CDC25

Comme nous l'avons évoqué précédemment, Natsuyama *et al.* ont montré qu'une injection de thiorédoxine dans des cellules embryonnaires de souris permettait de réactiver les CDK1. Les auteurs émettaient l'hypothèse que les thiorédoxines pourraient maintenir l'activité des CDC25 qui pourraient alors déphosphoryler les CDK (Natsuyama, Noda *et al.*, 1993). Nous avons montré que cette hypothèse ne se vérifie pas dans les lignées de cancer du sein, MCF7 et MDA-MB 231. Toutefois, on peut imaginer que dans notre cas comme dans celui de l'étude précédemment citée, la réactivation des CDK1 pourrait faire intervenir les thiorédoxines d'une façon plus indirecte. Par exemple, les trx pourraient activer par réduction un autre système antioxydant, qui pourrait lui-même directement interagir avec les CDC25. Deux types de protéines antioxydantes sont connus pour être dépendante du système trx/trxR : les peroxyrédoxines et les sulfirédoxines. Or, d'après la littérature, ces protéines pourraient jouer un rôle important dans la régulation redox des phosphatases.

Par exemple, Cao J *et al.*, ont prouvé qu'une liaison entre prx1 et PTEN était nécessaire pour le maintien de l'activité de cette dernière en conditions de stress oxydant dans des fibroblastes d'embryons de souris. (Cao J, 2009). Neumann *et al.* ont émis l'hypothèse que, dans les cellules cancéreuses, l'activité des CDC25 pourrait être préservées par les peroxirédoxines en tant que protéines chaperonnes (Neumann et al, 2009).

Un autre mode de protection des CDC25 contre l'oxydation en condition de stress oxydant pourrait se faire *via* la glutathionylation de la cystéine catalytique. Ce mécanisme existe pour la phosphatase PTP1B. En effet, la glutathionylation de cette phosphatase au niveau de la cystéine catalytique protège celle-ci contre une oxydation irréversible durant un stress oxydant mais elle induit en contrepartie une inhibition de l'enzyme. La déglutathionylation de la cystéine catalytique par la sulfirédoxine restaure l'activité catalytique (Findlay VJ, 2006). Les PTP1B et les CDC25 sont membres de la même famille de phosphatases, nous pouvons ainsi supposer que les CDC25 pourraient également être sujettes à des réactions protectrices de glutathionylation/déglutathionylation. Sohn et Rudolph ont montré qu'après l'inhibition des CDC25 par H₂O₂, l'ajout de GSH ne permet pas de restaurer leur activité. Cette expérience a montré que le GSH n'est pas capable de réduire les cystéines oxydés mais elle n'exclue pas la possibilité que le GSH pourrait glutathionyler les CDC25 pour les protéger d'une oxydation irréversible par H₂O₂. Il serait donc intéressant de mesurer l'activité CDC25

après avoir incubé ces dernières avec du peroxyde d'hydrogène et/ou du GSH dans un premier temps et après un ajout de sulfirédoxine ensuite.

Dans les deux hypothèses (protection de l'activité CDC25 par les peroxyrédoxines sous forme de chaperonnes ou protection par glutathionylation/deglutathionylation avec une intervention de la sulfirédoxine) la cystéine catalytique des CDC25 ne serait pas physiquement accessible pour d'autres systèmes réducteurs. Ceci pourrait expliquer pourquoi le système trx/trxR serait capable de réguler l'activité CDC25 *in vitro*, lorsqu'il est le seul système réducteur en présence, mais pas dans les cellules cancéreuses.

***MATERIEL ET
METHODES***

I. EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION GST-CDC25A, B ET C

La souche BL21 (DE3)pLysS de *E. coli* a été utilisée pour l'amplification du plasmide contenant nos séquences d'intérêts. Cette souche dérivée de BL21 a intégré le phage λ DE3. Leur génotype est le suivant : B F⁻, dcm, ompT, hsdS(rB⁻, mB⁻), gal λ (DE3), [pLysS Camr]. Ces cellules sont facilement transformables, même par de grands plasmides, avec une stabilité satisfaisante de l'ADN étranger, tout en permettant la sélection des colonies.

Les ADNc correspondant à la totalité de la séquence de CDC25A et CDC25C ainsi que l'ADNc correspondant à la séquence du site catalytique de CDC25B ont été intégrés dans le plasmide « pGEX-2T » (Amersham Pharmacia Biotech, **Figure 63**) qui est ensuite sélectionné grâce à la résistance à l'ampicilline qu'il confère aux bactéries transformées. Ces plasmides ont été gracieusement fournis par le professeur Meijer Laurent (CNRS, Station Biologique de Roscoff, France) et le professeur Hoffmann Ingrid (German Cancer Research Center, Heidelberg, Allemagne). La protéine se trouve ainsi fusionnée à une glutathion-S-transférase ce qui permet de faciliter sa purification.

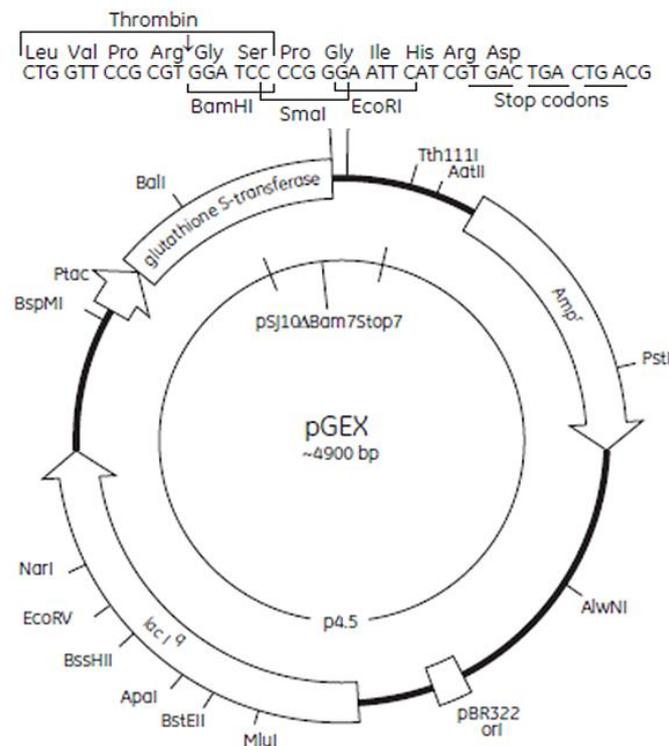


Figure 63 : Carte de restriction du plasmide pGEX-2T et caractéristiques principales du vecteur de protéine de fusion glutathion-S-transférase.

I.1. Préparation de bactéries compétentes

Une culture de 50 mL en phase exponentielle de croissance ($A_{600} \approx 0,4$) est plongée dans de la glace pendant 10 min. Les cellules sont sédimentées par centrifugation à froid à $1500 \times g$ pendant 15 min, puis remises en suspension dans 24 mL d'une solution froide et stérile de CaCl_2 à la concentration de 50 mM. Après 10 min d'incubation dans la glace, les bactéries sont à nouveau centrifugées avant d'être remise en suspension dans 2,4 mL de la même solution froide de CaCl_2 . Les cellules compétentes sont stockées dans la glace ou, à défaut, à 4°C pendant 1 à 3 jours, jusqu'à leur transformation.

I.2. Transformation de bactéries compétentes

100 μL de suspension de cellules compétentes sont placés dans un microtube stérile et exempt de DNase. Environ 20 ng de plasmide circulaire sont ajoutés à la suspension cellulaire. Le mélange est homogénéisé doucement, puis placé dans la glace fondante. Après 30 min d'incubation, le microtube est trempé pendant 90 s dans un bain marie à 42°C , puis aussitôt replongé dans la glace fondante pendant 2 minutes. 300 μL de milieu SOC [20 g/L Bacto-tryptone, 5 g/L extrait Bacto-yeast, 0,5 g/L NaCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM glucose] sans antibiotique sont ajoutés au mélange et l'ensemble est incubé pendant 30 min à 37°C sous agitation. Les cellules sont alors étalées sur un milieu gélosé sélectif (LB agar + ampicilline 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Les boîtes sont placées à l'envers dans un incubateur à 37°C pendant 24 h. Les clones sont sélectionnés en testant l'activité glutathion-S-transférase de la protéine de fusion GST-CDC25 selon le protocole décrit par Habig *et al* (Habig *et al.*, 1974). Les clones présentant les plus fortes activités glutathion-S-transférase sont amplifiés dans 5 mL de milieu LB amp (LB + ampicilline 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 24 h puis 10 % de glycérol sont ajoutés à la suspension cellulaire avant qu'elle ne soit aliquotée par fraction de 100 μL . Les aliquotes sont conservées pendant plusieurs mois au congélateur.

I.3. Cultures bactériennes

Les cellules BL21 transformées et présentant une forte activité glutathion-S-transférase sont cultivées en milieu LB (*Luria-Bertani*) [10 g/L Bacto-tryptone, 5 g/L extrait

Bacto-yeast, 10 g/L NaCl (pH7.0 avec NaOH)], contenant 50 µg/mL d'ampicilline pour maintenir le plasmide.

I.3.1. Préculture

5 mL de milieu LB, contenant 50 µg/mL d'ampicilline, pour maintenir le plasmide, sont inoculés avec quelques µL de suspension de cellules transformées avec le plasmide pGEX-CDC25. La préculture est incubée pendant 8 h à 37°C sous agitation. 100 mL de milieu LB, contenant 50 µg/mL d'ampicilline, sont ensuite inoculés avec 1 mL de la suspension bactérienne précédente. La culture est incubée pendant une nuit à 37°C sous agitation.

I.3.2. Culture d'expression

Un litre de milieu LB, contenant 50 µg/mL d'ampicilline, est inoculé avec 10 mL de la précédente culture. Cette culture est incubée sous agitation à 37°C jusqu'à obtenir une absorbance à 600 nm comprise entre 0,4 et 0,6. A ce moment, l'expression est induite par addition de 0,5 mM d'IPTG (*Isopropyl-thio-β-galactoside*) et placée 5 h à 30°C sous agitation.

Les bactéries sont alors centrifugées à 1500 * g pendant 15 min à 4°C. Les culots bactériens sont conservés à -80°C jusqu'à l'extraction.

I.3.3. Extraction de la protéine de fusion GST-CDC25

Le culot bactérien est resuspendu dans 30 mL de tampon de lyse [50 mM Tris, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Triton, 0,1 mM PMSF (*phenyl methane sulphonyl fluoride*), 3% CIP (*cocktail inhibiteur de protéase*)] puis soniqué (5 * 10s) à 4°C. L'homogénat est ensuite centrifugé à 25000*g pendant 45 min à 4°C et le surnageant est stocké à -80°C jusqu'à la purification.

I.3.4. Purification de la GST-CDC25

La protéine de fusion est purifiée par chromatographie d'affinité sur un gel d'agarose-GSH (*Sigma*). L'extrait bactérien est incubé sur une colonne de gel (équilibrée avec le tampon de lyse) pendant 3 h à 4°C. Après lavage de la colonne avec 5 volumes de tampon de lyse puis 5 volumes de tampon Tris A [50 mM Tris pH8, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT], la protéine de fusion est éluée par addition de glutathion à la concentration de 20 mM dans du

tampon Tris A. L'éluat est recueilli par fraction de 1 mL et l'efficacité de la purification est vérifiée sur chaque fraction par la mesure de l'activité CDC25. Les fractions sont conservées à -80°C.

II. MESURE DE L'ACTIVITE PHOSPHATASE CDC25

II.1. Mesure en colorimétrie

Cette mesure est basée sur la déphosphorylation par les phosphatases CDC25 du p-NPP (*p-nitrophényl phosphate*), qui est incolore en un produit coloré, le PNP (*p-nitrophénol*). La réaction est réalisée en microplaque (Baratte *et al.*, 1992). 10 µL de solution d'enzyme purifiée sont mis en présence de 10 mM de DTT dans un volume final de 150 µL de tampon Tris A et la plaque est préincubée 30 min à 37°C sous agitation. La réaction est alors initiée par addition de 50 µL de p-NPP à la concentration de 200 mM dans du tampon Tris A. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance est mesurée à 405 nm sur un lecteur de plaques (Dynatech).

II.2. Mesure en spectrofluorimétrie à cuve

Cette mesure est basée sur la déphosphorylation par les phosphatases CDC25 de l'OMFP (*3-O-méthylfluorescéine phosphate*) en OMF (*3-O-méthylfluorescéine*) qui absorbe à 485 nm et émet à 530 nm. 10 µL de protéine de fusion GST-CDC25, correspondant à 3 µg/mL de protéines pour l'isoforme A, 5 µg/mL pour l'isoforme B et 4 µg/mL pour l'isoforme C sont mis en présence de tampon Tris A. L'essai est réalisé en cuve avec un volume final de 1 mL. La réaction est initiée par addition de 500 µM d'OMFP. La formation d'OMF est mesurée pendant 15 min à 37°C (conditions de vitesse initiale) sur un spectrofluorimètre (Kontron instrument).

III. CULTURE CELLULAIRE

III.1. Lignées cellulaires

Les systèmes d'étude choisis sont deux lignées d'adénocarcinome mammaire humain issues d'une effusion pleurale : la lignée MCF7 (Soule *et al.*, 1973) et la lignée MDA-MB 231 (Cailleau *et al.*, 1974) qui diffèrent principalement par la présence de récepteurs aux œstrogènes chez MCF7 contrairement à MDA-MB 231.

III.2. Conditions de culture

Les cellules sont cultivées en monocouche en flacons de Roux de 75 cm² de surface utile (*BD Falcon*) pour leur amplification ou en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre (63,6 cm² de surface) et plaque de 6 puits (9,6 cm² de surface) (*BD Falcon*) pour les traitements. Les cellules sont maintenues en culture dans du milieu « RPMI » complet à raison de 0,125 mL/cm², dans un incubateur à atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂ et 95 % d'air saturé en eau, à une température de 37°C. Le milieu dit « complet » est constitué de RPMI 1640 (*Eurobio*), additionné de 1,25 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 151 µM de L-asparagine, 95 µM de L-Sérine, 0,5 X d'acides aminés MEM et d'acides aminés non essentiels MEM, 0,4 X de vitamines, 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, *Eurobio*) et 1 % (v/v) d'un mélange 100 X d'antibiotiques-antimycotique [104 UI/mL pénicilline G, 10 mg/mL streptomycine, 2,5 mg/mL amphotéricine B].

III.3. Entretien des cellules

Lorsque les cellules sont au stade de sub-confluence, le milieu de culture est éliminé par aspiration et les cellules sont dissociées par addition d'une solution de trypsine-EDTA 1X. Une fois le tapis cellulaire complètement détaché, la trypsine est inhibée par addition d'un même volume de milieu complet. La suspension cellulaire est alors centrifugée 5 min à 500*g et le culot de cellules est remis en suspension dans du milieu frais. Une aliquote de cette suspension cellulaire est prélevée et diluée dans du milieu complet pour la numération cellulaire qui est réalisée au moyen d'une cellule de Malassez après coloration en présence de 0,4% (v/v) de bleu Trypan. De nouvelles cultures sont alorsensemencées à la densité souhaitée. Une culture est considérée comme trop âgée après 10 passages. Elle est alors détruite et une nouvelle culture est initiée après décongélation d'un nouveau stock de cellules.

III.4. Congélation et décongélation des cellules

Les lignées sont conservées dans l'azote liquide à la concentration de 3.10⁶ cellules/mL. La suspension cellulaire est centrifugée 5 min à 500*g et le culot est remis en suspension dans un volume approprié de milieu de congélation froid composé de milieu de culture complet et de 10 % de DMSO (*diméthylsulfoxyde*). Cette suspension cellulaire est conditionnée par fractions de 1 mL dans des cryotubes qui subissent alors des paliers de congélation (20 min à -20°C puis 2h à -80°C) avant d'être plongés dans l'azote liquide pour conservation.

Pour la remise en culture, la suspension cellulaire est décongelée rapidement dans un bain-marie à 37°C avant d'être diluée au 1/10^e dans du milieu complet puis centrifugée 5 min à 500*g pour éliminer le DMSO. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans un volume de milieu approprié pour la remise en culture.

III.5. Traitement et récupération des cellules en culture

Les traitements sont réalisés sur des cultures cellulaires ensemencées à 1.10⁶ cellules en boîtes de Pétri ou à 250.10³ cellules en plaque de 6 puits. 24 heures après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais contenant une concentration connue de la molécule à tester. Les cultures sont ainsi incubées à 37°C pendant un temps de traitement déterminé en fonction de l'expérience réalisée.

A l'issue du traitement, le mode de récupération des cellules dépend de l'analyse réalisée. Lorsque celle-ci est une analyse en cytométrie de flux, un western blotting ou une mesure d'activité enzymatique, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées par aspiration et dissociation à l'aide de trypsine-EDTA 1 X suivi de deux rinçages avec du milieu complet. La suspension est alors soumise à une centrifugation à froid de 5 min à 500*g puis le surnageant est éliminé et le culot est rincé deux fois dans du tampon PBS 1X [0,2 g/L KH₂PO₄, 1,15g/L Na₂HPO₄, 0,2 g/L KCl, 8g/L NaCl] froid. Les cellules sont ensuite traitées différemment en fonction du paramètre étudié (viabilité cellulaire, quantité d'ERO, cycle cellulaire, expression de protéines) et les protocoles correspondants sont indiqués par la suite. Lorsque l'analyse est un dosage intracellulaire du glutathion, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1 X froid puis grattées dans 2*500 µL de PCA froid (*acide perchlorique*) à 10 %. La suspension est ensuite centrifugée pendant 15 min à 12000*g et à 4°C puis les surnageants sont conservés à -20°C jusqu'à analyse alors que les culots sont resuspendus dans 1 mL de NaOH 1M pour le dosage des protéines.

III.6. Développement de modèles cellulaires transgéniques

III.6.1. Transfections stables

III.6.1.1. Etablissement d'une lignée MCF7 surexprimant la MnSOD

La lignée cellulaire MCF7, exprimant faiblement la MnSOD en condition physiologique par rapport à la lignée MDA-MB 231, a été choisie pour établir un modèle cellulaire dans lequel cette expression sera augmentée.

Cette surexpression stable de la MnSOD est permise par l'insertion du cDNA de la protéine dans un vecteur pcDNA3.1+ qui confère une résistance à l'hygromycine (**figure 64**). La construction de ce plasmide, son amplification et sa purification ont été réalisées au sein du laboratoire SIGRETO (UHP, Nancy I) par l'équipe du Professeur Becuwe Phillipe.

III.6.1.1.1. Protocole de transfection stable

La transfection est réalisée selon le protocole fournit avec l'agent de transfection choisi, le « jetPEI » (*Polyplustransfection*). Le jetPEI (poly-éthylènimine) et l'ADN plasmidique forment des complexes chargés positivement capables d'interagir avec les protéoglycanes anioniques de la surface cellulaire. Ainsi, ces complexes se lient à la membrane plasmique puis sont internalisés par endocytose. A l'intérieur du compartiment endosomal, l'ADN est protégé de la dégradation par le jetPEI qui agit comme une « éponge à protons », qui tamponne le pH. Cette modification du pH va conduire à la perméabilisation puis à la rupture de l'endosome permettant le relargage de l'ADN dans le cytoplasme. Cette ADN sera ensuite transporté dans le noyau pour y être transcrit.

Lors de la transfection, les cellules sontensemencées en plaque de 6 puits à raison de 250×10^3 cellules/puits dans 2 mL de milieu complet contenant du sérum. 24 h après l'ensemencement, le milieu est changé et les complexes de transfection (plasmide + jetPEI) sont préparés. Dans un premier temps une solution contenant le plasmide et une solution contenant l'agent de transfection sont préparées indépendamment l'une de l'autre pour chaque puits. Ainsi, 3 µg de plasmide sont dilués dans 100 µL final de NaCl (150 mM) d'un côté et 6 µL de jetPEI sont ajoutés à 94 µL de NaCl (150 mM) de l'autre côté. Chaque solution est alors doucement homogénéisée au vortex et centrifugée. Dans un deuxième temps, la solution contenant le jetPEI est additionnée goutte à goutte à la solution contenant le plasmide. La solution obtenue est brièvement vortexée, centrifugée et incubée à température ambiante entre 15 et 30 minutes. Après cette incubation, la totalité des 200 µL de solution est dispersée goutte à goutte sur le milieu contenu dans un puits. Le milieu est ensuite homogénéisé par glissement de la plaque sur une surface plane. La plaque est ensuite incubée dans des conditions classiques de culture pendant 24 h.

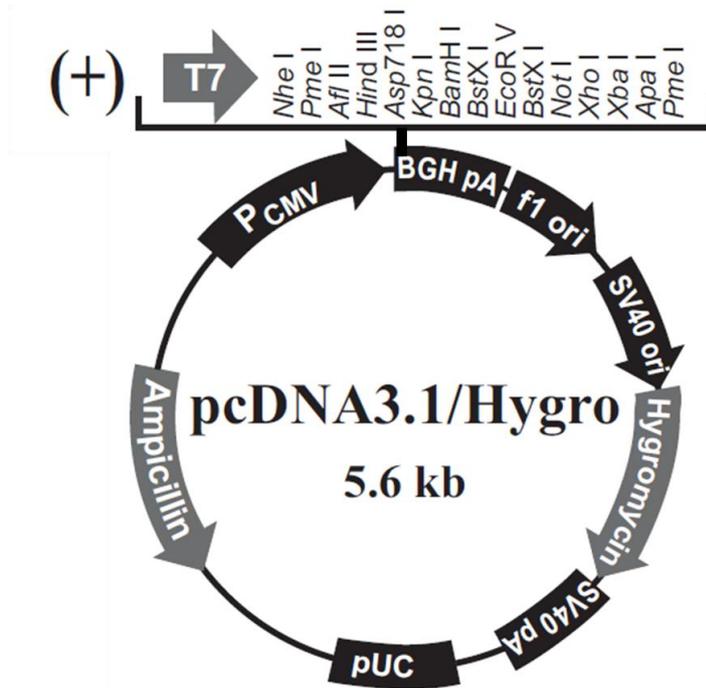


Figure 64 : Carte du vecteur plasmidique pcDNA3.1+, utilisé pour l'insertion de l'ADNc de la MnSOD.

Le lendemain, la sélection antibiotique est initiée à raison de 200 µg/mL d'hygromycine. Le milieu supplémenté en antibiotique est alors changé quotidiennement afin d'éliminer les cellules mortes non transfectées. La sélection antibiotique est maintenue jusqu'à ce que des colonies isolées soit suffisamment grosses pour être repiquées en plaque de 12 puits puis amplifiées avant que le profil d'expression de la MnSOD ne soit déterminé.

III.6.1.1.2. Evaluation de l'efficacité de la transfection

II.6.1.1.2.1. Mise en évidence de la surexpression par immunoblotting

Un western blotting contre la protéine MnSOD (Cf. Matériel et Méthodes, XI) est réalisé afin d'évaluer la qualité de la surexpression de la MnSOD dans les différents clones choisis par rapport à son expression dans les cellules transfectées avec le vecteur vide. Cette immunoréplique permet de choisir et d'amplifier uniquement la lignée cellulaire pour laquelle la surexpression de la MnSOD est la plus forte.

III.6.1.1.2.2. Evaluation de l'activité MnSOD

Afin d'amplifier le clone le plus approprié, une évaluation seule de la surexpression de la MnSOD n'est pas suffisante. En effet, l'enzyme surexprimée doit également être active.

Cette activité est donc évaluée dans les différents clones choisis et dans les cellules témoins transfectées avec le vecteur vide.

Ainsi, les cellules MCF7 transfectées sont cultivées jusqu'à environ 90% de confluence puis sont lysées dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases, par trois cycles de congélation et décongélation. La suspension protéique est récupérée après une centrifugation à 17000*g et à 4°C. 50 µg de protéines sont reprises dans un tampon Tris 0,050 M/Glycine 0,384 M contenant 20% de saccharose et du bleu de bromophénol, et sont déposées sur un gel de polyacrylamide à 8% préparé dans un tampon Tris/HCl 0,375 M (pH 8,8) ne contenant pas de SDS. L'électrophorèse est ensuite réalisée dans un tampon de migration non dénaturant, de pH 8,3 à 30 mA durant 1 heure. Selon la méthode décrite par Beauchamp et Fridovich (1971), le gel est ensuite plongé dans de l'eau distillée contenant 0,25 mg/ml de Nitrobleu de Tetrazolium pendant 20 min, puis dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,8 contenant 28 µM de Riboflavine et 417 µl/ml de TEMED pendant 15 min, à l'obscurité et à température ambiante (Beauchamp and Fridovich, 1971). Les anions superoxyde produits par le système xanthine-xanthine oxydase réduisent le nitrobleu de tétrazolium en bleu de formazan. La présence de bandes achromatiques révèle donc l'élimination d'O₂⁻ par les SOD dont l'activité est proportionnelle à l'intensité des bandes, quantifiée par densitométrie sur le système Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (BioRad).

III.6.1.2. Etablissement d'une lignée MCF7 réprimant la thiorédoxine 1

La lignée cellulaire MCF7, exprimant naturellement fortement la thiorédoxine 1 par rapport à la lignée MDA-MB 231 a été choisie pour établir un modèle cellulaire dans lequel cette expression sera altérée. Cette lignée cellulaire modifiée a été transfectée avec 4 différentes séquences d'un vecteur shRNA anti thiorédoxine 1 d'origine commerciale (*Sigma*). Les 4 vecteurs shRNA sont transfectés indépendamment l'un de l'autre.

III.6.1.2.1. Amplification et purification des vecteurs d'expression

III.6.1.2.1.1. Amplification des plasmides

Les vecteurs plasmidiques contenant les séquences shRNA dirigés contre la thiorédoxine ou contenant une séquence aléatoire (contrôle) ont été amplifiés selon les

recommandations du fournisseur (*sigma*). Lors de leur réception, les 4 vecteurs contenant une séquence shRNA anti *trx1*, ont déjà été transformés dans des bactéries *E.coli* compétentes de la souche GC5. Seul le vecteur shRNA contrôle doit faire l'objet d'une transformation (*cf I.2.*) avant amplification et purification. Les bactéries compétentes GC5 utilisées présentent le génotype suivant : F- F80*lacZ*DM15 D(*lacZYA-argF*)U169 *endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 l-T1R*.

Les cellules sont cultivées en milieu LB contenant 100 µg/mL de carbenicilline pour maintenir le plasmide.

Les séquences des shRNA dirigés contre la thiorédoxine (**figure 65**) sont insérées dans un plasmide pLKO.1-puro (**figure 66**) qui confère une résistance à la puromycine une fois transfecté dans des cellules eucaryotes de mammifères.

Séquence du shRNA anti <i>trx1</i>	
séquence 79	CCGGGCTTCAGAGTGTGAAGTCAAACCTCGAGTTTGACTTCACACTCTGAAGCTTTTTG
séquence 80	CCGGGATGTGGATGACTGTCAAGGATCTCGAGATCCTGACAGTCATCCACATCTTTTTG
séquence 81	CCGGGTGAAGTCAAATGCACGCCAACTCGAGTTGGCGTGCATTTGACTTCACTTTTTG
séquence 82	CCGGTCCAACGTGATATTCCTTGAACCTCGAGTTCAAGGAATATCACGTTGGATTTTTG

Figure 65 : Séquence des shRNA dirigés contre la thiorédoxine 1, insérés dans le vecteur pLKO.1-puro.

Afin d'amplifier les plasmides contenant un shRNA anti *trx1*, une petite fraction de bactéries congelées est placée dans 500 µL de milieu LB sans carbenicilline. La culture est ensuite incubée entre 15 et 30 minutes sous agitation à 37°C. 50 µL de cette culture sont ensuite étalés sur un milieu gélosé contenant 100 µg/mL de carbenicilline. La boîte est alors incubée à 37°C durant une nuit. Le lendemain matin, une colonie isolée est prélevée puis placée dans 5 mL de milieu LB/carbenicilline. La culture est ensuite incubée pour le reste de la journée à 37°C et sous agitation. Le soir une culture de 1L de LB/carbenicilline estensemencée à partir de 1 mL de la précédente culture puis incubée pendant la nuit à 37°C, sous agitation. Le lendemain, lorsque l'absorbance à 600 nm est égale à 2, la culture est centrifugée à 1500*g, pendant 20 minutes à 4°C et le culot cellulaire est congelé à -80°C jusqu'à l'étape de purification. Il est nécessaire de préparer un grand volume de culture avec une densité

bactérienne importante car le plasmide a la caractéristique d'être « low copy » c'est-à-dire qu'il n'est copié qu'un nombre limité de fois dans la cellule.

Pour l'amplification du plasmide contrôle, le protocole d'amplification est identique au détail près qu'il commence directement par le prélèvement d'une colonie isolée à partir de la boîte de culture préparée après la transformation des bactéries.

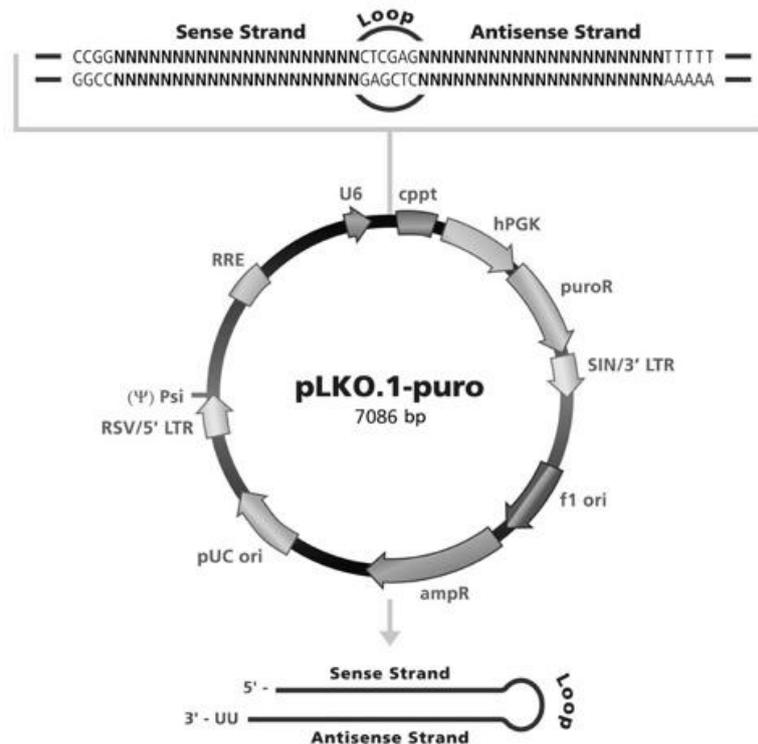


Figure 66 : Carte du plasmide « pLKO.1-puro » porteur d'une séquence shRNA utilisée pour l'inhibition de l'expression de la thiorédoxine 1.

III.6.1.2.1.2. Purification des plasmides

Les plasmides sont purifiés à l'aide d'un kit commercial (NucleoBond Xtra Maxi Plus, *Macherey Nagel*). Le plasmide ayant la particularité de n'être copié que peu de fois dans la cellule, il est nécessaire de réaliser une maxi préparation avec un grand nombre de bactéries. La purification est réalisée selon le protocole fourni par le fournisseur. Brièvement, les bactéries sont resuspendues et lysées à l'aide d'une série de tampons selon la méthode de lyse NaOH/SDS de Birnboim et Doly (Birnboim and Doly, 1979). Après équilibration de la colonne et du filtre *NucleoBond Xtra*, le lysat est filtré et chargé sur la colonne par gravité. Le plasmide est ainsi fixé sur la résine échangeuse d'ions en silice qui compose la colonne. Après différentes étapes de lavages, le plasmide est élué, précipité puis resuspendu dans un tampon Tris stérile.

La concentration en acide nucléique est ensuite estimée par spectrophotométrie dans l'UV à la longueur d'onde de 260 nm sachant qu'une absorbance égale à 1 équivaut à 50 µg d'ADN/mL. La pureté du plasmide peut également être évaluée par spectrophotométrie en calculant le ratio A260/A280 qui doit être compris entre 1,8 et 2 pour un plasmide correctement purifié.

III.6.1.2.2. Transfection des plasmides dans les cellules

MCF7

La transfection est réalisée selon le protocole décrit dans le paragraphe *III.6.1.1.1*. Le lendemain de la transfection, la sélection antibiotique est initiée à raison de 0,5 µg/mL de puromycine. Le milieu supplémenté en antibiotique est alors changé quotidiennement afin d'éliminer les cellules mortes non transfectées. La sélection antibiotique est maintenue jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence.

Dans le but d'évaluer la qualité de la répression de l'expression des *trx1* en fonction de la séquence shRNA testée, un western blotting anti *trx1* est réalisé (cf. *Matériel et Méthode, XI*). Ce dernier permet de choisir et d'amplifier la lignée cellulaire pour laquelle la répression de l'expression de *trx1* est la plus forte.

III.6.2. Transfection transitoire

Afin d'évaluer si les phosphatases CDC25 sont effectivement des substrats de la thiorédoxine, la lignée cellulaire MCF7 est transfectée avec un plasmide « pEBG » (**figure 34**) permettant l'expression d'une protéine de fusion GST couplée à un dominant négatif de la thiorédoxine 1. Ce dominant négatif contient une mutation de la cystéine 35 du site actif en sérine. Cette mutation empêche le relarguage des substrats de la *trx1* après leur réduction.

III.6.2.1. Amplification et purification des vecteurs

d'expression

Les plasmides (vecteur vide, vecteur contenant le cDNA de la protéine sauvage et vecteur codant pour la thiorédoxine 1 mutée « C35S ») ont été gracieusement donnés par le professeur K-S Kwon (Center for Systems Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon, Corée) (Hwang, Ryu et al. 2004).

Les plasmides, porteur d'un gène de résistance à l'ampicilline, sont transformés dans des bactéries compétentes *E. coli* de la souche DH5 α selon le protocole exposé dans le chapitre I.2. Le génotype de ces bactéries est le suivant : *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169* *phoA* *glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15* *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*. Pour chaque vecteur, une pré-culture bactérienne de 5 mL dans du LB contenant 50 μ g/mL d'ampicilline (*LB amp*) est ensemencée à partir d'un clone précédemment obtenu lors de la transformation. Cette culture est incubée pendant 8 h à 37°C sous agitation puis 40 μ L de suspension bactérienne sont utilisés pour ensemencer une culture de 40 mL dans du milieu LBamp. Après une nuit d'incubation, lorsque l'absorbance à 600 nm est égale à 2, la culture est centrifugée à froid, à 1500*g pendant 20 min.

Le culot est ensuite utilisé pour réaliser une purification du plasmide à l'aide d'un kit commercial de « midi-préparation » (*Sigma*). La purification est réalisée selon le protocole du fournisseur dont le principe est identique à celui exposé dans le paragraphe III.6.1.2.1.2.

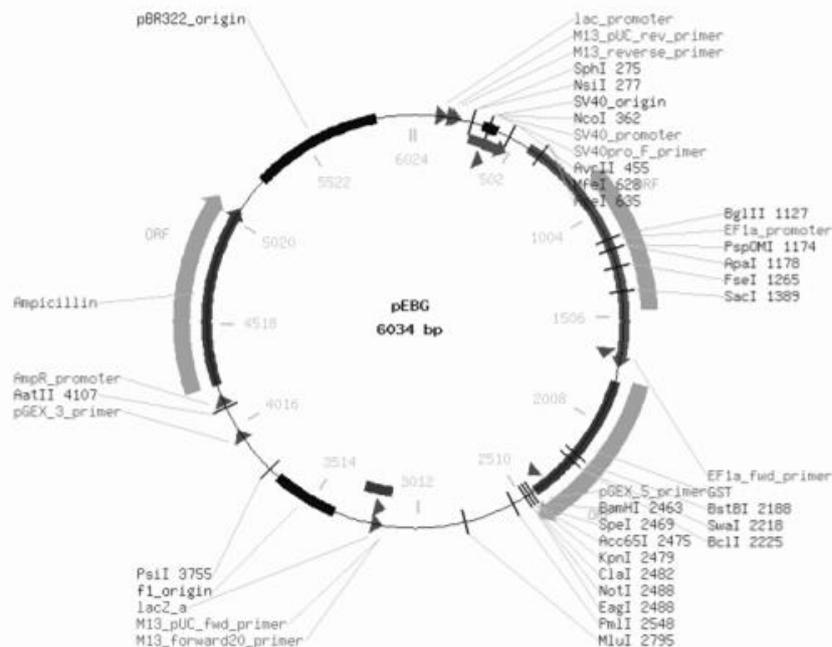


Figure 67: Carte du plasmide « pEBG » permettant l'expression d'une protéine de fusion couplée à la GST.

III.6.2.2. Protocole de transfection transitoire

Le protocole utilisé pour la transfection transitoire des cellules MCF7 est identique à celui de la transfection stable à l'exception près que la totalité des cellules (transfectées ou

non) sont récupérées ou traitées (par une molécule d'intérêt pour l'étude) 24h après la transfection. Il n'y a pas de sélection antibiotique comme lors de la transfection stable.

III.6.2.3. Evaluation de l'efficacité de la transfection

L'efficacité de la transfection est évaluée par un western blotting (cf IX) anti *trx1* après une électrophorèse (SDS-PAGE) en condition dénaturante et réductrice. Lors d'une transfection réussie, deux bandes doivent apparaître, une correspondant à la *trx1* et une autre correspondant à la protéine de fusion GST-*trx* sauvage ou GST-*trx* mutée C35S.

III.6.2.4. Mise en évidence de l'interaction *trx1*-CDC25

L'ensemble de la préparation est réalisé à froid. 5 M de cellules ayant subi le protocole de transfection sont rassemblées et lysées dans 400 µL de tampon de lyse [10 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 0,10% SDS, 0,5% Deoxycholate, 1% Triton X-100, 10% Glycérol]. La suspension cellulaire est incubée pendant 30 min dans de la glace avant d'être soniquée pendant 10s (VibraCell, Fisher Bioblock Scientific). Elle est ensuite centrifugée à froid, à 12000*g, pendant 15 min. Puis, afin d'isoler les adduits formés à partir de la protéine de fusion « GST/*trx1* mutée C35S » une purification par chromatographie d'affinité sur un gel d'agarose-GSH (*Sigma*) est réalisée en microtube. Le surnageant est donc incubé pendant une nuit sur une colonne de gel de GSH-agarose préalablement équilibrée avec du PBS 1X. Après lavage de la colonne avec 3 volumes de PBS 1X, la protéine de fusion est éluée par addition de 3 * 500 µL de glutathion à la concentration de 20 mM dans du PBS 1X. Afin de concentrer les protéines de fusion purifiées, celles-ci sont précipitées par ajout de 250 µL de PCA (acide perchlorique) à 60 %. La suspension est centrifugée à froid à 12000*g, pendant 15 min puis l'acide est éliminé. Les culots sont alors resuspendus dans 100 µL de tampon Laemmli avant d'être soumis à une électrophorèse SDS page (Cf. Matériel et Méthode, XI). Un western blotting anti CDC25A, B et C est réalisé pour mettre en évidence une éventuelle interaction entre *trx1* et les phosphatases CDC25 (Cf. Matériel et Méthode, XI). En effet, si une telle interaction a lieu des CDC25 auront été purifiées avec la protéine de fusion GST-*trx1* mutée C35S. Un western blotting anti *trx1* et anti GST est réalisé en parallèle pour contrôler l'efficacité de la purification.

IV. EVALUATION DE LA VIABILITE CELLULAIRE

L'évaluation de la viabilité cellulaire est réalisée par cytométrie en flux. Deux sondes fluorescentes, le H₂DCFDA (*2',7'dichlorodihydrofluorescéine diacétate*) et l'IP (iodure de propidium) sont utilisées (Ross *et al.*, 1989). Le H₂DCFDA permet d'identifier les cellules vivantes et l'IP, les cellules mortes. En effet, les membranes intactes des cellules vivantes sont perméables au H₂DCFDA mais pas à l'IP. Une fois entré dans les cellules vivantes, le H₂DCFDA est transformé en DCF (*2'7'dichlorofluorescéine*) qui fluoresce dans le vert. La membrane plasmique altérée des cellules mortes permet la pénétration de l'IP qui s'intercale alors dans l'ADN et émet une fluorescence rouge. La 2'7'dichlorofluorescéine quand à elle, diffuse au travers des membranes altérées hors des cellules mortes.

Après avoir étéensemencées en plaque de 6 puits et traitées, les cellules sont incubées pendant 15 min avec 50 µM de H₂DCFDA avant d'être récupérées, centrifugées (500*g, 5 min à 4°C) et lavées avec du PBS 1X (4°C). Elles sont ensuite resuspendues et incubées 15 minutes dans 500 µL d'une solution d'iodure de propidium à la concentration de 75 µM dans du PBS 1X avant d'être analysées sur FACScalibur (*BD Bioscience*) (FL-1 ; FL-3).

V. EVALUATION DE LA QUANTITE RELATIVE D'ERO INTRACELLULAIRES

L'évaluation de la quantité relative d'ERO intracellulaires est réalisée par cytométrie en flux avec le H₂DCFDA comme sonde (LeBel *et al.*, 1992). Ce dernier entre dans les cellules où il est déacétylé par des estérases intracellulaires en un composé polaire et non fluorescent qui en présence d'ERO, et notamment de peroxyde d'hydrogène, est rapidement oxydé en DCF qui émet une fluorescence verte.

24 h après avoir étéensemencées en plaque de 6 puits, les cellules sont incubées pendant 15 min avec 50 µM de H₂DCFDA avant d'être traitées. L'ensemble des cellules flottantes et adhérentes est récupéré après le traitement et la suspension cellulaire est centrifugée (500*g, 5 min à 4°C). Le culot est lavé deux fois avec 1 mL de PBS (4°C) avant d'être de nouveau resuspendu dans 500 µL de PBS 1X (4°C) pour l'analyse sur FACScalibur (*BD Bioscience*) (FL-1 green).

VI. ACTIVITE THIOREDOXINE REDUCTASE

VI.1. Préparation des échantillons

L'ensemble de la préparation est réalisé à froid. Après traitement, des culots cellulaires sont préparés à partir de 5 boîtes de Pétri correspondant aux mêmes conditions de traitement. Ces culots sont resuspendus dans 700 μL de tampon phosphate 0,1M [K_2HPO_4 , $\text{H}_2\text{KO}_4\text{P}$], pH7. Les suspensions cellulaires sont soniquées 3 fois pendant 10s (VibraCell, Fisher Bioblock Scientific) puis centrifugées à 12000*g, à 4°C, pendant 15 min. Les surnageants sont utilisés pour réaliser les activités enzymatiques.

VI.2. Mesure

La mesure de l'activité thiorédoxine réductase est basée sur la réduction, dépendante de NADPH, du DTNB (*acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque*) en deux molécules de TNB (*acide 5-thio-2-nitrobenzoïque*) qui absorbe à 412 nm ($\epsilon = 13600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Holmgren, 1977; Arner *et al.*, 1995).

La réaction est réalisée à 25°C, en présence de tampon T [0,1M tampon phosphate, pH7.4; 2 mM EDTA], de 0,2 mM de NADPH, H^+ et de 3 mM de DTNB.

Le DTNB pouvant réagir de façon non spécifique avec des groupements thiols (-SH) protéiques libres pour former un disulfide mixte et une molécule de TNB^{2-} , ces réactions indépendantes de l'activité trxR sont évaluées par spectrophotométrie à 412 nm en absence de NADPH, H^+ . L'activité trxR est estimée par différence entre le signal obtenu en présence de NADPH, H^+ et le signal dû aux réactions non enzymatiques, en absence de NADPH, H^+ .

Les mesures sont réalisées en cinétique pendant 4 min sur un spectrophotomètre (Uvikon 941).

VII. MESURE DE L'ETAT D'OXYDATION INTRACELLULAIRE DE LA THIOREDOXINE 1

VII.1. Préparation des échantillons

La mesure de l'état d'oxydation de la thiorédoxine 1 dans les cellules est réalisée d'après la méthode de Watson (Watson, Pohl *et al.*, 2003). Les groupements thiol portés par les cystéines des thiorédoxines sous forme réduites sont carboxyméthylés par réaction avec l'acide iodoacétique. La charge globale de la protéine devient ainsi négative, permettant aux

thiorédoxines réduites de migrer plus facilement que les thiorédoxines oxydées sur un gel d'électrophorèse non dénaturant et non réducteur.

Après traitement, des culots cellulaires contenant 5 M de cellules sont resuspendus dans 200 μ L d'un tampon de lyse [6 mol/L Guanidine hydrochloride, 50 mM Tris/HCl pH8.3, 3 mmol/L EDTA, 0.5% Triton-X-100 et 1mM PMSF] contenant 50 mM d'acide iodoacétique. Après une incubation de 30 min à 37°C dans le noir, les échantillons sont brièvement soniqués et l'excès d'acide iodoacétique est éliminé par passage des échantillons sur des colonnes Microspin G25 (*GE Healthcare*). L'éluat est conservé au congélateur -20°C.

VII.2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide non dénaturant, non réducteur

Les échantillons sont soumis à une électrophorèse en conditions non dénaturante et non réductrice. Les protéines sont donc séparées dans un état proche de leur état natif.

Les groupements -SH des cystéines C32/C35 et C62/C69 des thiorédoxines 1 sont carboxyméthylés. Les *trx1* réduites vont ainsi porter des charges négatives qui vont faciliter leur migration par rapport aux *trx1* oxydées. Deux états d'oxydation des *trx1* peuvent ainsi être observés, une oxydation partielle qui correspond à l'oxydation des dithiols du site actif en C32/C35 et une oxydation totale qui correspond à l'oxydation des deux dithiols C32/C35 et C62/C69. Les thiorédoxines totalement oxydées migreront moins rapidement que celles partiellement oxydées.

Le gel d'électrophorèse est composé d'un gel de concentration pH6.8 [5% Acryl/Bisacrylamide, 125 mM Tris HCl, 5% glycérol, 0,0625% TEMED, 0,125% Ammonium persulfate] superposé à un gel de séparation pH8.8 [14% Acryl/Bisacrylamide, 375 mM Tris-HCl, 5% glycérol, 0,0625% TEMED, 0,125% Ammonium persulfate].

Pour la migration des échantillons, un volume d'éluat est ajouté à un volume de tampon de charge [0,1 M Tris HCl, 50% Glycérol, 0,05% bleu de bromophénol].

Le système Mini-Protean Tetra Electrophoresis System de *Biorad* est utilisé pour réaliser l'électrophorèse. La migration est réalisée à température ambiante dans un champ électrique de 150 Volts en présence de tampon de migration [192 mM Glycine, 25 mM Tris].

VII.3. Immunodétection de la *trx1*

Une fois la migration électrophorétique terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert. La membrane et le gel sont préalablement

équilibrés pendant 15 min dans du tampon de transfert pH8 [12,5 mM Tris, 0,1 M Glycine, 10% Méthanol]. Le transfert est ensuite réalisé en condition immergée dans du tampon de transfert, pendant 2 h, sous une tension de 25 Volts, avec le système Xcell SureLock™ Mini Cell de *Invitrogen*.

La membrane est ensuite incubée pendant 10 min dans de l'acide acétique à 5% puis séchée à l'air libre pendant 2 min de façon à fixer les protéines qui, n'ayant pas été dénaturées, pourraient avoir tendance à diffuser dans le tampon de dilution de l'anticorps.

La membrane est ensuite saturée en protéines dans une solution de saturation composée de TBST (*tris buffer salin-Tween*) pH7.6 [20 mM Tris, 136,8 mM NaCl, 0,1% Tween-20] et de 5% de lait concentré. Après trois lavages de 5 min avec du tampon TBST, la membrane est incubée pendant une nuit en présence d'un anticorps primaire dirigés contre la *trx1* (Trx FL-105, sc-20146, *Santa Cruz*). Cet anticorps a été préparé chez le lapin et est dilué au 1/1000^e dans une solution commerciale qui permet l'amplification du signal (Signalboost, solution 1, *Merck*). Après trois lavages de 5 min avec du tampon TBST, la membrane est incubée pendant 1 h en présence d'un anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG, *Santa Cruz*) dirigé contre l'anticorps primaire, diluée au 1/7500^e dans une solution commerciale qui permet l'amplification du signal (Signalboost, solution 2, *Merck*). L'anticorps secondaire porte une activité de peroxydase de raifort. Après trois lavages de 5 min dans du tampon TBST, la membrane est incubée quelques secondes dans du PBS 1 X.

La révélation est réalisée par chimiluminescence en utilisant une solution stable de peroxyde et une solution de Luminol hypersensible (Immun-Star HRP Chemiluminescence, *Biorad*). La luminescence produite est détectée et quantifiée par ECL en utilisant le système Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (*Biorad*).

VIII. DOSAGE DU CONTENU INTRACELLULAIRE EN GLUTATHION REDUIT

L'analyse du contenu intracellulaire en GSH est réalisée selon une méthode adaptée de *Lenton et al.* qui utilise une technique de CLHP (*chromatographie liquide haute performance*) (*Thermo Fischer*), couplée à un dispositif de réaction post-colonne et à une détection fluorométrique (*Lenton et al.*, 1999). Le processus chromatographique mis en œuvre est de type partage à polarité de phase inversée.

L'analyse est réalisée sur une colonne d'interaction hydrophobe (C18, *Thermo Hypersil*, *Thermo Fischer*), thermostatée à 60°C, dans un four à colonne (modèle 7990, *JonesChromatography*). La phase mobile est constituée de tampon phosphate de potassium

($\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$; pH 3) à 50 mM et éluée à 1 mL/min. La détection de GSH est obtenue par réaction avec de l'OPA (*ortho-phthalaldéhyde*) (*Sigma*) dans le dispositif post-colonne. La réaction chimique de dérivatisation est une condensation de l'OPA avec la fonction thiol et l'amine primaire du GSH. Cette condensation forme une espèce détectable en fluorescence à 340 nm d'excitation et 425 nm d'émission. La réaction post-colonne se déroule à 60°C dans du tampon phosphate de potassium ($\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{K}_3\text{PO}_4$; pH 12) à 200 mM, contenant 200 mM d'OPA. La détection de GSH est obtenue à l'aide d'un spectrofluorimètre (FP-920 Intelligent Fluorescence Detector, *Jasco*). L'acquisition des données et l'analyse des spectres sont réalisées par un dispositif informatique de capture et d'intégration (Azur, Datalys, *Thermo Fischer*).

Le contenu en GSH est déduit d'une gamme de concentrations de GSH (*Sigma*) comprises entre 0 à 651 μM . Les solutions sont préparées dans de l'acide perchlorique 10% (v/v) et conservées dans la glace pour éviter toute oxydation du GSH. 5 mg de GSH sont dilués dans une fiole jaugée de 50 mL, puis cette solution est elle-même diluée au 1/10^e dans des fioles jaugées de 5 mL de manière à avoir les solutions correspondantes aux points de la gamme étalon.

Les concentrations en GSH sont rapportées aux quantités de protéines présentes dans chaque échantillon. Les protéines sont dosées selon une méthode de Lowry modifiée (Zakim) (Cf. *Matériel et Méthodes XIV*).

IX. ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE

Le cycle cellulaire correspond à la succession des phases G0-G1, S, G2 et M. L'analyse du contenu en ADN des cellules permet de déterminer la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Trois types de populations cellulaires peuvent être identifiés : les cellules en phases G0 et G1 qui sont au stade diploïde (2n chromosomes), les cellules en phase G2 et M qui sont au stade tétraploïde (4n chromosomes) et les cellules en phase S qui ont un contenu intermédiaire en ADN.

La mesure du contenu en ADN est réalisée par cytométrie en flux après marquage stœchiométrique par l'iodure de propidium (Lacombe and Belloc, 1996). Afin que l'iodure de propidium ne marque pas les simples brins de l'ARN, la manipulation nécessite l'ajout de RNase A.

Après avoir été ensemencées en plaque de 6 puits et traitées, les cellules flottantes et adhérentes sont récupérées et lavées avec 1 mL de PBS 1X (4°C). Elles sont ensuite fixées

dans de l'éthanol à 70 % pendant au moins 45 minutes à -20°C. L'éthanol est ensuite éliminé par centrifugation (500*g, 5 min à 4°C) et les cellules sont lavées une fois avec 1 mL de PBS 1X (4°C). Elles sont ensuite resuspendues dans 500 µL de solution de marquage [50 µg/mL IP, 0,1% RNase A, 0,1 % Triton X-100]. Après 15 minutes d'incubation à l'obscurité, l'analyse est réalisée sur FACScalibur (*BD Bioscience*) (FL-3) et les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Mod FIT^{LT} (*Verity Software*).

X. IMMUNOFLOUORESCENCE : DETECTION DES FOYERS γ -H2AX

Les cellules sontensemencées sur lamelle de verre en plaque de 6 puits (surface individuelle de 9,6 cm²) à une densité de 0,2.10⁶ cellules/puits. Au bout de 24 h, les cellules ont adhéréessur les lamelles. Le milieu de culture est alors remplacé par le traitement (Cf. *Matériel et Méthodes III.5*). A la fin du temps de traitement, le milieu de culture est éliminé par aspiration. Les cellules sont lavées trois fois pendant 5 min dans du PBS 1X froid avant d'être fixées pendant 15 min à température ambiante dans une solution de 4% de formaldéhyde préparée dans du PBS 1X. Après trois lavages supplémentaires, les cellules sont perméabilisées et bloquées pendant 30 min à température ambiante grâce à une solution contenant 0,1% de Triton X-100 et 3% d'albumine sérique bovine dans du PBS 1X. Les lamelles sont alors mises en contact avec l'anticorps primaire anti- γ -H2AX (monoclonal, souris, clone JBW301, *Upstate/Millipore*) dilué au 1/500 pendant une nuit à 4°C. Les lamelles sont à nouveau lavées trois fois avec du PBS 1X, puis incubées pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité avec un anticorps secondaire anti-IgG de souris l'AlexaFluor 594 (1/500, fluorescence rouge, *Molecular Probes*). Les cellules sont lavées une fois dans du PBS 1X puis l'ADN des cellules est marqué en présence de 50 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, fluorescence bleue, *Sigma-Aldrich*) pendant 5 min. Finalement, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS 1X et les lamelles sont montées sur lames histologiques dans du milieu de montage PermaFluor (*Immunon*) et les cellules sont visualisées à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon Eclipse 80i (*Nikon*).

XI. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES PAR WESTERN BLOTTING

XI.1. Préparation des échantillons

L'ensemble de la préparation est réalisé à froid. Après traitement, des culots cellulaires contenant 1 M de cellules sont resuspendus dans 100 µL d'un tampon de lyse enrichi en

inhibiteurs de phosphatases [10 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 0,10% SDS, 0,5% Deoxycholate, 1% Triton X-100, 10% Glycérol]. Les suspensions cellulaires sont incubées pendant 30 min dans de la glace avant d'être soniquées pendant 10s (VibraCell, Fisher Bioblock Scientific). Elles sont ensuite centrifugées à froid à 12000*g, pendant 15 min. Les surnageants sont utilisés pour déterminer la concentration en protéines et réaliser un western blotting.

XI.2. Electrophorèse en gel dénaturant de polyacrylamide, SDS-Page

La technique du gel d'électrophorèse en condition dénaturante a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970 (Laemmli, 1970).

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) est réalisée en condition dénaturante grâce à la présence de SDS (*sodium dodécyl sulfate*).

A 1 volume d'éluat, contenant de 20 à 40 µg de protéines est ajouté un volume de tampon de dénaturation [62 mM Tris-HCl pH6.8, 10% Glycérol, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,002% Bleu de Bromophénol]. Le DTT (*dithiothréitol*) présent dans le tampon de dénaturation permet de réduire les ponts disulfures de façon à ce que les protéines migrent sous forme monomérique. Si l'électrophorèse doit être réalisée en condition non réductrice, un tampon ne contenant pas de DTT sera utilisé. La solution est très brièvement centrifugée avant et après chauffage pendant 5 min à 100°C. Les échantillons ainsi que des marqueurs de taille sont ensuite déposés sur le gel. Les protéines sont tout d'abord condensées dans un gel de concentration pH6.8 [5% Acryl/Bisacrylamide, 125 mM Tris-HCl, 5% glycérol, 0,2% SDS, 0,0625% TEMED, 0,125% Ammonium persulfate] puis séparées dans un gel de séparation pH8.8 [8, 12, 14% Acryl/Bisacrylamide (selon les protéines étudiées, cf *légendes des figures*), 375 mM Tris-HCl, 5% glycérol, 0,0625% TEMED, 0,125% Ammonium persulfate].

Le système Mini-Protean Tetra Electrophoresis System (*Biorad*) est utilisé pour réaliser l'électrophorèse. La migration est réalisée à température ambiante dans un champ électrique de 150 Volts en présence de tampon de migration [192 mM Glycine, 25 mM Tris, 0,1% SDS]. Après migration le gel est utilisé pour réaliser un western blotting.

XI.3. Immunodétection des protéines d'intérêts

Une fois la migration électrophorétique terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par électrotransfert. La membrane et le gel sont préalablement équilibrés pendant 15 min dans du tampon de transfert pH8 [12,5 mM Tris, 0,1 M Glycine,

10% Méthanol]. Le transfert est ensuite réalisé en condition immergée dans du tampon de transfert, pendant 1 h, sous une tension de 25 Volts, avec le système Xcell SureLock™ Mini Cell de *Invitrogen*. Lorsque le transfert est terminé, la membrane est colorée au rouge ponceau afin de vérifier la qualité du transfert et d'établir un contrôle de dépôt.

La membrane est saturée en protéines dans une solution de saturation composée de TBST pH7.6 [20 mM Tris, 136,8 mM NaCl, 0,1% Tween-20] et de 5% de lait concentré. Après trois lavages de 5 min avec du tampon TBST, la membrane est incubée pendant une nuit en présence de l'anticorps primaire d'intérêt. Les caractéristiques de ces anticorps sont données dans la **figure 68** Après trois lavages de 5 min avec du tampon TBST, la membrane est incubée pendant 1 h en présence d'un anticorps secondaire (goat anti-rabbit IgG, *Santa Cruz* ou anti-mouse IgG, *Merck*) dirigé contre l'anticorps primaire, diluée au 1/7500^e dans du TBST. L'anticorps secondaire porte une activité de peroxydase de raifort. Après trois lavages de 5 min dans du tampon TBST, la membrane est incubée quelques secondes dans du PBS 1X.

La révélation est réalisée par chimiluminescence en utilisant une solution stable de peroxyde et une solution de Luminol (Western Blotting Luminol Reagent, *Santa cruz*). La luminescence produite est détectée et quantifiée par ECL en utilisant un system Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (*Biorad*).

Anticorps	Poids Moléculaire (kDa)	Type d'anticorps	Dilution	Fournisseur
PCDK1	34	Lapin	1/1000	Santa Cruz
PCDK2	34	Lapin	1/1000	
CDK1	34	Lapin	1/1000	
CDK2	34	Souris	1/500	
CDC25A	67	Souris	1/150	
CDC25B	65	Lapin	1/200	
CDC25C	53/46	Lapin	1/500	
trx1	12	Lapin	1/1000	
trxR1	57	Souris	1/1000	
MnSOD	80	Lapin	1/5000	Lab Frontier

Figure 68: Caractéristiques des anticorps primaires utilisés.

XII. EVALUATION DE L'ACTIVITE CDC25 DANS LES CELLULES

La mesure de l'activité CDC25 dans les cellules MCF7 consiste à évaluer le niveau de phosphorylation de leurs substrats naturels, les CDK : CDK2 pour l'activité CDC25A et CDK1 pour les activités CDC25B et C.

Cette évaluation est réalisée par western blotting (cf IX). Les taux de phosphorylation de CDK1 et CDK2 sont déterminés par le calcul du ratio de la densité du signal obtenu pour les PCDK sur la densité du signal obtenu pour les CDK. Le taux de phosphorylation obtenu dans les cellules traitées sera rapporté à celui obtenu pour les cellules témoins.

XIII. DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

La concentration de protéines dans les extraits cellulaires est estimée d'après la méthode de Lowry par comparaison à une gamme de concentrations comprises entre 0 et 25 µg/mL, obtenue par dilution d'une solution de SAB (*sérum albumine bovine*). L'absorbance est mesurée à 660 nm. La qualité des dosages est contrôlée en vérifiant, pour chaque série, la concentration d'un standard contenant une solution protéique de concentration connue et traité en parallèle aux échantillons à mesurer (Lowry *et al.*, 1951).

XIV. DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE LOWRY MODIFIEE

(ZAKIM)

Les concentrations de glutathion dans les échantillons cellulaires sont rapportées à la concentration de protéines du culot cellulaire précipité par une solution d'acide perchlorique 10 %. Le dosage de ces protéines utilise la méthode de Lowry *et al* mais nécessite au préalable une basification du culot protéique par solubilisation de celui-ci dans un volume de NaOH 1 M. La gamme d'étalonnage est préparée par précipitation de la SAB par de l'acide perchlorique (10 % m/v) puis solubilisation dans NaOH 1 M. L'absorbance est mesurée à 740 nm.

XV. ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques de résultats sont données pour des expériences réalisées au moins trois fois de manière indépendante. Les résultats sont présentés comme une moyenne ± écart type et analysés par un test « t de Student » pour déterminer la significativité statistique

de ces résultats. Les données sont considérées comme significativement différentes pour des valeurs de p inférieures à 0,05.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aachmann, F. L., L. S. Sal, H. Y. Kim, S. M. Marino, V. N. Gladyshev and A. Dikiy (2010). "Insights into function, catalytic mechanism and fold evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductase B1 through structural analysis." J Biol Chem.
- Aressy, B. and B. Ducommun (2008). "Cell cycle control by the CDC25 phosphatases." Anticancer Agents Med Chem **8**(8): 818-824.
- Arner, E. S. (2009). "Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions." Biochim Biophys Acta **1790**(6): 495-526.
- Arner, E. S., M. Bjornstedt and A. Holmgren (1995). "1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity." J Biol Chem **270**(8): 3479-3482.
- Arner, E. S. and A. Holmgren (2006). "The thioredoxin system in cancer." Semin Cancer Biol **16**(6): 420-426.
- Arner, E. S., H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren and G. Spyrou (2001). "Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex." Free Radic Biol Med **31**(10): 1170-1178.
- Bagheri-Yarmand, R., A. Nanos-Webb, A. Biernacka, T. Bui and K. Keyomarsi (2010). "Cyclin E deregulation impairs mitotic progression through premature activation of Cdc25C." Cancer Res **70**(12): 5085-5095.
- Baigi, M. G., L. Brault, A. Neguesque, M. Beley, R. E. Hilali, F. Gauzere and D. Bagrel (2008). "Apoptosis/necrosis switch in two different cancer cell lines: influence of benzoquinone- and hydrogen peroxide-induced oxidative stress intensity, and glutathione." Toxicol In Vitro **22**(6): 1547-1554.
- Baker, A. F., T. Dragovich, W. R. Tate, R. K. Ramanathan, D. Roe, C. H. Hsu, D. L. Kirkpatrick and G. Powis (2006). "The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma." J Lab Clin Med **147**(2): 83-90.
- Baratte, B., L. Meijer, K. Galaktionov and D. Beach (1992). "Screening for antimetabolic compounds using the cdc25 tyrosine phosphatase, an activator of the mitosis-inducing p34cdc2/cyclin Bcd13 protein kinase." Anticancer Res **12**(3): 873-880.
- Barnouin, K., M. L. Dubuisson, E. S. Child, S. Fernandez de Mattos, J. Glassford, R. H. Medema, D. J. Mann and E. W. Lam (2002). "H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression." J Biol Chem **277**(16): 13761-13770.
- Barranco-Medina, S., J. J. Lazaro and K. J. Dietz (2009). "The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function." FEBS Lett **583**(12): 1809-1816.
- Bartek, J., R. Iggo, J. Gannon and D. P. Lane (1990). "Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines." Oncogene **5**(6): 893-899.
- Beauchamp, C. and I. Fridovich (1971). "Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels." Anal Biochem **44**(1): 276-287.

- Berggren, M., A. Gallegos, J. R. Gasdaska, P. Y. Gasdaska, J. Warneke and G. Powis (1996). "Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia." Anticancer Res **16**(6B): 3459-3466.
- Biaglow, J. E. and R. A. Miller (2005). "The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy." Cancer Biol Ther **4**(1): 6-13.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Boulikas, T. and M. Vougiouka (2004). "Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review)." Oncol Rep **11**(3): 559-595.
- Boutros, R., C. Dozier and B. Ducommun (2006). "The when and wheres of CDC25 phosphatases." Curr Opin Cell Biol **18**(2): 185-191.
- Boutros, R., V. Lobjois and B. Ducommun (2007). "CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets?" Nat Rev Cancer **7**(7): 495-507.
- Bradshaw, T. D., C. S. Matthews, J. Cookson, E. H. Chew, M. Shah, K. Bailey, A. Monks, E. Harris, A. D. Westwell, G. Wells, C. A. Loughton and M. F. Stevens (2005). "Elucidation of thioredoxin as a molecular target for antitumor quinols." Cancer Res **65**(9): 3911-3919.
- Brisson, M., C. Foster, P. Wipf, B. Joo, R. J. Tomko, Jr., T. Nguyen and J. S. Lazo (2007). "Independent mechanistic inhibition of cdc25 phosphatases by a natural product caulibugulone." Mol Pharmacol **71**(1): 184-192.
- Brisson, M., T. Nguyen, P. Wipf, B. Joo, B. W. Day, J. S. Skoko, E. M. Schreiber, C. Foster, P. Bansal and J. S. Lazo (2005). "Redox regulation of Cdc25B by cell-active quinolinediones." Mol Pharmacol **68**(6): 1810-1820.
- Brown, K. K., A. G. Cox and M. B. Hampton (2010). "Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin." FEBS Lett **584**(6): 1257-1262.
- Buhrman, G., B. Parker, J. Sohn, J. Rudolph and C. Mattos (2005). "Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond." Biochemistry **44**(14): 5307-5316.
- Cadenas, C., D. Franckenstein, M. Schmidt, M. Gehrman, M. Hermes, B. Geppert, W. Schormann, L. J. Maccoux, M. Schug, A. Schumann, C. Wilhelm, E. Freis, K. Ickstadt, J. Rahnenfuhrer, J. I. Baumbach, A. Sickmann and J. G. Hengstler (2010). "Role of thioredoxin reductase 1 and thioredoxin interacting protein in prognosis of breast cancer." Breast Cancer Res **12**(3): R44.
- Cailleau, R., R. Young, M. Olive and W. J. Reeves, Jr. (1974). "Breast tumor cell lines from pleural effusions." J Natl Cancer Inst **53**(3): 661-674.
- Cangi, M. G., B. Cukor, P. Soung, S. Signoretti, G. Moreira, Jr., M. Ranashinge, B. Cady, M. Pagano and M. Loda (2000). "Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer." J Clin Invest **106**(6): 753-761.
- Cao, J., J. Schulte, A. Knight, N. R. Leslie, A. Zagodzon, R. Bronson, Y. Manevich, C. Beeson and C. A. Neumann (2009). "Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity." Embo J **28**(10): 1505-1517.

- Casagrande, S., V. Bonetto, M. Fratelli, E. Gianazza, I. Eberini, T. Massignan, M. Salmona, G. Chang, A. Holmgren and P. Ghezzi (2002). "Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(15): 9745-9749.
- Casali, F., V. Burgat and P. Guerre (2011). "Le dimethylsulfoxyde (DMSO): principales propriétés et usage autorisés." Revus de médecine vétérinaire **150**(3): 207-220.
- Caselli, A., R. Marzocchini, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini and G. Ramponi (1998). "The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂." J Biol Chem **273**(49): 32554-32560.
- Casini, A., C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P. J. Dyson, B. K. Keppler and L. Messori (2008). "Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action." J Inorg Biochem **102**(3): 564-575.
- Cenas, N., H. Nivinskas, Z. Anusevicius, J. Sarlauskas, F. Lederer and E. S. Arner (2004). "Interactions of quinones with thioredoxin reductase: a challenge to the antioxidant role of the mammalian selenoprotein." J Biol Chem **279**(4): 2583-2592.
- Cenas, N., S. Prast, H. Nivinskas, J. Sarlauskas and E. S. Arner (2006). "Interactions of nitroaromatic compounds with the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase and the relation to induction of apoptosis in human cancer cells." J Biol Chem **281**(9): 5593-5603.
- Cepeda, V., M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo and J. M. Perez (2007). "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity." Anticancer Agents Med Chem **7**(1): 3-18.
- Cha, M. K., K. H. Suh and I. H. Kim (2009). "Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma." J Exp Clin Cancer Res **28**: 93.
- Chen, C. Y., D. Willard and J. Rudolph (2009). "Redox regulation of SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatases by two backdoor cysteines." Biochemistry **48**(6): 1399-1409.
- Chen, X. P., S. Liu, W. X. Tang and Z. W. Chen (2007). "Nuclear thioredoxin-1 is required to suppress cisplatin-mediated apoptosis of MCF-7 cells." Biochem Biophys Res Commun **361**(2): 362-366.
- Chiarugi, P. (2009). "Survival or death: the redox paradox." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2651-2654.
- Chiarugi, P. and F. Buricchi (2007). "Protein tyrosine phosphorylation and reversible oxidation: two cross-talking posttranslational modifications." Antioxid Redox Signal **9**(1): 1-24.
- Chiarugi, P. and P. Cirri (2003). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatases during receptor tyrosine kinase signal transduction." Trends Biochem Sci **28**(9): 509-514.
- Chiarugi, P., T. Fiaschi, M. L. Taddei, D. Talini, E. Giannoni, G. Raugei and G. Ramponi (2001). "Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation." J Biol Chem **276**(36): 33478-33487.
- Chiarugi, P., G. Pani, E. Giannoni, L. Taddei, R. Colavitti, G. Raugei, M. Symons, S. Borrello, T. Galeotti and G. Ramponi (2003). "Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion." J Cell Biol **161**(5): 933-944.

- Cho, S. H., C. H. Lee, Y. Ahn, H. Kim, H. Kim, C. Y. Ahn, K. S. Yang and S. R. Lee (2004). "Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling." FEBS Lett **560**(1-3): 7-13.
- Chua, P. J., G. W. Yip and B. H. Bay (2009). "Cell cycle arrest induced by hydrogen peroxide is associated with modulation of oxidative stress related genes in breast cancer cells." Exp Biol Med (Maywood) **234**(9): 1086-1094.
- Collet, J. F. and J. Messens (2010). "Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins." Antioxid Redox Signal.
- Cox, A. G., K. K. Brown, E. S. Arner and M. B. Hampton (2008). "The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation." Biochem Pharmacol **76**(9): 1097-1109.
- Cox, A. G., C. C. Winterbourn and M. B. Hampton (2010). "Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling." Biochem J **425**(2): 313-325.
- Cumming, R. C., N. L. Andon, P. A. Haynes, M. Park, W. H. Fischer and D. Schubert (2004). "Protein disulfide bond formation in the cytoplasm during oxidative stress." J Biol Chem **279**(21): 21749-21758.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, G. Colombo, D. Giustarini and A. Milzani (2009). "Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans." Trends Biochem Sci **34**(2): 85-96.
- de Pina, M. Z., H. Vazquez-Meza, J. P. Pardo, J. L. Rendon, R. Villalobos-Molina, H. Riveros-Rosas and E. Pina (2008). "Signaling the signal, cyclic AMP-dependent protein kinase inhibition by insulin-formed H₂O₂ and reactivation by thioredoxin." J Biol Chem **283**(18): 12373-12386.
- DeYulia, G. J., Jr., J. M. Carcamo, O. Borquez-Ojeda, C. C. Shelton and D. W. Golde (2005). "Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5044-5049.
- Douer, D. and M. S. Tallman (2005). "Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies." J Clin Oncol **23**(10): 2396-2410.
- Ennen, M., V. Minig, S. Grandemange, N. Touche, J. L. Merlin, V. Besancenot, E. Brunner, L. Domenjoud and P. Becuwe (2011). "Regulation of the high basal expression of the manganese superoxide dismutase gene in aggressive breast cancer cells." Free Radic Biol Med **50**(12): 1771-1779.
- Enoksson, M., A. P. Fernandes, S. Prast, C. H. Lillig, A. Holmgren and S. Orrenius (2005). "Overexpression of glutaredoxin 2 attenuates apoptosis by preventing cytochrome c release." Biochem Biophys Res Commun **327**(3): 774-779.
- Eriksson, S. E., S. Prast-Nielsen, E. Flaberg, L. Szekely and E. S. Arner (2009). "High levels of thioredoxin reductase 1 modulate drug-specific cytotoxic efficacy." Free Radic Biol Med **47**(11): 1661-1671.
- Esterbauer, H., R. J. Schaur and H. Zollner (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free Radic Biol Med **11**(1): 81-128.
- Evens, A. M., P. Lecane, D. Magda, S. Prachand, S. Singhal, J. Nelson, R. A. Miller, R. B. Gartenhaus and L. I. Gordon (2005). "Motexafin gadolinium generates reactive oxygen species and induces apoptosis in sensitive and highly resistant multiple myeloma cells." Blood **105**(3): 1265-1273.

- Fang, J., J. Lu and A. Holmgren (2005). "Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity." J Biol Chem **280**(26): 25284-25290.
- Farina, A. R., A. Tacconelli, L. Cappabianca, M. P. Masciulli, A. Holmgren, G. J. Beckett, A. Gulino and A. R. Mackay (2001). "Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion." Eur J Biochem **268**(2): 405-413.
- Forman, H. J., M. Maiorino and F. Ursini (2010). "Signaling functions of reactive oxygen species." Biochemistry **49**(5): 835-842.
- Fourquet, S., M. E. Huang, B. D'Autreaux and M. B. Toledano (2008). "The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling." Antioxid Redox Signal **10**(9): 1565-1576.
- Fujino, G., T. Noguchi, K. Takeda and H. Ichijo (2006). "Thioredoxin and protein kinases in redox signaling." Semin Cancer Biol **16**(6): 427-435.
- Furuhata, A., M. Nakamura, T. Osawa and K. Uchida (2002). "Thiolation of protein-bound carcinogenic aldehyde. An electrophilic acrolein-lysine adduct that covalently binds to thiols." J Biol Chem **277**(31): 27919-27926.
- Gabrielli, B. G., J. M. Clark, A. K. McCormack and K. A. Ellem (1997). "Hyperphosphorylation of the N-terminal domain of Cdc25 regulates activity toward cyclin B1/Cdc2 but not cyclin A/Cdk2." J Biol Chem **272**(45): 28607-28614.
- Galaktionov, K., A. K. Lee, J. Eckstein, G. Draetta, J. Meckler, M. Loda and D. Beach (1995). "CDC25 phosphatases as potential human oncogenes." Science **269**(5230): 1575-1577.
- Gan, L., X. L. Yang, Q. Liu and H. B. Xu (2005). "Inhibitory effects of thioredoxin reductase antisense RNA on the growth of human hepatocellular carcinoma cells." J Cell Biochem **96**(3): 653-664.
- Gandin, V., A. P. Fernandes, M. P. Rigobello, B. Dani, F. Sorrentino, F. Tisato, M. Bjornstedt, A. Bindoli, A. Sturaro, R. Rella and C. Marzano (2010). "Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase." Biochem Pharmacol **79**(2): 90-101.
- Garner-Hamrick, P. A. and C. Fisher (1998). "Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate cdc25B causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects." Int J Cancer **76**(5): 720-728.
- Gelhaye, E., N. Rouhier and J. P. Jacquot (2003). "Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction." FEBS Lett **555**(3): 443-448.
- Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio and P. G. Pelicci (2007). "Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?" Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 722-728.
- Go, Y. M., P. J. Halvey, J. M. Hansen, M. Reed, J. Pohl and D. P. Jones (2007). "Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion." Am J Pathol **171**(5): 1670-1681.
- Goetz, M. E. and A. Luch (2008). "Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens." Cancer Lett **266**(1): 73-83.
- Groeger, G., C. Quiney and T. G. Cotter (2009). "Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2655-2671.

- Gromer, S., L. D. Arscott, C. H. Williams, Jr., R. H. Schirmer and K. Becker (1998). "Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds." J Biol Chem **273**(32): 20096-20101.
- Gromer, S., S. Urig and K. Becker (2004). "The thioredoxin system--from science to clinic." Med Res Rev **24**(1): 40-89.
- Habig, W. H., M. J. Pabst and W. B. Jakoby (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." J Biol Chem **249**(22): 7130-7139.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hashemy, S. I., J. S. Ungerstedt, F. Zahedi Avval and A. Holmgren (2006). "Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase." J Biol Chem **281**(16): 10691-10697.
- Hawkes, W. C. and Z. Alkan (2010). "Regulation of redox signaling by selenoproteins." Biol Trace Elem Res **134**(3): 235-251.
- Hedstrom, E., S. Eriksson, J. Zawacka-Pankau, E. S. Arner and G. Selivanova (2009). "p53-dependent inhibition of TrxR1 contributes to the tumor-specific induction of apoptosis by RITA." Cell Cycle **8**(21): 3576-3583.
- Hileman, E. O., J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating and P. Huang (2004). "Intrinsic oxidative stress in cancer cells: a biochemical basis for therapeutic selectivity." Cancer Chemother Pharmacol **53**(3): 209-219.
- Holmgren, A. (1977). "Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction." J Biol Chem **252**(13): 4600-4606.
- Holmgren, A. and J. Lu (2010). "Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease." Biochem Biophys Res Commun **396**(1): 120-124.
- Honaker, Y. and H. Piwnica-Worms (2010). "Casein kinase 1 functions as both penultimate and ultimate kinase in regulating Cdc25A destruction." Oncogene **29**(23): 3324-3334.
- Horton, N. D., B. M. Mamiya and J. P. Kehrer (1997). "Relationships between cell density, glutathione and proliferation of A549 human lung adenocarcinoma cells treated with acrolein." Toxicology **122**(1-2): 111-122.
- Isoda, M., Y. Kanemori, N. Nakajo, S. Uchida, K. Yamashita, H. Ueno and N. Sagata (2009). "The extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase pathway phosphorylates and targets Cdc25A for SCF beta-TrCP-dependent degradation for cell cycle arrest." Mol Biol Cell **20**(8): 2186-2195.
- Ito, Y., H. Yoshida, T. Uruno, Y. Takamura, A. Miya, K. Kuma and A. Miyauchi (2004). "Expression of cdc25A and cdc25B phosphatase in breast carcinoma." Breast Cancer **11**(3): 295-300.
- Jaimes, E. A., E. G. DeMaster, R. X. Tian and L. Raij (2004). "Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(6): 1031-1036.
- Jones, D. T., C. W. Pugh, S. Wigfield, M. F. Stevens and A. L. Harris (2006). "Novel thioredoxin inhibitors paradoxically increase hypoxia-inducible factor-alpha expression but decrease functional transcriptional activity, DNA binding, and degradation." Clin Cancer Res **12**(18): 5384-5394.

- Jullien, D., B. Bugler, C. Dozier, M. Cazales and B. Ducommun (2011). "Identification of N-terminally truncated stable nuclear isoforms of CDC25B that are specifically involved in G2/M checkpoint recovery." Cancer Res **71**(5): 1968-1977.
- Kahlos, K., J. Zhang, E. R. Block and J. M. Patel (2003). "Thioredoxin restores nitric oxide-induced inhibition of protein kinase C activity in lung endothelial cells." Mol Cell Biochem **254**(1-2): 47-54.
- Kaimul, A. M., H. Nakamura, H. Masutani and J. Yodoi (2007). "Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome." Free Radic Biol Med **43**(6): 861-868.
- Kang, S. W., S. G. Rhee, T. S. Chang, W. Jeong and M. H. Choi (2005). "2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications." Trends Mol Med **11**(12): 571-578.
- Kang, T., Y. Wei, Y. Honaker, H. Yamaguchi, E. Appella, M. C. Hung and H. Piwnica-Worms (2008). "GSK-3 beta targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis, and GSK-3 beta inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers." Cancer Cell **13**(1): 36-47.
- Karlsson-Rosenthal, C. and J. B. Millar (2006). "Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery." Trends Cell Biol **16**(6): 285-292.
- Kattan, Z., V. Minig, P. Leroy, M. Dauca and P. Becuwe (2008). "Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells." Breast Cancer Res Treat **108**(2): 203-215.
- Kean, W. F. and I. R. Kean (2008). "Clinical pharmacology of gold." Inflammopharmacology **16**(3): 112-125.
- Kehrer, J. P. and S. S. Biswal (2000). "The molecular effects of acrolein." Toxicol Sci **57**(1): 6-15.
- Kim, A., S. Joseph, A. Khan, C. J. Epstein, R. Sobel and T. T. Huang (2010). "Enhanced expression of mitochondrial superoxide dismutase leads to prolonged in vivo cell cycle progression and up-regulation of mitochondrial thioredoxin." Free Radic Biol Med **48**(11): 1501-1512.
- Kim, A., W. Zhong and T. D. Oberley (2004). "Reversible modulation of cell cycle kinetics in NIH/3T3 mouse fibroblasts by inducible overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase." Antioxid Redox Signal **6**(3): 489-500.
- Kim, S. J., Y. Miyoshi, T. Taguchi, Y. Tamaki, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Kato and S. Noguchi (2005). "High thioredoxin expression is associated with resistance to docetaxel in primary breast cancer." Clin Cancer Res **11**(23): 8425-8430.
- Kim, S. K., J. W. Yang, M. R. Kim, S. H. Roh, H. G. Kim, K. Y. Lee, H. G. Jeong and K. W. Kang (2008). "Increased expression of Nrf2/ARE-dependent anti-oxidant proteins in tamoxifen-resistant breast cancer cells." Free Radic Biol Med **45**(4): 537-546.
- Kirkpatrick, D. L., M. Kuperus, M. Dowdeswell, N. Potier, L. J. Donald, M. Kunkel, M. Berggren, M. Angulo and G. Powis (1998). "Mechanisms of inhibition of the thioredoxin growth factor system by antitumor 2-imidazolyl disulfides." Biochem Pharmacol **55**(7): 987-994.
- Kirkpatrick, D. L., S. Watson, M. Kunkel, S. Fletcher, S. Ulhaq and G. Powis (1999). "Parallel syntheses of disulfide inhibitors of the thioredoxin redox system as potential antitumor agents." Anticancer Drug Des **14**(5): 421-432.
- Kiyokawa, H. and D. Ray (2008). "In vivo roles of CDC25 phosphatases: biological insight into the anti-cancer therapeutic targets." Anticancer Agents Med Chem **8**(8): 832-836.

- Kristjansdottir, K. and J. Rudolph (2004). "Cdc25 phosphatases and cancer." Chem Biol **11**(8): 1043-1051.
- Kumar, B., S. Koul, L. Khandrika, R. B. Meacham and H. K. Koul (2008). "Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype." Cancer Res **68**(6): 1777-1785.
- Kunkel, M. W., D. L. Kirkpatrick, J. I. Johnson and G. Powis (1997). "Cell line-directed screening assay for inhibitors of thioredoxin reductase signaling as potential anti-cancer drugs." Anticancer Drug Des **12**(8): 659-670.
- Kurzawa, L. and M. C. Morris (2010). "Cell-Cycle Markers and Biosensors." Chembiochem.
- Lacombe, F. and F. Belloc (1996). "Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia." Hematol Cell Ther **38**(6): 495-504.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambert, A. J. and M. D. Brand (2009). "Reactive oxygen species production by mitochondria." Methods Mol Biol **554**: 165-181.
- Laoukili, J., M. Stahl and R. H. Medema (2007). "FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer." Biochim Biophys Acta **1775**(1): 92-102.
- Lavecchia, A., C. Di Giovanni and E. Novellino (2009). "CDC25A and B dual-specificity phosphatase inhibitors: potential agents for cancer therapy." Curr Med Chem **16**(15): 1831-1849.
- LeBel, C. P., H. Ischiropoulos and S. C. Bondy (1992). "Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress." Chem Res Toxicol **5**(2): 227-231.
- Lee, B. C., A. Dikiy, H. Y. Kim and V. N. Gladyshev (2009). "Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases." Biochim Biophys Acta **1790**(11): 1471-1477.
- Lee, S. R., K. S. Kwon, S. R. Kim and S. G. Rhee (1998). "Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor." J Biol Chem **273**(25): 15366-15372.
- Lee, S. R., K. S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong and S. G. Rhee (2002). "Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂." J Biol Chem **277**(23): 20336-20342.
- Lee, Y. J., J. H. Kim, J. Chen and J. J. Song (2002). "Enhancement of metabolic oxidative stress-induced cytotoxicity by the thioredoxin inhibitor 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide is mediated through the ASK1-SEK1-JNK1 pathway." Mol Pharmacol **62**(6): 1409-1417.
- Lenton, K. J., H. Therriault and J. R. Wagner (1999). "Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phthalaldehyde." Anal Biochem **274**(1): 125-130.
- Leslie, N. R., D. Bennett, Y. E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray and C. P. Downes (2003). "Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN." Embo J **22**(20): 5501-5510.
- Li, L., L. Jiang, C. Geng, J. Cao and L. Zhong (2008). "The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells." Free Radic Res **42**(4): 354-361.

- Li, N. and T. D. Oberley (1998). "Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-overexpressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle." J Cell Physiol **177**(1): 148-160.
- Lincoln, D. T., E. M. Ali Emadi, K. F. Tonissen and F. M. Clarke (2003). "The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer." Anticancer Res **23**(3B): 2425-2433.
- Lindqvist, A., H. Kallstrom, A. Lundgren, E. Barsoum and C. K. Rosenthal (2005). "Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome." J Cell Biol **171**(1): 35-45.
- Liu, B., Y. Chen and D. K. St Clair (2008). "ROS and p53: a versatile partnership." Free Radic Biol Med **44**(8): 1529-1535.
- Loffler, H., R. G. Syljuasen, J. Bartkova, J. Worm, J. Lukas and J. Bartek (2003). "Distinct modes of deregulation of the proto-oncogenic Cdc25A phosphatase in human breast cancer cell lines." Oncogene **22**(50): 8063-8071.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.
- Lu, J., E. H. Chew and A. Holmgren (2007). "Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(30): 12288-12293.
- Lu, J., L. V. Papp, J. Fang, S. Rodriguez-Nieto, B. Zhivotovsky and A. Holmgren (2006). "Inhibition of Mammalian thioredoxin reductase by some flavonoids: implications for myricetin and quercetin anticancer activity." Cancer Res **66**(8): 4410-4418.
- Ludeman, S. M. (1999). "The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide." Curr Pharm Des **5**(8): 627-643.
- Magda, D. and R. A. Miller (2006). "Motexafin gadolinium: a novel redox active drug for cancer therapy." Semin Cancer Biol **16**(6): 466-476.
- Magherini, F., A. Modesti, L. Bini, M. Puglia, I. Landini, S. Nobili, E. Mini, M. A. Cinellu, C. Gabbiani and L. Messori (2010). "Exploring the biochemical mechanisms of cytotoxic gold compounds: a proteomic study." J Biol Inorg Chem **15**(4): 573-582.
- Mah, L. J., A. El-Osta and T. C. Karagiannis (2010). "gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair." Leukemia **24**(4): 679-686.
- Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek and J. Lukas (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." Embo J **21**(21): 5911-5920.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Marks, P. A. (2006). "Thioredoxin in cancer--role of histone deacetylase inhibitors." Semin Cancer Biol **16**(6): 436-443.
- Marzano, C., V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli and M. P. Rigobello (2007). "Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells." Free Radic Biol Med **42**(6): 872-881.

- Masutani, H., S. Ueda and J. Yodoi (2005). "The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis." Cell Death Differ **12** (1): 991-998.
- Masutani, H., S. Ueda and J. Yodoi (2005). "The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis." Cell Death Differ **12 Suppl 1**: 991-998.
- Matthews, J. R., N. Wakasugi, J. L. Virelizier, J. Yodoi and R. T. Hay (1992). "Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62." Nucleic Acids Res **20**(15): 3821-3830.
- Meng, T. C., D. A. Buckley, S. Galic, T. Tiganis and N. K. Tonks (2004). "Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B." J Biol Chem **279**(36): 37716-37725.
- Meng, T. C., T. Fukada and N. K. Tonks (2002). "Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo." Mol Cell **9**(2): 387-399.
- Milacic, V., D. Fregona and Q. P. Dou (2008). "Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs." Histol Histopathol **23**(1): 101-108.
- Miller, W. H., Jr. (2002). "Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells." Oncologist **7 Suppl 1**: 14-19.
- Miller, W. H., Jr., H. M. Schipper, J. S. Lee, J. Singer and S. Waxman (2002). "Mechanisms of action of arsenic trioxide." Cancer Res **62**(14): 3893-3903.
- Mitchell, D. A., S. U. Morton, N. B. Fernhoff and M. A. Marletta (2007). "Thioredoxin is required for S-nitrosation of procaspase-3 and the inhibition of apoptosis in Jurkat cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(28): 11609-11614.
- Mitozo, P. A., L. F. de Souza, G. Loch-Neckel, S. Flesch, A. F. Maris, C. P. Figueiredo, A. R. Dos Santos, M. Farina and A. L. Dafre (2011). "A study of the relative importance of the peroxiredoxin-, catalase-, and glutathione-dependent systems in neural peroxide metabolism." Free Radic Biol Med **51**(1): 69-77.
- Mukherjee, A. and S. G. Martin (2008). "The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells." Br J Radiol **81 Spec No 1**: S57-68.
- Mukherjee, A., A. D. Westwell, T. D. Bradshaw, M. F. Stevens, J. Carmichael and S. G. Martin (2005). "Cytotoxic and antiangiogenic activity of AW464 (NSC 706704), a novel thioredoxin inhibitor: an in vitro study." Br J Cancer **92**(2): 350-358.
- Mustacich, D. and G. Powis (2000). "Thioredoxin reductase." Biochem J **346**(1): 1-8.
- Myers, C. R. and J. M. Myers (2009). "The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells." Toxicology **257**(1-2): 95-104.
- Myers, J. M., W. E. Antholine and C. R. Myers (2008). "Hexavalent chromium causes the oxidation of thioredoxin in human bronchial epithelial cells." Toxicology **246**(2-3): 222-233.
- Myers, J. M. and C. R. Myers (2009). "The effects of hexavalent chromium on thioredoxin reductase and peroxiredoxins in human bronchial epithelial cells." Free Radic Biol Med **47**(10): 1477-1485.
- Nadeau, P. J., S. J. Charette, M. B. Toledano and J. Landry (2007). "Disulfide Bond-mediated multimerization of Ask1 and its reduction by thioredoxin-1 regulate H₂O₂-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis." Mol Biol Cell **18**(10): 3903-3913.

- Nakamura, H., Y. Hoshino, H. Okuyama, Y. Matsuo and J. Yodoi (2009). "Thioredoxin 1 delivery as new therapeutics." Adv Drug Deliv Rev **61**(4): 303-309.
- Nakashima, I., K. Takeda, Y. Kawamoto, Y. Okuno, M. Kato and H. Suzuki (2005). "Redox control of catalytic activities of membrane-associated protein tyrosine kinases." Arch Biochem Biophys **434**(1): 3-10.
- Nalvarte, I., A. E. Damdimopoulos, C. Nystom, T. Nordman, A. Miranda-Vizuete, J. M. Olsson, L. Eriksson, M. Bjornstedt, E. S. Arner and G. Spyrou (2004). "Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation." J Biol Chem **279**(52): 54510-54517.
- Natsuyama, S., Y. Noda, M. Yamashita, Y. Nagahama and T. Mori (1993). "Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block." Biochim Biophys Acta **1176**(1-2): 90-94.
- Neumann, C. A., J. Cao and Y. Manevich (2009). "Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling." Cell Cycle **8**(24): 4072-4078.
- Nobili, S., E. Mini, I. Landini, C. Gabbiani, A. Casini and L. Messori (2010). "Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies." Med Res Rev **30**(3): 550-580.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." Free Radic Biol Med **31**(11): 1287-1312.
- Nordberg, J., L. Zhong, A. Holmgren and E. S. Arner (1998). "Mammalian thioredoxin reductase is irreversibly inhibited by dinitrohalobenzenes by alkylation of both the redox active selenocysteine and its neighboring cysteine residue." J Biol Chem **273**(18): 10835-10842.
- Oakley, F. D., D. Abbott, Q. Li and J. F. Engelhardt (2009). "Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes." Antioxid Redox Signal **11**(6): 1313-1333.
- Oberley, L. W. (2005). "Mechanism of the tumor suppressive effect of MnSOD overexpression." Biomed Pharmacother **59**(4): 143-148.
- Olovnikov, I. A., J. E. Kravchenko and P. M. Chumakov (2009). "Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense." Semin Cancer Biol **19**(1): 32-41.
- Omata, Y., M. Folan, M. Shaw, R. L. Messer, P. E. Lockwood, D. Hobbs, S. Bouillaguet, H. Sano, J. B. Lewis and J. C. Wataha (2006). "Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1)." Toxicol In Vitro **20**(6): 882-890.
- Opara, E. C. (2006). "Oxidative stress." Dis Mon **52**(5): 183-198.
- Ough, M., A. Lewis, Y. Zhang, M. M. Hinkhouse, J. M. Ritchie, L. W. Oberley and J. J. Cullen (2004). "Inhibition of cell growth by overexpression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in human pancreatic carcinoma." Free Radic Res **38**(11): 1223-1233.
- Park, H., Y. J. Bahn, S. K. Jung, D. G. Jeong, S. H. Lee, I. Seo, T. S. Yoon, S. J. Kim and S. E. Ryu (2008). "Discovery of novel Cdc25 phosphatase inhibitors with micromolar activity based on the structure-based virtual screening." J Med Chem **51**(18): 5533-5541.

- Park, Y. S., Y. Misonou, N. Fujiwara, M. Takahashi, Y. Miyamoto, Y. H. Koh, K. Suzuki and N. Taniguchi (2005). "Induction of thioredoxin reductase as an adaptive response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **327**(4): 1058-1065.
- Patel, B. P., U. M. Rawal, T. K. Dave, R. M. Rawal, S. N. Shukla, P. M. Shah and P. S. Patel (2007). "Lipid peroxidation, total antioxidant status, and total thiol levels predict overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma." Integr Cancer Ther **6**(4): 365-372.
- Pelicano, H., D. Carney and P. Huang (2004). "ROS stress in cancer cells and therapeutic implications." Drug Resist Updat **7**(2): 97-110.
- Pereg, Y., B. Y. Liu, K. M. O'Rourke, M. Sagolla, A. Dey, L. Komuves, D. M. French and V. M. Dixit (2010). "Ubiquitin hydrolase Dub3 promotes oncogenic transformation by stabilizing Cdc25A." Nat Cell Biol **12**(4): 400-406.
- Powis, G. and D. L. Kirkpatrick (2007). "Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy." Curr Opin Pharmacol **7**(4): 392-397.
- Prast-Nielsen, S., M. Cebula, I. Pader and E. S. Arner (2010). "Noble metal targeting of thioredoxin reductase-covalent complexes with thioredoxin and thioredoxin-related protein of 14 kDa triggered by cisplatin." Free Radic Biol Med **49**(11): 1765-1778.
- Rackham, O., A. M. Shearwood, R. Thyer, E. McNamara, S. M. Davies, B. A. Callus, A. Miranda-Vizuete, S. J. Berners-Price, Q. Cheng, E. S. Arner and A. Filipovska (2011). "Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors." Free Radic Biol Med **50**(6): 689-699.
- Raffel, J., A. K. Bhattacharyya, A. Gallegos, H. Cui, J. G. Einspahr, D. S. Alberts and G. Powis (2003). "Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival." J Lab Clin Med **142**(1): 46-51.
- Ralph, S. J., S. Rodriguez-Enriquez, J. Neuzil, E. Saavedra and R. Moreno-Sanchez (2010). "The causes of cancer revisited: "mitochondrial malignancy" and ROS-induced oncogenic transformation - why mitochondria are targets for cancer therapy." Mol Aspects Med **31**(2): 145-170.
- Ramanathan, R. K., J. Abbruzzese, T. Dragovich, L. Kirkpatrick, J. M. Guillen, A. F. Baker, L. A. Pestano, S. Green and D. D. Von Hoff (2010). "A randomized phase II study of PX-12, an inhibitor of thioredoxin in patients with advanced cancer of the pancreas following progression after a gemcitabine-containing combination." Cancer Chemother Pharmacol.
- Ramanathan, R. K., D. L. Kirkpatrick, C. P. Belani, D. Friedland, S. B. Green, H. H. Chow, C. A. Cordova, S. P. Stratton, E. R. Sharlow, A. Baker and T. Dragovich (2007). "A Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of PX-12, a novel inhibitor of thioredoxin-1, in patients with advanced solid tumors." Clin Cancer Res **13**(7): 2109-2114.
- Ray, D. and H. Kiyokawa (2008). "CDC25A phosphatase: a rate-limiting oncogene that determines genomic stability." Cancer Res **68**(5): 1251-1253.
- Ray, D., Y. Terao, P. G. Fuhrken, Z. Q. Ma, F. J. DeMayo, K. Christov, N. A. Heerema, R. Franks, S. Y. Tsai, E. T. Papoutsakis and H. Kiyokawa (2007). "Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability." Cancer Res **67**(3): 984-991.
- Ray, G., S. Batra, N. K. Shukla, S. Deo, V. Raina, S. Ashok and S. A. Husain (2000). "Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **59**(2): 163-170.

- Reichheld, J. P., M. Khafif, C. Riondet, M. Droux, G. Bonnard and Y. Meyer (2007). "Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in Arabidopsis development." Plant Cell **19**(6): 1851-1865.
- Reinhardt, H. C. and M. B. Yaffe (2009). "Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2." Curr Opin Cell Biol **21**(2): 245-255.
- Rhee, S. G. (2006). "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling." Science **312**(5782): 1882-1883.
- Rhee, S. G., H. Z. Chae and K. Kim (2005). "Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling." Free Radic Biol Med **38**(12): 1543-1552.
- Rhee, S. G., W. Jeong, T. S. Chang and H. A. Woo (2007). "Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance." Kidney Int Suppl(106): S3-8.
- Rhee, S. G., S. W. Kang, W. Jeong, T. S. Chang, K. S. Yang and H. A. Woo (2005). "Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins." Curr Opin Cell Biol **17**(2): 183-189.
- Rhee, S. G., K. S. Yang, S. W. Kang, H. A. Woo and T. S. Chang (2005). "Controlled elimination of intracellular H₂O₂: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 619-626.
- Ridnour, L. A., T. D. Oberley and L. W. Oberley (2004). "Tumor suppressive effects of MnSOD overexpression may involve imbalance in peroxide generation versus peroxide removal." Antioxid Redox Signal **6**(3): 501-512.
- Rigobello, M. P., A. Folda, M. C. Baldoin, G. Scutari and A. Bindoli (2005). "Effect of auranofin on the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Role of thioredoxin reductase." Free Radic Res **39**(7): 687-695.
- Rigobello, M. P., A. Folda, B. Dani, R. Menabo, G. Scutari and A. Bindoli (2008). "Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells." Eur J Pharmacol **582**(1-3): 26-34.
- Rigobello, M. P., V. Gandin, A. Folda, A. K. Rundlof, A. P. Fernandes, A. Bindoli, C. Marzano and M. Bjornstedt (2009). "Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift." Free Radic Biol Med **47**(6): 710-721.
- Rigobello, M. P., G. Scutari, R. Boscolo and A. Bindoli (2002). "Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative." Br J Pharmacol **136**(8): 1162-1168.
- Rigobello, M. P., G. Scutari, A. Folda and A. Bindoli (2004). "Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c." Biochem Pharmacol **67**(4): 689-696.
- Ronconi, L., L. Giovagnini, C. Marzano, F. Bettio, R. Graziani, G. Pilloni and D. Fregona (2005). "Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity." Inorg Chem **44**(6): 1867-1881.

- Ronconi, L., C. Marzano, P. Zanello, M. Corsini, G. Miolo, C. Macca, A. Trevisan and D. Fregona (2006). "Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties." J Med Chem **49**(5): 1648-1657.
- Ross, D. D., C. C. Joneckis, J. V. Ordonez, A. M. Sisk, R. K. Wu, A. W. N. R. E. Hamburger and R. E. Nora (1989). "Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number." Cancer Res **49**(14): 3776-3782.
- Rudolph, J. (2005). "Redox regulation of the Cdc25 phosphatases." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 761-767.
- Rudolph, J. (2007). "Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism." Biochemistry **46**(12): 3595-3604.
- Ryter, S. W., H. P. Kim, A. Hoetzel, J. W. Park, K. Nakahira, X. Wang and A. M. Choi (2007). "Mechanisms of cell death in oxidative stress." Antioxid Redox Signal **9**(1): 49-89.
- Saitoh, M., H. Nishitoh, M. Fujii, K. Takeda, K. Tobiume, Y. Sawada, M. Kawabata, K. Miyazono and H. Ichijo (1998). "Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1." Embo J **17**(9): 2596-2606.
- Salmeen, A. and D. Barford (2005). "Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases." Antioxid Redox Signal **7**(5-6): 560-577.
- Sanchez, I. and B. D. Dynlacht (2005). "New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control." Semin Cell Dev Biol **16**(3): 311-321.
- Sandalova, T., L. Zhong, Y. Lindqvist, A. Holmgren and G. Schneider (2001). "Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(17): 9533-9538.
- Sanmartin-Suarez, C., R. Soto-Otero, I. Sanchez-Sellero and E. Mendez-Alvarez (2011). "Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants." J Pharmacol Toxicol Methods **63**(2): 209-215.
- Sato, Y., H. Sasaki, S. Kondo, I. Fukai, M. Kiriya, Y. Yamakawa and Y. Fujii (2001). "Expression of the cdc25B mRNA correlated with that of N-myc in neuroblastoma." Jpn J Clin Oncol **31**(9): 428-431.
- Savitsky, P. A. and T. Finkel (2002). "Redox regulation of Cdc25C." J Biol Chem **277**(23): 20535-20540.
- Schumacker, P. T. (2006). "Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword." Cancer Cell **10**(3): 175-176.
- Seyfried, J. and U. Wullner (2007). "Inhibition of thioredoxin reductase induces apoptosis in neuronal cell lines: role of glutathione and the MKK4/JNK pathway." Biochem Biophys Res Commun **359**(3): 759-764.
- Shao, L., M. B. Diccianni, T. Tanaka, R. Gribi, A. L. Yu, J. D. Pullen, B. M. Camitta and J. Yu (2001). "Thioredoxin expression in primary T-cell acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic implication." Cancer Res **61**(19): 7333-7338.
- Sohn, J. and J. Rudolph (2003). "Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction." Biochemistry **42**(34): 10060-10070.

- Soule, H. D., J. Vazquez, A. Long, S. Albert and M. Brennan (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-1416.
- Stevens, J. F. and C. S. Maier (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." Mol Nutr Food Res **52**(1): 7-25.
- Sun, J. P., W. Q. Wang, H. Yang, S. Liu, F. Liang, A. A. Fedorov, S. C. Almo and Z. Y. Zhang (2005). "Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion." Biochemistry **44**(36): 12009-12021.
- Szadkowski, A. and C. R. Myers (2008). "Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells." Toxicology **243**(1-2): 164-176.
- Takemasa, I., H. Yamamoto, M. Sekimoto, M. Ohue, S. Noura, Y. Miyake, T. Matsumoto, T. Aihara, N. Tomita, Y. Tamaki, I. Sakita, N. Kikkawa, N. Matsuura, H. Shiozaki and M. Monden (2000). "Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma." Cancer Res **60**(11): 3043-3050.
- Tas, F., H. Hansel, A. Belce, S. Ilvan, A. Argon, H. Camlica and E. Topuz (2005). "Oxidative stress in breast cancer." Med Oncol **22**(1): 11-15.
- Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf and I. Hoffmann (2010). "Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition." J Biol Chem **285**(22): 16978-16990.
- Tonissen, K. F. and G. Di Trapani (2009). "Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy." Mol Nutr Food Res **53**(1): 87-103.
- Toyokuni, S., K. Okamoto, J. Yodoi and H. Hiai (1995). "Persistent oxidative stress in cancer." FEBS Lett **358**(1): 1-3.
- Trachootham, D., J. Alexandre and P. Huang (2009). "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?" Nat Rev Drug Discov **8**(7): 579-591.
- Trachootham, D., W. Lu, M. A. Ogasawara, R. D. Nilsa and P. Huang (2008). "Redox regulation of cell survival." Antioxid Redox Signal **10**(8): 1343-1374.
- Tsao, S. M., M. C. Yin and W. H. Liu (2007). "Oxidant stress and B vitamins status in patients with non-small cell lung cancer." Nutr Cancer **59**(1): 8-13.
- Turowski, P., C. Franckhauser, M. C. Morris, P. Vaglio, A. Fernandez and N. J. Lamb (2003). "Functional cdc25C dual-specificity phosphatase is required for S-phase entry in human cells." Mol Biol Cell **14**(7): 2984-2998.
- Ueda, S., H. Masutani, H. Nakamura, T. Tanaka, M. Ueno and J. Yodoi (2002). "Redox control of cell death." Antioxid Redox Signal **4**(3): 405-414.
- Ueno, M., H. Masutani, R. J. Arai, A. Yamauchi, K. Hirota, T. Sakai, T. Inamoto, Y. Yamaoka, J. Yodoi and T. Nikaido (1999). "Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation." J Biol Chem **274**(50): 35809-35815.
- Urig, S. and K. Becker (2006). "On the potential of thioredoxin reductase inhibitors for cancer therapy." Semin Cancer Biol **16**(6): 452-465.

- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur and J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." Int J Biochem Cell Biol **39**(1): 44-84.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Veal, E. A., A. M. Day and B. A. Morgan (2007). "Hydrogen peroxide sensing and signaling." Mol Cell **26**(1): 1-14.
- Venkataraman, S., X. Jiang, C. Weydert, Y. Zhang, H. J. Zhang, P. C. Goswami, J. M. Ritchie, L. W. Oberley and G. R. Buettner (2005). "Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells." Oncogene **24**(1): 77-89.
- Vergara, E., A. Casini, F. Sorrentino, O. Zava, E. Cerrada, M. P. Rigobello, A. Bindoli, M. Laguna and P. J. Dyson (2010). "Anticancer therapeutics that target selenoenzymes: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and thioredoxin reductase inhibition of a series of gold(I) complexes containing hydrophilic phosphine ligands." ChemMedChem **5**(1): 96-102.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele and Z. N. Berneman (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.
- Viallard, J. F., F. Lacombe, F. Belloc, J. L. Pellegrin and J. Reiffers (2001). "Molecular mechanisms controlling the cell cycle: fundamental aspects and implications for oncology." Cancer Radiother **5**(2): 109-129.
- Viry, E., E. Battaglia, V. Deborde, T. Muller, R. Reau, E. Davioud-Charvet and D. Bagrel (2008). "A sugar-modified phosphole gold complex with antiproliferative properties acting as a thioredoxin reductase inhibitor in MCF-7 cells." ChemMedChem **3**(11): 1667-1670.
- Vogt, A., K. Tamura, S. Watson and J. S. Lazo (2000). "Antitumor imidazolyl disulfide IV-2 causes irreversible G(2)/M cell cycle arrest without hyperphosphorylation of cyclin-dependent kinase Cdk1." J Pharmacol Exp Ther **294**(3): 1070-1075.
- Voulgaridou, G. P., I. Anastopoulos, R. Franco, M. I. Panayiotidis and A. Pappa (2011). "DNA damage induced by endogenous aldehydes: current state of knowledge." Mutat Res **711**(1-2): 13-27.
- Wang, D. and S. J. Lippard (2005). "Cellular processing of platinum anticancer drugs." Nat Rev Drug Discov **4**(4): 307-320.
- Wang, L., Y. Sun, M. Asahi and K. Otsu (2011). "Acrolein, an Environmental Toxin, Induces Cardiomyocyte Apoptosis via Elevated Intracellular Calcium and Free Radicals." Cell Biochem Biophys.
- Wang, Z., C. G. Trope, V. A. Florenes, Z. Suo, J. M. Nesland and R. Holm (2010). "Overexpression of CDC25B, CDC25C and phospho-CDC25C (Ser216) in vulvar squamous cell carcinomas are associated with malignant features and aggressive cancer phenotypes." BMC Cancer **10**: 233.
- Watson, W. H., J. M. Heilman, L. L. Hughes and J. C. Spielberger (2008). "Thioredoxin reductase-1 knock down does not result in thioredoxin-1 oxidation." Biochem Biophys Res Commun **368**(3): 832-836.
- Watson, W. H., J. Pohl, W. R. Montfort, O. Stuchlik, M. S. Reed, G. Powis and D. P. Jones (2003). "Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif." J Biol Chem **278**(35): 33408-33415.

- Welsh, S. J., W. T. Bellamy, M. M. Briehl and G. Powis (2002). "The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis." Cancer Res **62**(17): 5089-5095.
- Welsh, S. J., R. R. Williams, A. Birmingham, D. J. Newman, D. L. Kirkpatrick and G. Powis (2003). "The thioredoxin redox inhibitors 1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide and pleurotin inhibit hypoxia-induced factor 1alpha and vascular endothelial growth factor formation." Mol Cancer Ther **2**(3): 235-243.
- Winterbourn, C. C. and M. B. Hampton (2008). "Thiol chemistry and specificity in redox signaling." Free Radic Biol Med **45**(5): 549-561.
- Witte, A. B., K. Anestel, E. Jerremalm, H. Ehrsson and E. S. Arner (2005). "Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds." Free Radic Biol Med **39**(5): 696-703.
- Wondrak, G. T. (2009). "Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities." Antioxid Redox Signal **11**(12): 3013-3069.
- Woo, H. A., S. H. Yim, D. H. Shin, D. Kang, D. Y. Yu and S. G. Rhee (2010). "Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H(2)O(2) accumulation for cell signaling." Cell **140**(4): 517-528.
- Wu, C. C., C. W. Hsieh, P. H. Lai, J. B. Lin, Y. C. Liu and B. S. Wung (2006). "Upregulation of endothelial heme oxygenase-1 expression through the activation of the JNK pathway by sublethal concentrations of acrolein." Toxicol Appl Pharmacol **214**(3): 244-252.
- Wu, W., Y. H. Fan, B. L. Kemp, G. Walsh and L. Mao (1998). "Overexpression of cdc25A and cdc25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc." Cancer Res **58**(18): 4082-4085.
- Xing, X., J. Chen and M. Chen (2008). "Expression of CDC25 phosphatases in human gastric cancer." Dig Dis Sci **53**(4): 949-953.
- Yamada, M., A. Tomida, H. Yoshikawa, Y. Taketani and T. Tsuruo (1996). "Increased expression of thioredoxin/adult T-cell leukemia-derived factor in cisplatin-resistant human cancer cell lines." Clin Cancer Res **2**(2): 427-432.
- Yamada, M., A. Tomida, H. Yoshikawa, Y. Taketani and T. Tsuruo (1997). "Overexpression of thioredoxin does not confer resistance to cisplatin in transfected human ovarian and colon cancer cell lines." Cancer Chemother Pharmacol **40**(1): 31-37.
- Yang, X., X. Wu, Y. E. Choi, J. C. Kern and J. P. Kehrer (2004). "Effect of acrolein and glutathione depleting agents on thioredoxin." Toxicology **204**(2-3): 209-218.
- Yokomizo, A., M. Ono, H. Nanri, Y. Makino, T. Ohga, M. Wada, T. Okamoto, J. Yodoi, M. Kuwano and K. Kohno (1995). "Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide." Cancer Res **55**(19): 4293-4296.
- Yu, C. X., S. Li and A. R. Whorton (2005). "Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols." Mol Pharmacol **68**(3): 847-854.
- Yu, L., U. Kelly, J. N. Ebright, G. Malek, P. Saloupis, D. W. Rickman, B. S. McKay, V. Y. Arshavsky and C. Bowes Rickman (2007). "Oxidative stress-induced expression and modulation of Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1) in mammalian retina." Biochim Biophys Acta **1773**(9): 1473-1482.

Zhang, B., Y. Wang and Y. Su (2009). "Peroxiredoxins, a novel target in cancer radiotherapy." Cancer Lett **286**(2): 154-160.

Zhou, Y., E. O. Hileman, W. Plunkett, M. J. Keating and P. Huang (2003). "Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents." Blood **101**(10): 4098-4104.

Publications

ARTICLE 1

Available online at www.sciencedirect.comBioorganic &
Medicinal
Chemistry
Letters

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 1102–1105

Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin

Adeline Beillerot, Juan-Carlos Rodríguez Domínguez, Gilbert Kirsch and Denyse Bagrel^{*}

*Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, Université Paul Verlaine – Metz,
Institut Jean Barriol FR CNRS 2843, UFR SciFA, Campus Bridoux, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France*

Received 18 October 2007; revised 2 December 2007; accepted 3 December 2007

Available online 27 December 2007

Abstract—The use of doxorubicin (DOX) in the treatment of solid tumors is limited by cardiotoxicity essentially due to oxidative stress generation. The aim of this study was to identify coumarin derivatives displaying a protective antioxidant activity without affecting DOX antitumoral efficiency. A set of eighteen coumarinic derivatives was synthesized. Their antioxidant power was evaluated *in vitro* with the FRAP (ferric reducing ability of plasma) method and in human breast adenocarcinoma MCF7 cells using H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) in a cytometric analysis. 4-Methyl-7,8-dihydroxycoumarin was found to exhibit an important antioxidant strength, a low cytotoxicity, and could decrease ROS (reactive oxygen species) production generated by DOX treatment without affecting DOX cytotoxicity in MCF7 cells.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Coumarins are a vast group of natural compounds essentially found in green plants. As substitutions can occur at any of the six available sites of their basic molecular moiety (1,2-benzopyrone), these compounds are extremely variable in structure. This structural diversity leads to compounds displaying multiple biological properties that promote human health and help reducing the risk of diseases. In a recent review, Kostova¹ reports that coumarin itself and 7-hydroxycoumarin have provided evidence of *in vitro* antiproliferative and *in vivo* antitumor activities. Moreover, coumarins possess, among others, anti-oxidant activities, probably due to their structural analogy with flavonoids and benzophenones.² Indeed, this structure type could bind transition metal ions, such as Fe(III), and thus inhibit hydroxyl radical and hydrogen peroxide formation produced by Fenton's reactions. Furthermore, their hydroxy functions are potent H[•] donors for free radical acceptors, due to electron delocalization across the molecule.^{3,4} Thus, coumarin derivatives could be potent ROS scavengers and metal chelating agents. A large number of structurally novel coumarin derivatives have been synthesized in order to improve this antioxidant activity.

Doxorubicin (DOX), an anthracycline antibiotic, is a potent chemotherapeutic agent, often used in the treatment of solid tumors, especially breast and ovarian cancer. However, its therapeutic use is limited by its cardiotoxicity. DOX-induced cardiomyopathy mechanisms are not completely understood but they include formation of oxygen free radicals.⁵ The semiquinone form, produced by the DOX reduction by several endogenous enzymes, generates superoxide radicals which rapidly generate other ROS species, such as hydroxyl radical and hydrogen peroxide; these radicals are able to induce apoptosis in cardiomyocytes.⁶ Several strategies, which decrease ROS quantity, have been studied to reduce the cardiac toxicity of anthracyclines without affecting their therapeutic efficacy. Different antioxidants such as vitamins A, E, and C, probucol or *N*-acetylcystein, and *S*-allylcystein do not interfere with anthracycline activity in tumor cells but their cardioprotective efficacy was limited.⁷ The iron chelator ICRF-187 was found to be effective against DOX cardiotoxicity but its use is limited by a hematological toxicity.⁸ Flavonoids have also showed cardioprotective effects⁹ but it is well established that there is, at the moment, no universal ideal antioxidant.

The purpose of this study was to investigate the antioxidant effects of some known and new coumarin derivatives on oxidative stress induced by DOX in MCF7 cells.

Keywords: Coumarins; Organic synthesis; Oxidative stress; Breast cancer.

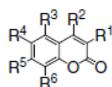
^{*}Corresponding author. Tel.: +33 387378404; fax: +33 387378423; e-mail: bagrel@univ-metz.fr

0960-894X/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmcl.2007.12.004

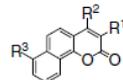
The synthesis of these compounds was carried out as described earlier using sulfated zirconia (compounds 1–5)¹⁰ or zirconyl chloride octahydrate (compounds 6–9)¹¹ as catalysts. Compound 10 was synthesized in 69% yield in the same manner as 6–9.¹²

Preparations of 11 and 12 were carried out using 3 as starting material; in the first case as reported by Campos et al. with results matching those reported in the literature.¹³ In the second one, previous acetylation of the hydroxy groups of 3¹⁴ allowed us to obtain the diacetyl derivative (3a) in 58.4% yield. Subsequent substitution of chlorine by the mercaptan group gave 12 in 38.8%¹⁵ yield.

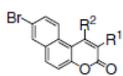
New compounds 13–15, 17, and 18 were prepared by the classical Pechmann's reaction¹⁶ from the corresponding naphthol derivatives with yields between 25 and 85%,¹⁷ while 16¹⁸ was prepared in 97% yield from 13 by the procedure of Campos et al.¹³



- 1: R¹, R³, R⁴, R⁶ = H; R² = CH₃; R⁵ = OH
- 2: R¹, R³, R⁴ = H; R² = CH₃; R⁵, R⁶ = OH
- 3: R¹, R³, R⁴ = H; R² = CH₂Cl; R⁵, R⁶ = OH
- 4: R¹ = Cl; R² = CH₃; R³, R⁴ = H; R⁵, R⁶ = OH
- 5: R¹, R⁴, R⁶ = H; R² = CH₃; R³, R⁵ = OH
- 6: R¹, R⁴, R⁶ = H; R² = CH₂Cl; R³, R⁵ = OH
- 7: R¹ = Cl; R² = CH₃; R³, R⁵ = OH; R⁴, R⁶ = H
- 8: R¹, R³, R⁴ = H; R² = CH₃; R⁵ = OH; R⁶ = COOH
- 9: R¹, R³, R⁵, R⁶ = H; R² = CH₃; R⁴ = OCH₃
- 10: R¹, R⁴ = H; R² = CH₃; R³, R⁵ = OH; R⁶ = COOCH₃
- 11: R¹, R³, R⁴ = H; R² = CH₂OH; R⁵, R⁶ = OH
- 12: R¹, R³, R⁴ = H; R² = CH₂S(CH₂)₁₁CH₃; R⁵, R⁶ = OCOCH₃



- 13: R¹, R³ = H; R² = CH₂Cl
- 14: R¹ = H; R² = CH₂Cl; R³ = OH
- 15: R¹, R³ = H; R² = CH₂S(CH₂)₁₁CH₃
- 16: R¹, R³ = H; R² = CH₂OH



- 17: R¹ = H; R² = CH₂Cl
- 18: R¹ = H; R² = Ph

First, these eighteen compounds were characterized for their antioxidative strength and for their cytotoxicity. Their ability to reduce ferric ions in vitro (FRAP test)¹⁹ was compared to that of Trolox, used as reference. Only four derivatives, 2, 3, 4, and 11, were more potent than Trolox, with, respectively, 4.52 ± 0.13 ; 5.53 ± 0.13 ; 5.76 ± 0.04 ; 5.19 ± 0.21 FRAP units (moles of Fe²⁺ produced by mole of compound) versus 1.84 ± 0.06 for Trolox (Fig. 1a).

These results were confirmed by assessing the ROS production in MCF7 cells by flow cytometric analysis using

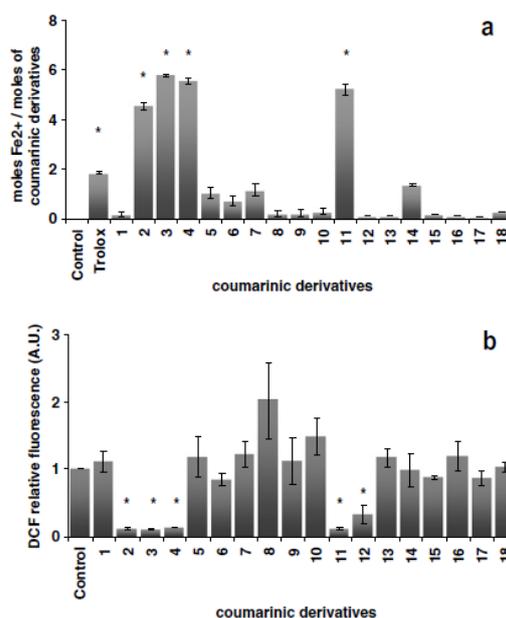


Figure 1. Antioxidant power of coumarinic derivatives. Antioxidant strength of coumarinic derivatives was evaluated, in vitro, with FRAP method (a) and, in MCF7 cells, by intracellular ROS detection using H₂DCFDA detection by flow cytometry (b). (b) MCF7 cells were treated for 24 h with the compounds at the concentration of 100 μM. The final DMSO concentration (0.5% v/v) was the same in all treatments. *Significant differences between control and treated samples: $P < 0.05$, ($n = 3$).

H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate).²⁰ Five compounds, 2, 3, 4, 11, and 12, used at the concentration of 100 μM for 24 h, were able to significantly reduce (more than 3-fold) the H₂O₂ production in these cells (Fig. 1b).

Interestingly, derivative 12 did not show in vitro antioxidant properties whereas it displayed this activity in MCF7 cells. We postulate that it could be metabolized by intracellular enzymes to an active antioxidant form. Indeed, the OCOCH₃ functions in R₅ and R₆ positions could be cleaved in hydroxy functions which seem to be more reactive with ROS. Hoult and Paya²¹ have shown that 7,8-dihydroxy coumarinic derivatives can trap superoxide radical. Our experiments confirm these results because the most active compounds of our series, 2, 3, 4, and 11, bear this 7,8-dihydroxy function. Moreover, we synthesized a derivative of 12 in which the two OCOCH₃ functions in R₅ and R₆ were replaced by hydroxy groups. Using the FRAP method, this compound displayed an antioxidant power comparable to Trolox (1.88 ± 0.08 for the derivative of 12).

Next, the cytotoxicity of the antioxidant compounds previously identified was tested in MCF7 cells using a flow cytometric analysis with H₂DCFDA and PI (propidium iodide). PI is a polar, highly fluorescent (red color) compound which can only enter cells that lack membrane integrity. H₂DCFDA is nonpolar and enters via-

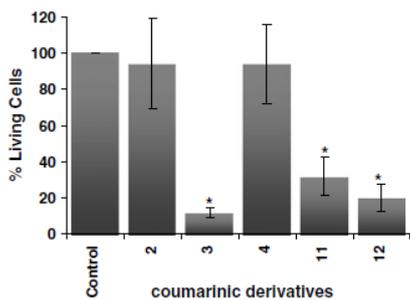


Figure 2. Cytotoxicity of antioxidant coumarinic derivatives. MCF7 cells were treated for 24 h with coumarinic derivatives at the concentration of 100 μ M. Cells were stained by PI (propidium iodide) and H₂DCFDA. The viability was assessed by flow cytometry. The final DMSO concentration (0.5% v/v) was the same in all treatments. *Significant differences between control and treated cells: $P < 0.05$; $n = 3$.

ble cells freely where it is converted to fluorescent dichlorofluorescein (green color). Thus, when using both substances, viable cells are identified with a high green and a low red fluorescence.²² Figure 2 shows that 3, 11, and 12 used at the concentration of 100 μ M for 24 h, led to nearly 70% of cell death, while 2 and 4 were poorly cytotoxic. Thus, 2 and 4 could be selected for further studies, and 2 was chosen because of its easy synthesis.

In the second part of this biological evaluation, we tested the protective potential of 2 against oxidative stress induced by doxorubicin (DOX) in MCF7 cells. At the concentration of 5 μ M (IC₅₀), DOX generated a significant production of ROS in MCF7 cells treated for 24 h. A pre-treatment with 2 at the concentration of 25 μ M lowered the ROS levels generated by DOX to that of control cells (Fig. 3). This effect was not obvious with short treatments (up to 12 h). This protective

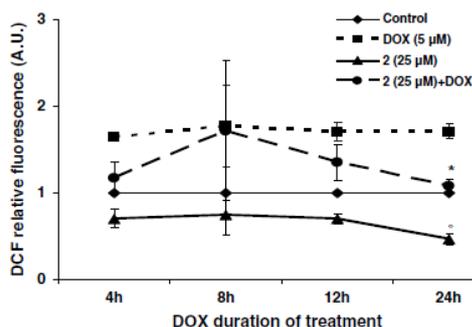


Figure 3. Effects of DOX and 2 on ROS generation in MCF7 cells. The cells were pre-treated with compound 2 at the concentration of 25 μ M for 24 h and then DOX at the concentration of 5 μ M (IC₅₀) was added for the indicated times. Cells were stained with H₂DCFDA and analyzed by flow cytometry. *Significant differences between DOX and 2 + DOX treated cells: $P < 0.002$; $n = 3$. °Significant differences between control and 2 treated cells: $P < 0.05$; $n = 3$.

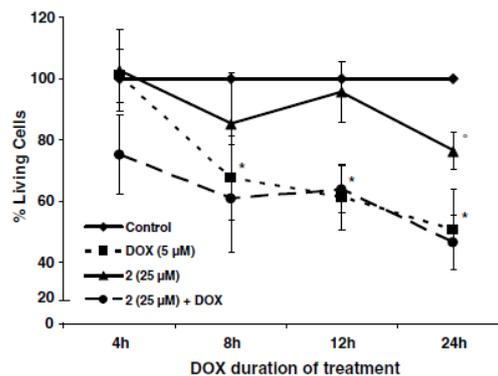


Figure 4. DOX and 2 toxicity in MCF7 cells. Cell viability was assessed by flow cytometry with PI and H₂DCFDA. Significant differences between control and treated cells: * $P < 0.002$, ° $P < 0.05$; $n = 3$.

action of 2 was also shown in similar experiments using H₂O₂ instead of DOX (not shown).

Finally, as several mechanisms, including oxidative stress, underlie DOX efficacy in cancer treatments, it was important to know if the antioxidant properties of 2 were able to impair DOX toxicity in MCF7 cells. Figure 4 shows that it is not the case from a 12-h treatment.

In conclusion, the new coumarinic derivative 2 was synthesized and characterized in this work. This compound displayed evident antioxidant properties which were evaluated in vitro and in MCF7 cells. Interestingly, this compound was able to reduce the oxidative stress induced by DOX in the cancerous MCF7 cells without affecting the cytotoxic efficacy of this anthracycline. Further studies are needed to evaluate the protective effects of 2 in non-cancerous cells, and especially in cardiac cells, in order to determine its relevance as an adjuvant in DOX treatments.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comités de Moselle, de Meurthe & Moselle et de Meuse) and the Conseil Régional de Lorraine. A.B. is recipient of a fellowship provided by the Ligue contre le Cancer (Comité de Moselle).

References and notes

- Kostova, I. *Curr. Med. Chem. AntiCancer Agents* **2005**, *5*, 29.
- Farombi, E. O.; Nwaokefor, I. A. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2005**, *32*, 667.
- Sharma, S. D.; Rajor, H. K.; Chopra, S.; Sharma, R. K. *Biomaterials* **2005**, *18*, 143.
- Martins, H. F.; Leal, J. P.; Fernandez, M. T.; Lopes, V. H.; Cordeiro, M. N. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 848.

5. Takemura, G.; Fujiwara, H. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **2007**, *49*, 330.
6. Menna, P.; Minotti, G.; Salvatorelli, E. *Cell. Biol. Toxicol.* **2007**, *23*, 49.
7. Minotti, G.; Menna, P.; Salvatorelli, E.; Cairo, G.; Gianni, L. *Pharmacol. Rev.* **2004**, *56*, 185.
8. Speyer, J. L.; Green, M. D.; Zeleniuch-Jacquotte, A.; Wernz, J. C.; Rey, M.; Sanger, J.; Kramer, E.; Ferrans, V.; Hochster, H.; Meyers, M., et al. *J. Clin. Oncol.* **1992**, *10*, 117.
9. Van Acker, F. A.; Hulshof, J. W.; Haenen, G. R.; Menge, W. M.; Van der Vijgh, W. J.; Bast, A. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 31.
10. Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 3279.
11. Rodríguez-Domínguez, J. C.; Kirsch, G. *Synthesis* **2006**, 1895.
12. 5,7-Dihydroxy-4-methyl-2-oxo-2H-1-benzopyran-8-carboxylic acid methyl ester (**10**): Yield: 68%, mp 225–226 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 12.35 (s, 1H, OH), 10.96 (s, 1H, OH), 6.28 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.4 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 170.78, 162.15, 162.10, 159.60, 159.05, 155.12, 110.75, 102.80, 99.80, 96.09, 53.35, 24.06.
13. Campos-Toimil, M.; Orallo, F.; Santana, L.; Uriarte, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 783.
14. 7,8-Diacetoxy-4-chloromethyl-2-oxo-2H-1-benzopyran (**3a**): To a solution of 4.85 g (21.4 mmol) of **3** in 10 mL of pyridine was cooled and 10 mL of acetic anhydride was dropped and left at room temperature, for 1 h. The mixture was poured onto cold water and left to stir for 30 min. The suspension was filtered and the solid was dried at room temperature, protected from light, until constant weight to obtain 5.85 g (88 %) of the diacetate as a light-cream powder (**3a**). Mp 153–155 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ: 7.53 (d, 1H, H-Ph, *J* = 8.75), 7.17 (d, 1H, H-Ph, *J* = 8.75), 6.52 (s, 1H, H-3), 4.61 (s, 2H, CH₂), 2.38 (s, 3H, AcO), 2.32 (s, 3H, AcO). ¹³C NMR (CDCl₃): δ: 167.72, 167.34, 158.78, 149.26, 147.19, 145.68, 130.79, 121.51, 119.04, 116.25, 115.66, 41.14, 20.66, 20.28.
15. 7,8-Diacetoxy-4-dodecylsulfanyl methyl-2-oxo-2H-1-benzopyran (**12**): A suspension of 0.16 g (6.76 mmol) of NaH, previously washed with petroleum ether, in 10 mL of dry dimethylformamide was cooled at 0 °C and 1.62 mL (6.75 mmol) of 1-dodecanthiol was added. The reaction mixture was left to stir for 2 h at room temperature. The mixture was cooled and 2 g (6.44 mmol) of the diacetyl derivative obtained previously was added at once and the reaction mixture was left to stir at room temperature for 60 min. Once all the starting material has disappeared (TLC) the mixture was poured into 100 mL of HCl (6 mol/L) and extracted with dichloromethane. The organic layer was washed with water and dried. The solvent was removed under reduced pressure and the remaining solid was triturated in ethyl ether and filtered to obtain 1.19 g (38.8%) of **12**. Mp 98 °C (from cyclohexane). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 7.82 (d, 1H, H-Ph, *J* = 10.0), 7.31 (d, 1H, H-Ph, *J* = 7.5), 6.49 (s, 1H, H-3), 3.95 (s, 2H, CH₂), 2.39 (s, 3H, AcO), 2.33 (s, 3H, AcO), 1.49 (m, 2H, CH₂), 1.20 (s, 20H, CH₂-chain), 0.83 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 162.36, 161.81, 157.34, 153.17, 146.57, 141.64, 139.75, 124.87, 117.62, 113.44, 111.68, 108.71, 73.75, 26.58, 26.31, 24.03, 24.00, 23.94, 23.73, 23.63, 23.46, 23.23, 17.11, 15.24, 14.85, 8.83.
16. Pechmann, V. H.; Duisberg, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17*, 929.
17. 4-Chloromethyl-naphtho [1,2-*b*] pyran-2-one (**13**): Yield: 85%, mp 171–174 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 8.33 (m, 1H), 8.03 (m, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.71 (m, 2H), 6.77 (s, 1H, CH, H-3), 5.08 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 160.04, 151.99, 150.86, 134.89, 129.51, 128.51, 128.07, 124.61, 122.75, 122.13, 121.43, 115.37, 113.32, 42.17.
- 4-Chloromethyl-7-hydroxy-naphtho [1,2-*b*] pyran-2-one (**14**): Yield: 70%, mp 242–243 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 10.59 (s, 1H, OH), 8.02 (d, 1H, H-Ph, *J* = 7.5), 7.76–7.68 (m, 2H, H-Ph), 7.47 (t, 1H, H-Ph), 7.06 (d, 1H, H-Ph, *J* = 7.5), 6.72 (s, 1H, H-Pyr), 5.05 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 160.46, 150.50, 150.37, 134.93, 129.11, 127.79, 127.48, 125.21, 125.13, 124.36, 119.58, 115.35, 112.77, 42.03.
- 4-Dodecylsulfanylmethyl-naphtho [1,2-*b*] pyran-2-one (**15**): Yield: 48.7%, mp 75–76 °C. ¹H NMR (CDCl₃): δ: 8.57 (m, 1H), 7.88 (m, 1H), 7.71 (s, 2H), 7.65 (m, 2H), 6.42 (s, 1H, CH, H-3), 3.85 (s, 2H, CH₂), 2.54 (t, 2H, CH₂-chain), 1.60 (m, 4H, CH₂-chain), 1.13 (m, 16H, CH₂-chain), 0.88 (m, 3H, CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃): δ: 160.69, 152.36, 151.51, 134.90, 128.86, 127.72, 127.24, 124.19, 123.42, 122.69, 122.47, 114.07, 113.69, 33.06, 32.28, 31.97, 29.68, 29.66, 29.61, 29.53, 29.39, 29.25, 29.03, 28.87, 22.74, 14.17.
- 8-Bromo-1-chloromethyl-naphtho[2,1-*b*] pyran-3-one (**17**): Yield: 66.5%, mp 238–240 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 8.45 (d, 1H, H-Ph, *J* = 9.25), 8.37 (d, 1H, H-Ph, *J* = 2.00), 8.22 (d, 1H, H-Ph, *J* = 9.00), 7.84 (dd, 1H, H-Ph, *J* = 9.25 and *J* = 9.25), 7.64 (d, 1H, H-Ph, *J* = 8.75), 6.88 (s, 1H, H-3), 5.37 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 159.46, 155.22, 151.93, 133.91, 132.86, 131.67, 131.36, 128.30, 127.47, 119.38, 119.31, 117.94, 112.54, 46.55.
- 8-Bromo-1-phenyl-naphtho [2,1-*b*] pyran-3-one (**18**): Yield: 25.4%, mp 166–168 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 8.08 (s, 1H, H-Ph), 7.85 (d, 1H, H-Ph, *J* = 7.5), 7.69 (d, 2H, H-Ph, *J* = 7.5), 7.47–7.11 (m, 6H, H-Ph), 5.47 (s, 1H, CH, H-3). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 185.76, 149.75, 149.02, 142.28, 133.50, 133.14, 131.17, 129.98, 129.37, 129.15, 129.02, 128.40, 127.32, 126.51, 124.62, 119.97, 119.33, 117.29, 109.31.
18. 4-Hydroxymethyl-naphtho [1,2-*b*] pyran-2-one (**16**): Yield: 97%, mp 165–167 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ: 8.26–8.23 (m, 1H, H-Ph), 7.97–7.94 (m, 1H, H-Ph), 7.81–7.61 (m, 5H, H-Ph), 6.70 (s, 1H, H-Pyr), 5.02 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ: 160.07, 151.89, 150.74, 134.79, 129.44, 128.42, 127.99, 124.59, 122.65, 122.03, 121.24, 115.23, 113.18, 42.10.
19. Benzie, I. F.; Strain, J. *J. Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70.
20. Brault, L.; Denancé, M.; Banaszak, E.; El Maadidi, S.; Battaglia, E.; Bagrel, D.; Samadi, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 243.
21. Hoult, J. R.; Forder, R. A.; de las Heras, B.; Lobo, I. B.; Paya, M. *Agents Actions* **1994**, *42*, 44.
22. Ross, D. D.; Joneckis, C. C.; Ordonez, J. V.; Sisk, A. M.; Wu, R. K.; Hamburger, A. W.; Nora, R. E. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 3776.

ARTICLE 2

Soumis à *Free Radical Research*

Protection of

**CDC25 phosphatases against oxidative stress in breast cancer cells:
evaluation of the implication of the thioredoxin system**

Beillerot Adeline¹, Bennasroune Aline^{1,2}, Battaglia Eric¹, Bagrel Denyse^{1*}

¹Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique, EA 3940, FR CNRS 2843, Université Paul Verlaine-Metz, UFR SciFA, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France.

²Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.

Author contribution

All authors participated in the conception of this study and in the interpretation of data.

Adeline Beillerot performed all experiments and wrote the first draft of the manuscript.

Other authors contributed to the final manuscript.

Key words: Auranofin, Acrolein, hydrogen peroxide, cell cycle, oxidative regulation

Corresponding Author:

Professor Denyse Bagrel

Laboratoire d'Ingénierie Moléculaire et Biochimie Pharmacologique

Université Paul Verlaine, UFR SciFA, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

E-mail : bagrel@univ-metz.fr

+33387378404

Abstract

Reactive oxygen species regulate protein functionality through both reversible and irreversible mechanisms. CDC25 phosphatases, which control cell cycle progression, are potential targets of such oxidative regulation. It was previously shown that CDC25B and C are inhibited by H₂O₂ and reactivated by the thioredoxin system *in vitro* and we found in the present study that this is also the case for CDC25A. We next sought to evaluate if a thioredoxin-dependent redox regulation of CDC25 exists in cancer cells. We used for that purpose MCF7 and MDA-MB 231 breast cancer cells, which express *trx1* differentially. H₂O₂ treatment could trigger a cell cycle disruption, without affecting CDC25 activities. In order to evaluate the protective contribution of the thioredoxin system towards CDC25s in these cells, the effects of two *trx/trxR* inhibitors, Auranofin and Acrolein, were characterized on cell cycle and CDC25 activity. Auranofin could induce a full thioredoxin reductase inhibition associated with ROS production and cytotoxic effects in both cell lines. Acrolein could provoke similar effects only in MDA-MB 231 cells with a low *trx1* expression but had no effect on MCF7 cells overexpressing *trx1*. Simultaneous *trx1* oxidation and *trxR* inactivation occurred only in the presence of Acrolein. In MDA-MB 231 cells, the full inhibition of the *trx/trxR* system by Acrolein resulted in a G2-M cell cycle arrest, without CDC25 inhibition. Our data suggest that a very efficient protective system exists in breast cancer cells which allows for the maintenance of CDC25 activity even in the presence of a major oxidative stress.

Introduction

Reactive Oxygen Species (ROS) are classically considered as toxic by-products of aerobic respiration but are also now acknowledged as important regulator of eukaryotic signal transduction [1-2]. The last decade in particular has provided evidence that ROS play a fundamental role in cell cycle progression [3]. Hydrogen peroxide (H₂O₂) is indeed described as a redox signaling molecule which oxidizes critical cysteine residues of effectors such as protein tyrosine phosphatases (PTP) in response to various stimulations. Thus, the oxidation of catalytic cysteine leads to an enzymatic inhibition which can be reversed by thiol compounds such as dithiothreitol (DTT), thioredoxin system or glutathione system [4-7]. Among cellular PTP targets of H₂O₂, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) [8-9], focal adhesion kinase (FAK-tyrosine phosphatase) [10], Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) [11-12], Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) [13-14], SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 2 (SHP2) [15-16] and phosphatase of regenerating liver (PRL-1) were for instance described [17].

Cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases (EC.3.1.3.48) belong to the PTP superfamily and are key regulators of the eukaryotic cell cycle under normal conditions and in response to DNA damage. They are dual specificity phosphatases responsible for the dephosphorylation of CDK (cyclin dependent kinase)/cyclin on pThr14 and/or pTyr15 residues. Dephosphorylation of the CDK/cyclin complexes leads to activation of these regulatory kinases which promote phosphorylation of their numerous cellular targets and cell cycle progression. In mammalian cells, the CDC25 phosphatase family occurs as three isoforms, namely CDC25A, B, and C, with all of them functioning as regulators of both G1/S and G2/M transitions [18]. CDC25A, B, C activities are tightly regulated by several mechanisms,

including phosphorylation-dephosphorylation cycles, expression level and subcellular localization [19]. CDC25 activity is also regulated *in vitro* by oxidation of the catalytic cysteine located in the PTP active-site motif “H-C-(X)5-R”. Indeed, the catalytic cysteine (Cys431 in CDC25A, Cys473 in CDC25B, Cys473 in CDC25C) exists as a thiolate anion in the free enzyme with a pK_a of ~ 5.9 and this unusually low pK_a makes it highly susceptible to oxidation. The oxidation of the active-site cysteine triggers the formation of a sulfenic acid (Cys-SO), itself a highly unstable species that can be further oxidized to the sulfinic (Cys-SO₂) or even sulfonic acid (Cys-SO₃). Alternatively, the sulfenic acid can react with a backdoor cysteine to form an intramolecular disulfide which protects the active site from an irreversible oxidation to sulfonic acid [20]. Sohn and Rudolph have shown that H₂O₂ leads to the formation of intramolecular disulfide in CDC25B and C that could be readily reduced by thioredoxin/thioredoxin reductase but this inhibition/reactivation process was observed only *in vitro* [20-21].

The thioredoxin/thioredoxin reductase system acts as a protein disulfide reductase. Thioredoxin reductase (trxR, EC.1.8.1.9) is a homodimeric selenium containing flavoprotein, which transfers reducing equivalents from NADPH to disulfide reductase thioredoxin (trx, EC.1.8.4.10). Trx has a conserved Cys-Gly-Pro-Cys redox catalytic site which reduces oxidized cysteine residues on cellular proteins or binds to proteins to modify their activity. Two trx/trxR systems exist in most eukaryotic cells, one in the cytoplasm (trxR1/trx1), the other one in the mitochondria (trxR2/trx2) [22]. Their numerous molecular targets include enzymes directly engaged in countering oxidative stress, such as peroxiredoxins, glutathione peroxidase and methionine sulfoxide reductase [23]. A large number of transcription factors such as p53, nuclear factor kappa B (NFkB) and nuclear factor- like 2 (Nrf2) are regulated via

redox signaling by thioredoxin which thus allows for the transcription factor binding to DNA [24-26]. In addition to its critical functions in the regulation of cellular redox homeostasis, trx enzymes possess a large number of actions in the cell such as activation of ribonucleotide reductase, inhibition of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) and induction of hypoxia inducible factor 1 (HIF1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) which contribute to many hallmarks of cancer, such as increased proliferation, inhibited apoptosis and angiogenesis [23, 27-28].

Growing evidence indicate that, compared with their normal counterparts, many types of cancer cells have increased levels of ROS [29-31]. Yet the sustained proliferation of cancer cells suggests that ROS-sensitive cell cycle regulators remain active to some extent even in the presence of oxidative stress. Therefore, we sought to evaluate in the present work how oxidative stress could affect cell death and proliferation in MCF7 and MDA-MB 231 breast cancer cell lines, using H₂O₂ as a cell stressor. We focused our study on redox-sensitive CDC25 phosphatases because of their essential role in cell cycle progression and evaluate the involvement of the trx/trxR system in the redox-regulation of these phosphatases.

Materials and Methods

Chemicals, reagents and antibodies

Hydrogen peroxide (H₂O₂), Auranofin and Acrolein were from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) and propidium iodide (PI) were from Anaspec (Fremont, USA). Primary antibodies anti-trx1 (FL-105, sc-20146), anti-phospho-Cdk1 (pCdc2 p34 (Thr141/Tyr15)-R, sc-12340-R), anti-Cdk1 (Cdc2 p34 (C-19), sc-954), anti-phospho-Cdk2 ((Thr141/Tyr15)-R, sc-28435-R), anti-Cdk2 ((H-298), sc-748) and

horseradish peroxidase-goat anti-rabbit antibody were from Santa Cruz Technology (Santa Cruz, USA). Primary anti-trxR antibody was from Cell Signaling (Beverly MA, USA). Horseradish peroxidase-goat anti-mouse antibody was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

Production and purification of GST-CDC25 fusion proteins in E. coli

pGex-2T vector encoding the genes fusion construct of glutathione S-transferase (GST) and human CDC25s was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). These constructs correspond to the entire CDC25A and CDC25C, and to the catalytic domain of CDC25B. Transformed bacteria were grown in 1 L of Luria–Bertani medium containing 50 µg/ml ampicillin at 37 °C to a cell density of $A_{600} = 0.4–0.6$. The expression of recombinant proteins was induced with 0.5 mM isopropyl thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) and incubation was continued for another 5 h at 30 °C. Cells were collected by centrifugation at 1500 * g for 15 min and suspended in 30 mL lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1 mM PMSF, 3% (v/v) protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA)] and lysed by sonication (5x30 sec). The cell lysate was cleared by a 25000 * g centrifugation for 45 min and fusion proteins were purified by affinity chromatography using glutathione-agarose gel as described [32].

In vitro phosphatase assays

Human GST–CDC25 recombinant enzymes were used to evaluate the inhibitory potential of H₂O₂. The activity of GST-CDC25A, GST-CDC25B, GST-CDC25C was determined using 3-O-methyl fluorescein phosphate (OMFP) as substrate. The assay was performed using a SFM25A spectrofluorimeter (Kontron instrument), in a final volume of 1 mL. The final

concentrations were 3 µg/mL for CDC25A, 5 µg/mL for CDC25B and 4 µg/mL for CDC25C leading to comparable fluorescence product intensities for each CDC25 isoform. The enzymes were incubated with increasing concentrations of H₂O₂ (0-8 mM) for 2 min at 37°C in reaction buffer [50 mM Tris-HCl (pH 8.2), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Serum Albumine Bovine]. The assay was then started by adding 500 µM of substrate and 25 units of catalase to scavenge any residual H₂O₂. 3-O-methyl fluorescein fluorescence (OMF, 485/510 nm) was measured during 5 min (initial rate conditions). Data represent mean values of at least three independent experiments.

Cell culture and treatment

The human breast adenocarcinoma cell lines MCF7 and MDA MB-231 (ECACC, UK) were maintained in RPMI-1640 medium (Eurobio, France) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and penicillin (100 UI/ml)/ streptomycin (100 µg/ml) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were treated with H₂O₂, Auranofin or Acrolein for the indicated times and concentrations as described in the figures. For Auranofin treatments, cells were treated in complete medium with DMSO as vehicle (0,2% vol/vol). For Acrolein treatments, cells were treated in HBSS for 30 min. HBSS containing Acrolein was then replaced by complete medium for the remaining indicated times.

Cytotoxicity Assays

Cell viability was assessed by dual color fluorescence analysis with dihydrodichlorofluorescein diacetate (H₂DCFDA) and propidium iodide (PI). H₂DCFDA is a non-polar and non-fluorescent compound which can freely enter viable cells where it is converted to green fluorescent dichlorofluorescein (DCF). PI is a polar, highly red fluorescent

compound which can only get into cells that lack membrane integrity. Thus, using these two probes, viable cells are identified by flow cytometry (CFM) analysis as a low red (FL3, 670 nm LP) and high green fluorescence (FL1, 530/30 nm BP) population [33]. MCF7 and MDA-MB 231 cells (250×10^3) were seeded in 6 well-plates and allowed to attach overnight. Cells were treated with increasing concentrations of H_2O_2 (0-3 mM), Auranofin (0-10 mM) or Acrolein (0-50 μ M) for 24 h. After treatment, floating and adherent cells were harvested, washed twice with PBS and stained with H_2DCFDA (50 μ M) and PI (75 μ M) for 15 min in the dark. A total of 10 000 cells were analyzed per sample. The data were analyzed using CellQuest™ Pro software (BD biosciences).

trxR enzymatic activity

MCF7 and MDA-MB 231 cells (1×10^6) were seeded in 100 mm dish. After 24 h, cells were treated with increasing concentrations of Auranofin (0-3 μ M) or Acrolein (0-30 μ M) for 30 min. The cells were then harvested, resuspended in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7), sonicated and centrifuged (12000 *g, 15 min, 4°C). Supernatants were used for enzyme assays.

The *trxR* activity assays were based on the NADPH-dependent 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) reduction [34-35]. The formation of the 2-nitro-5-thiobenzoate anion (TNB) was monitored spectrophotometrically at 412 nm during the initial 2 min (initial rate conditions). The *trxR* activity was measured at 25°C in potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), 2 mM EDTA in the presence of 3 mM DTNB and 0.2 mM NADPH. The rate of the corresponding reaction without NADPH was used to subtract the rate of DTNB reduction by protein free SH groups independently of *trxR* activity.

Estimation of intracellular ROS

Intracellular peroxides were detected using a permeable and oxidation-sensitive fluorescent probe, H₂DCFDA [36]. H₂DCFDA is oxidized to green fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by H₂O₂. MCF7 and MDA-MB 231 cells (250*10³) were grown in 6 well-plates, and incubated with 50 μM H₂DCFDA in complete medium for 15 min at 37°C, 5% CO₂ before treatment with H₂O₂, Auranofin or Acrolein. Fluorescence was measured by flow cytometer using FAScalibur (BD Bioscience, San Jose, CA). A total of 30 000 cells were analyzed per sample. The data were collected at FL1 (530/30 nm BP) and analyzed using CellQuest™ Pro software (BD biosciences). Quantitative assay of ROS generation was performed by normalization to the control group.

trx1 Redox status assay

The redox status of trx1 was determined according to Watson's method [37]. MCF7 and MDA-MB 231 cells (1*10⁶) were seeded in 100 mm dish. After 24 h, cells were treated with increasing concentrations of Auranofin (0-10 μM) or Acrolein (0-30 μM) for 30 min. 5*10⁶ cells were lysed in 6 M guanidinium chloride, 50 mM Tris/HCl (pH 8.3), 3 mM EDTA, and 0.5% Triton-X-100 containing 50 mM iodoacetic acid. The samples were briefly sonicated on ice to shear DNA and incubated for 30 min at 37°C. The excess of iodoacetic acid was removed using Microspin G-25 columns (GE Healthcare, Piscataway,NJ). Column eluates were mixed with an equal volume of loading buffer and oxidized and reduced trx-1 were separated on a 14 % native PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), transferred to a nitrocellulose membrane and probed with anti-trx1 and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. Immunostained bands were visualized using ChemiDoc™(Bio-Rad).

Cell cycle analysis

MCF7 and MDA-MB 231 cells (250×10^3) were seeded in 6 well-plates and allowed to attach overnight. Cells were treated as a function of time (3, 6, 12, 24, 48 h) with 1 mM H_2O_2 , 3 μ M Auranofin or 15 μ M Acrolein and their corresponding control (solvent alone). After incubation at 37°C for the desired time, floating and adherent cells were harvested, washed twice with PBS, and fixed in 70% ethanol at -20°C. After 24 h, cells were washed once with PBS. Then, cells were stained with a PI solution [50 μ g/ml PI, 0,1 mg/ml Dnase-free RNase A and 0,1 % triton X-100] for 15 min in the dark. Stained cells were analyzed for DNA content by flow cytometer (FL-3) using FACSCalibur (BD Bioscience, San Jose, CA)[38]. 10 000 cells were analyzed per sample. The percent of cells in each cell cycle stage was calculated using ModFit LT™ software (Verity Software House, Topsham).

Cdk phosphorylation analysis by immunoblotting

MCF7 and MDA-MB 231 cells (250×10^3) were seeded in 6 well plates. After 24 h, the cells were treated as a function of time (0.5, 3, 6, 12, 24, 48 h) with H_2O_2 (0.5, 1, 2 mM), Auranofin (3 μ M) or Acrolein (15 μ M). 750×10^3 cells were then harvested and lysed in lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 0.1% SDS, 10% glycerol, 0.5% deoxycholate supplemented with protease inhibitors cocktail (Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), 1 mM PMSF and 2 mM sodium vanadate] for 30 min on ice. After a brief sonication, cells were centrifuged at 12000 * g for 15 min at 4°C. 40 μ g of cell extracts were loaded onto a 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis. The separated proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane for western-blotting analysis. Immunoblotting was performed using anti-

phospho-CDK1 (1:1000), anti-CDK1 (1:1000), anti-phospho-CDK2 (1:1000), anti-CDK2 (1:1000). Primary antibodies were detected with horseradish peroxidase-goat anti-rabbit antibody and chemiluminescent immunodetection (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Technology, Santa Cruz, USA). Densitometry analysis was performed using ChemiDoc™(Bio-Rad).

Statistical analysis

Data represent the mean of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using a Student's t-test. All analysis was performed using GraphPad Prism 4.00 software (GraphPad Software, CA).

Results

CDC25 activities are inhibited in vitro by H₂O₂ and reactivated by TCEP and the trx/trxR system

It was previously shown that the catalytic domains of CDC25B and C are sensitive to oxidation by H₂O₂ which inhibits their enzymatic activity *in vitro* [21]. In this study, we have evaluated the *in vitro* oxidative effects of H₂O₂ on the full length CDC25A and CDC25C and used the catalytic domain of CDC25B as a control. As shown in fig. 1A, H₂O₂ could inhibit CDC25A, B and C phosphatase activity in a dose-dependent manner. CDC25A and CDC25B exhibited a comparable sensitivity to H₂O₂ with an IC₅₀ value of 100 ± 4.6 μM and 75 ± 3.3 μM respectively. CDC25C was less sensitive with an IC₅₀ of 300 ± 3.1 μM. We also observed that H₂O₂-inactivated CDC25A could be fully reactivated by the addition of TCEP, a more stable reductant than DTT, and by the trx/trxR system (fig. 1B). These observations are in agreement with those of Sohn and Rudolph [21] observed using the catalytic domain of

CDC25B. The high reactivity of CDC25 with H_2O_2 was attributed to the exposition of the catalytic cysteine which could promote disulfide formation with the backdoor cysteine [21].

A cell treatment with H_2O_2 induces a similar cytotoxic effect and ROS production in MCF7 and MDA-MB 231 cell lines

In order to evaluate the contribution of the *trx/trxR* system in the redox regulation of CDC25s in cancer cells, we then looked for breast cancer cell lines with different expression level of the *trx/trxR* system. We found that MCF7 exhibit a higher *trx1* expression than MDA-MB 231 while these cells express a similar level of *trxR1* (fig. 2A).

We then evaluated the experimental conditions allowing for the generation of intracellular oxidative stress during H_2O_2 treatment. MCF7 and MDA-MB 231 cells were treated with increasing concentrations (0-3 mM) of H_2O_2 for 24 h and H_2O_2 cytotoxicity was evaluated. MCF7 and MDA-MB 231 cells showed a similar sensitivity to H_2O_2 with IC_{50} values of 1.46 ± 0.02 mM and 1.43 ± 0.03 mM respectively (fig. 2B). This cytotoxicity was found to be associated with an increase in the intracellular level of ROS in a dose-dependent manner in both cell lines (fig. 2C). For instance, H_2O_2 (1 mM, 15 min) could increase ROS production by 2.3 fold in MCF7 and MDA-MB 231 cells, suggesting a significant oxidative stress. H_2O_2 cytotoxicity thus appears to be independent of *trx1* expression in these cells.

A cell treatment with H_2O_2 triggers a cell cycle arrest in MCF7 and MDA-MB 231 cell lines without CDC25 inhibition

Since ROS were reported to inactivate specific cell cycle proteins [3], we then evaluated the effect of H_2O_2 on the cell cycle distribution in MCF7 and MDA-MB 231 cells. We observed that H_2O_2 (1 mM, 48 h) could provoke a G2-M cell cycle arrest in both cell lines (2.7 fold

increase of G2-M cells in MDA-MB 231-treated samples vs control and 1.9 fold increase of G2-M cells in MCF7 treated-samples vs control) (fig. 3A). We evaluated the time-dependence of this G2-M accumulation and noticed that G2-M arrest was earlier and more intensive in MDA-MB 231 than in MCF7 treated cells (Fig. 3A). Thus, the highest effect of a H₂O₂ treatment in terms of G2-M arrest was found in cells with the lowest expression of *trx1* (*i.e.* MDA-MB 231), suggesting a possible role for *trx1* in the progression from and towards G2-M in the presence of oxidative stress.

We reasoned that the observed G2-M arrest may be related to the inhibition of CDC25 activity which possibly could not be rapidly restored by the *trx/trxR* system in the presence of high level of H₂O₂. Indeed, CDC25 inhibition or downregulation has been sometimes reported to trigger G2-M accumulation [39-41]. Therefore, we evaluated the effect of H₂O₂ on the phosphorylation of CDC25 phosphatase substrates (*i.e.* phospho-CDK1 and phospho-CDK2). Indeed, as inhibition of cellular CDC25 phosphatases should lead to an accumulation of the inactive phosphorylated forms of CDK, we determined the expression level of CDK1 and CDK2 tyrosine-15 phosphorylation by western blotting. MCF7 and MDA-MB 231 cells were treated with H₂O₂ (0.5, 1 and 2 mM) for various times (30 min to 48 h). No increase in CDK1 and CDK2 tyrosine-15 phosphorylation was observed in comparison to vehicle-treated cells (Fig. 3B, and data not shown). We postulated that CDC25 activity may have been sustained by the protective action of a highly efficient *trx/trxR* system, even in MDA-MB 231 cells, where *trx* expression was found to be lower than in MCF7 cells.

Auranofin and Acrolein impair cell viability of MCF7 and MDA-MB 231 cells

To test the role of the trx/trxR system in the maintenance of CDC25 activity in the presence of H₂O₂, we assessed the effects of two well-known trxR and trxR/trx inhibitors, namely Auranofin and Acrolein, in both cell lines.

Auranofin (S-triethylphosphinegold(I)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside) is an organometallic compound that reacts with thiol and/or selenol-containing residues and inhibits both cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases [42-44]. Acrolein bears an α,β-unsaturated aldehyde, which as such, is highly reactive towards nucleophiles, including thiol-containing molecules. Acrolein has been reported to covalently modify and inhibit trxR and trx in different cell lines [45-48].

The cytotoxic effects of these compounds, which have not been accessed in breast cancer cell lines to the best of our knowledge, were first tested in MCF7 and MDA-MB 231 cells after 24 h of treatment. Both cell lines exhibited a similar sensitivity to Auranofin with an IC₅₀ value of 5.77 ± 0.52 μM for MCF7 and 3.16 ± 0.17 μM for MDA-MB 231 (Fig.4 A). Conversely, MCF7 cells did not appear to be sensitive to Acrolein, whereas MDA-MB 231 cells showed an IC₅₀ value of 13.47 ± 0.81 μM (Fig. 4 B). The susceptibility of MDA-MB 231 cells to this compound could be due to the differential trx1 expression level between both cell lines, trx1 being weakly expressed in MDA-MB 231 cells (Fig.2A) and thus easily inhibited. To address this issue, we studied the effects of Auranofin and Acrolein on ROS production, trxR activity and trx oxidation level.

Auranofin and Acrolein inhibit trxR activity in both cell lines but only Acrolein is able to generate a concomitant ROS production and trx1 oxidation in MDA-MB 231 cells

trxR inhibitory effects of Auranofin and Acrolein were determined in both cell lines after treatment with increasing concentrations of these two compounds for 30 min. A total trxR

inhibition could be achieved in both cell lines with 3 μ M Auranofin (Fig.5 A1) or with 15 μ M Acrolein (Fig.5 A2).

Since H₂O₂ degradation is partly dependent upon trx/trxR-dependent peroxiredoxin (prx) activity [49], we evaluated the effect of Auranofin and Acrolein on ROS production and accumulation using H₂DCFDA. We observed that Auranofin treatments resulted in ROS accumulation in both cell lines. Indeed, a 1.7 fold increase of intracellular ROS was observed in MCF7 and MDA-MB 231 with 3 μ M Auranofin (Fig.5 B1). In the case of Acrolein treatments, only MDA-MB 231 cells were subjected to a significant accumulation of ROS (1.5-fold increase after treatment with 15 μ M acrolein) (Fig.5 B2). These results are in agreement with the trx/trxR dependence of H₂O₂ degradation in these cells. The absence of ROS accumulation in MCF7 cells in the presence of the trx inhibitor Acrolein may be due to the high expression level of trx1 in these cells.

We next evaluated the effects of Auranofin and Acrolein on the redox status of trx1 in MCF7 and MDA-MB 231 cells by redox western blot. Iodoacetate covalently labels thiol groups of reduced trx1, and the resulting negative charge increases its migration in native PAGE relative to oxidized trx1 which does not react with iodoacetate. Reduced trx1 refers to the form in which both dithiols are reduced and represents the active form. The active site dithiol is the more easily oxidized, so partially oxidized trx1 likely represents oxidation of the active site C32/C35, whereas both dithiols (C32/C35, C62/C69) are oxidized in the fully oxidized form [37]. On the one hand, in spite of trxR inhibition and oxidative stress generation, Auranofin treatment did not result in trx1 oxidation, but on the contrary, it appeared to trigger a reduced trx1 accumulation (Fig.5 C1 and C2). On the other hand, a treatment with Acrolein resulted in a trx1 oxidation in a dose-dependent manner in MDA-

MB 231 cells (Fig.5 C4) whereas in MCF7 cells, trx1 oxidation status did not change (Fig.5 C3). In MDA-MB 231 cells, treatment with 15 μ M Acrolein leads to a full trx1 oxidation. trx1 oxidation in MDA-MB 231 cells could be due either to trxR inhibition associated with increase of ROS or to a direct alkylation of thiols of trx1 by Acrolein to form trx-S-acrolein adducts. While different from conventional oxidation in which disulfides are formed, trx-acrolein adducts essentially represent trx oxidation because they block its sulfhydryl groups, leading to an altered mobility after redox Western blots. It is interesting to note that, again, Acrolein has no effect on MCF7 cells as shown this time by redox Western blots towards trx1.

Thus, MCF7 cells are not sensitive to the trx inhibitor Acrolein, which does not lead to ROS accumulation and trx1 oxidation status in MCF7 cells. The lack of effects of Acrolein in MCF7 cells may be in part due to the strong trx1 expression level in comparison to the MDA-MB 231 cells. Overall, since only Acrolein could fully inhibit the trx/trxR system and trigger the production of ROS in MDA-MB 231 cells, we selected this trx inhibitor and cell line to further evaluate the contribution of the trx/trxR system in the redox regulation of CDC25 in cultured breast cancer cells.

Acrolein causes a G2-M cell cycle arrest in MDA-MB 231 cells without CDK hyperphosphorylation

The impact of a functional alteration of trxR/trx system by Acrolein (15 μ M for 6, 12, 24 and 48 h) on the cell cycle distribution was assessed in MDA-MB 231 cells. This concentration of Acrolein was found to result in total trx1 oxidation and could markedly trigger a G2-M cell cycle arrest in MDA-MB 231 cells. Thus, after a 48 h treatment with 15 μ M Acrolein, 41.69 ± 3.82 % of cells were observed in G2-M stage vs 19.45 ± 2.25 % in control cells (Fig.6A). This

G2-M accumulation of MDA-MB 231 cells could be initially detected after 12h of treatment and increased with treatment time (Fig.6B). On the other hand, Auranofin (3 μ M) did not affect the cell cycle distribution even when used at a concentration able to fully inhibit *trxR* (data not shown). These results suggest that *trxR* inhibition alone is not sufficient to arrest the cell cycle and that a *trx1* inactivation (by oxidation or alkylation) is required for cell cycle blockade. We also found that Acrolein does not influence MCF7 cell cycle distribution (data not shown) possibly because of the high *trx1* expression as previously stated. The G2-M accumulation observed upon Acrolein treatment of MDA-MB 231 cells could be due to CDC25 inactivation following oxidative stress and *trx/trxR* impairment. To answer this question, we examined CDK1 and CDK2 tyrosine phosphorylation level in MDA-MB 231 cells treated with 15 μ M Acrolein at different time points (30 min to 48 h) (Fig.5C and data not shown). No CDK tyrosine phosphorylation change was observed in treated cells, suggesting that G2-M cell cycle arrest observed may not be concomitant to a full CDC25 phosphatases inhibition.

Discussion

Recent evidence suggest that regulation of phosphatases enzymatic activities by ROS, particularly H_2O_2 , may play an important role in cell signaling [1-2]. In cancer cells which possess a specific redox profile, often pro-oxidant, this type of regulation may be crucial for tumor growth [31, 50]. CDC25 phosphatases are key regulators of the cell cycle progression. They are considered as potential anticancer therapeutic targets because their inhibition is able to stop or slow down cellular multiplication [18]. Redox regulation of CDC25 phosphatases was described *in vitro* by Sohn and Rudolph in 2003. They showed that CDC25B and C activities are rapidly inhibited by H_2O_2 and that CDC25B activity is restored by

the *trx/trxR* system, *in vitro* [21]. We speculated that CDC25 inhibition by oxidative stress (*i.e.* H_2O_2) should slow down cancer cell proliferation unless an efficient reactivating system exists. Thus, we first evaluated the effects of H_2O_2 on CDC25 activities *in vitro*. Our results showed that CDC25A is rapidly inactivated by H_2O_2 and reactivated by the *trx/trxR* system *in vitro* which is in good agreement with previous results found with the catalytic domains of CDC25B and C [21]. *In vitro* experiments thus suggest that this could be the role of the *trx/trxR* system to restore the activity of oxidized CDC25 and we sought to find out if this is also the case in breast cancer cells.

The *trx/trxR* system is indeed involved in numerous and fundamental cellular processes such as proliferation, redox regulation, apoptosis or angiogenesis and is also a potential anticancer target [22]. The redox regulation of CDC25 phosphatases in cancer cells has yet to be described. We used for that purpose breast cancer cells expressing different levels of *trx1*, together with two *trx/trxR* inhibitors. Auranofin is a synthetic gold compound, known as a potent *trxR* inhibitor with some anticancer properties [51-55]. Acrolein is a lipid peroxidation and cyclophosphamide metabolic byproduct and an environmental pollutant able to inhibit both *trxR* and *trx* [56].

We evaluated the effect of H_2O_2 on breast cancer cells with a functional *trx/trxR* system. To explore the contribution of the *trx/trxR* system in the maintenance of CDC25 activity in the presence of oxidative stress, we tested the effect of H_2O_2 on CDC25 activity in breast cancer cells expressing high (MCF7) or low (MDA-MB 231) levels of *trx1*. We found that, in both cell lines, H_2O_2 triggers a G2-M cell cycle arrest which intensity may be associated with *trx1* expression level (*i.e.* more important in MDA-MB 231 cells expressing a lower level of *trx1* compared to MCF7 cells). However, this cell cycle arrest does not appear

to be linked to a full CDC25 inactivation by H₂O₂ as shown by the apparent lack of effect on CDK phosphorylation. A small proportion of active CDC25s could be sufficient to keep CDK dephosphorylated in intact cells. This suggests that CDC25 activity is at least partly sustained under oxidative stress conditions and supports the view of an efficient cellular protective mechanism. Since the contribution of the trx/trxR system was observed *in vitro*, we considered the role of this system in keeping CDC25 under a reduced active form in breast cancer cells.

In order to gain insights into the contribution of the trx/trxR system in the persistent activation of CDC25s in breast cancer cells, we then evaluated the impact on CDC25 activity of an altered trx/trxR system using chemical inhibitors. The cellular effects of Auranofin and Acrolein were assessed to work out the specific experimental conditions resulting in a total trxR inhibition associated with an oxidative stress and a trx functional inactivation. A full inactivation of the trx/trxR system was obtained only for Acrolein treatment of MDA-MB 231 cells. Although Auranofin was found to be a more potent trxR inhibitor than Acrolein and a powerful pro-oxidative compound, it was not able to provoke a trx1 oxidation. This result seems paradoxical considering the well-established trxR-dependence of trx1 activity, but recent studies shed some light into this unexpected observation. Thus, Prast-Nielsen *et al* have shown that a treatment of human lung adenocarcinoma epithelial A549 cell line with Auranofin affects trxR activity but not trx functionality [57-58]. Moreover, Watson *et al* have found that a trxR knockdown does not result in trx1 oxidation in HeLa cells [57-58]. Other studies have on the other hand demonstrated a trx1 oxidation after Auranofin treatment but the effects appear to be cell type-dependent. For example, in human promyelocytic leukemia HL-60 cells, high concentrations of Auranofin resulted in minor trx1 oxidation

whereas oxidation was stronger in human cisplatin-sensitive ovarian 2008 cancer cells and even more potent in human cisplatin-resistant ovarian cancer C13* cells. However, in all cases, trx1 oxidation was not total and prominent fractions of the enzyme remained reduced [59-60]. Unlike Auranofin, Acrolein treatment resulted in a total oxidation of trx1 in MDA-MB 231 cells. This result is consistent with previous studies which have shown the ability of Acrolein to totally oxidize purified trx1 or cellular trx1 in HMEC-1, BAEC or BEAS-2B cells [45, 47, 61]. Yang *et al* have also noticed a loss of trx activity in A549 cells treated with Acrolein [46]. Of note is the striking difference observed in terms of Acrolein cytotoxicity between the two breast cancer carcinoma cell lines. The lack of significant increase in ROS as well as the relative non-toxicity of Acrolein in MCF7 cells treated with Acrolein could be due to the high trx1 expression level in these cells. All together, our results and the above-mentioned studies suggest that trxR1 may not be an adequate pharmacological target to inhibit cellular processes depending upon trx1 activity, and that it may be more efficient to directly target trx1.

While Acrolein treatment of MDA MB-231 cells induced a G2-M cell cycle arrest together with trx inactivation, it did not result in CDC25 inactivation. Thus, neither an H₂O₂ treatment nor a trx/trxR inhibition resulted in CDC25 inactivation, even though both experimental conditions resulted in a significant oxidative stress. Evens others than CDC25 oxidation could thus explain the cell cycle arrest observed after Acrolein treatment. For example, Acrolein is able to form DNA adducts which can further cross-link to proteins and DNA. These adducts can block DNA replication and this could lead to a cell cycle arrest [62-63]. Furthermore, recent studies have shown that the generation of oxidative stress induced concomitant and differential regulation of the oxidative stress-associated genes *CYGB*,

FOXM1, *NOX5*, *NUDT1* and *SEPP1*. FoxM1 regulates the transcription of a conserved group of genes that regulate transition through G2/M, including cyclin B, survivin, cyclin D1, p21Cip1, p27Kip1, Aurora B kinase, Polo-like kinase and others [64]. Decrease of FoxM1 expression is associated with reduced expression of cell cycle regulatory genes involved in the progression of the cell cycle through the S, G2 and M phases [65]. Indeed, peroxide production induced by Acrolein could affect FOXM1 expression and then modify cell cycle distribution. This hypothesis is supported by a previous study by Barnouin *et al.* who reported that H₂O₂ could induce a transient multiphase cell cycle arrest through modulation of cyclin D and p21Cip1 expression in mouse fibroblasts [66].

Thioredoxin has been implicated as a regulator of the G2/M transition. Indeed, Natsuyama *et al.* reported that exogenous bacterial thioredoxin could restore impaired CDK1 activity, possibly because trx could protect CDC25 activities [67]. Sohn and Rudolph [21] and our study have confirmed this hypothesis *in vitro* but our results in MCF7 and MDA-MB 231 breast cancer cells suggest that the protective effect is independent of trx expression level and that the inhibition of the trx/trxR system is without effect on CDC25 activities. Although the first obvious conclusion from these observations would be that the trx/trxR system is not involved in CDC25 reactivation in these breast cancer cell lines, an alternative explanation can also be supported since this system presents a very efficient catalytic capacities compatible with a restorative activity even in the presence of a limited number of active enzymes [22]. Indeed, one can easily assume that the chemical inhibition is not sustained to a full extend in cells unlike for *in vitro* study. Therefore, our work suggests that either a functional trxR/trx system does not seem strictly essential to maintain CDC25 activity in the presence of oxidative stress in the two breast cancer cell lines used in the present study, or

that a minute fraction of active trx1 is sufficient to efficiently reduce H₂O₂-inactivated CDC25. This conclusion is corroborated by a study of Vogt *et al*, who have shown that the trx inhibitor Imidazolyl Disulfide IV-2 induces in MCF7 cells a G2-M cell cycle arrest without increase in CDK1 phosphorylation, suggesting that CDC25 activity was not impaired [68].

Taken together, our study suggests that, although CDC25 activity is sensitive *in vitro* to oxidative stress triggered by H₂O₂, these cell cycle regulatory phosphatases remain active even in the presence of oxidative stress thanks to an efficient protective mechanism in breast cancer cells. Neumann *et al.* have proposed that CDC25 could be preserved in cancer cells by peroxiredoxins (prx) forming a chaperone complex [69]. This type of protective mechanism from oxidation-induced inactivation has been shown for the phosphatase PTEN in Mouse Embryonic Fibroblasts [70].

We can also conceive that CDC25 activity could be restored after reduction of the catalytic cysteine sulfinic acid which can be formed under oxidative stress condition. This type of cysteine oxidation has been long thought to be irreversible until a novel oxidative stress-induced antioxidant protein able to reduce cysteine sulfinic acid was discovered. This sulfiredoxin protein can reduce cysteine sulfinic acid of typical 2-cys peroxiredoxins [71-72], and oxidized sulfiredoxin is then reduced by thioredoxin [73]. Prx is so far the only known substrate of sulfiredoxin but we cannot exclude the possibility that the same kind of regulation could exist for other redox sensitive proteins such as CDC25s. Moreover, sulfiredoxin is also involved in the deglutathionylation of PTP1B. Glutathionylation of this phosphatase on the catalytic cysteine protects against irreversible oxidation during oxidative stress but this cysteine modification induces an reversible inhibition of the enzyme which can be deglutathionylated by sulfiredoxine to fully restore the catalytic activity [74]. PTP1B

and CDC25s are members of the same phosphatase family, and we can speculate that CDC25 could be also subjected to glutathionylation/deglutathionylation reactions.

In both hypothesis, *i.e.* protection of CDC25 activity by 2-cys peroxiredoxin chaperone or by glutathionylation/deglutathionylation with the contribution of sulfiredoxine, the CDC25 catalytic cysteine may not be available to other reducing systems, which could explain why trx is able to regulate CDC25 activities *in vitro* but not in cancer cells.

In conclusion, we showed in this work that a highly efficient protective system exists in MCF7 and MDA-MB 231 breast cancer cell lines, which is active towards the CDC25 cell cycle regulatory phosphatases even in the presence of a major oxidative stress and when the trx/trxR system is inhibited. Identifying the system restoring CDC25 activities in cancer cells under pro-oxidative conditions should help define new strategies to indirectly target CDC25s and possibly other regulatory phosphatases and so prevent cancer cell proliferation.

Acknowledgments

The authors thank L. Meijer and I. Hoffmann for providing the expression plasmids for CDC25s. The authors gratefully acknowledge C. Bojic for his technical support. This study was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comités de Moselle, de Meurthe & Moselle et de Meuse) and the Conseil Régional de Lorraine. A.B. is recipient of a fellowship provided by the Ligue contre le Cancer (Comité de Moselle).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper

References

1. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 2007; 26(1): p. 1-14.
2. Groeger, G., C. Quiney, and T.G. Cotter. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): p. 2655-71.
3. Burhans, W.C. and N.H. Heintz. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(9): p. 1282-93.
4. Rhee, S.G. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006; 312(5782): p. 1882-3.
5. Salmeen, A. and D. Barford. Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(5-6): p. 560-77.
6. Chiarugi, P. Survival or death: the redox paradox. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): p. 2651-4.
7. Paulsen, C.E. and K.S. Carroll. Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS Chem Biol* 2010; 5(1): p. 47-62.
8. Lee, S.R., et al. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1998; 273(25): p. 15366-72.
9. Meng, T.C., et al. Regulation of insulin signaling through reversible oxidation of the protein-tyrosine phosphatases TC45 and PTP1B. *J Biol Chem* 2004; 279(36): p. 37716-25.
10. Chiarugi, P., et al. Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J Cell Biol* 2003; 161(5): p. 933-44.
11. Yu, C.X., S. Li, and A.R. Whorton. Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols. *Mol Pharmacol* 2005; 68(3): p. 847-54.
12. Cho, S.H., et al. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. *FEBS Lett* 2004; 560(1-3): p. 7-13.
13. Chiarugi, P., et al. Two vicinal cysteines confer a peculiar redox regulation to low molecular weight protein tyrosine phosphatase in response to platelet-derived growth factor receptor stimulation. *J Biol Chem* 2001; 276(36): p. 33478-87.
14. Caselli, A., et al. The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase by H₂O₂. *J Biol Chem* 1998; 273(49): p. 32554-60.
15. Meng, T.C., T. Fukada, and N.K. Tonks. Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo. *Mol Cell* 2002; 9(2): p. 387-99.
16. Chen, C.Y., D. Willard, and J. Rudolph. Redox regulation of SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatases by two backdoor cysteines. *Biochemistry* 2009; 48(6): p. 1399-409.

17. Sun, J.P., et al. Structure and biochemical properties of PRL-1, a phosphatase implicated in cell growth, differentiation, and tumor invasion. *Biochemistry* 2005; 44(36): p. 12009-21.
18. Boutros, R., V. Lobjois, and B. Ducommun. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 2007; 7(7): p. 495-507.
19. Aressy, B. and B. Ducommun. Cell cycle control by the CDC25 phosphatases. *Anticancer Agents Med Chem* 2008; 8(8): p. 818-24.
20. Rudolph, J. Redox regulation of the Cdc25 phosphatases. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(5-6): p. 761-7.
21. Sohn, J. and J. Rudolph. Catalytic and chemical competence of regulation of cdc25 phosphatase by oxidation/reduction. *Biochemistry* 2003; 42(34): p. 10060-70.
22. Holmgren, A. and J. Lu. Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396(1): p. 120-4.
23. Arner, E.S. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(6): p. 495-526.
24. Hayashi, T., Y. Ueno, and T. Okamoto. Oxidoreductive regulation of nuclear factor kappa B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin. *J Biol Chem* 1993; 268(15): p. 11380-8.
25. Ueno, M., et al. Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 1999; 274(50): p. 35809-15.
26. Hansen, J.M., W.H. Watson, and D.P. Jones. Compartmentation of Nrf-2 redox control: regulation of cytoplasmic activation by glutathione and DNA binding by thioredoxin-1. *Toxicol Sci* 2004; 82(1): p. 308-17.
27. Biaglow, J.E. and R.A. Miller. The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(1): p. 6-13.
28. Lillig, C.H. and A. Holmgren. Thioredoxin and related molecules--from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9(1): p. 25-47.
29. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8(7): p. 579-91.
30. Schumacker, P.T. Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell* 2006; 10(3): p. 175-6.
31. Wondrak, G.T. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(12): p. 3013-69.
32. Brault, L., et al. Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of Cdc25 dual specificity phosphatases. *Eur J Med Chem* 2007; 42(2): p. 243-7.

33. Ross, D.D., et al. Estimation of cell survival by flow cytometric quantification of fluorescein diacetate/propidium iodide viable cell number. *Cancer Res* 1989; 49(14): p. 3776-82.
34. Holmgren, A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J Biol Chem* 1977; 252(13): p. 4600-6.
35. Arner, E.S., M. Bjornstedt, and A. Holmgren. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene is an irreversible inhibitor of human thioredoxin reductase. Loss of thioredoxin disulfide reductase activity is accompanied by a large increase in NADPH oxidase activity. *J Biol Chem* 1995; 270(8): p. 3479-82.
36. Rhee, S.G., et al. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. *Mol Cells* 2010; 29(6): p. 539-49.
37. Watson, W.H., et al. Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J Biol Chem* 2003; 278(35): p. 33408-15.
38. Lacombe, F. and F. Belloc. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. *Hematol Cell Ther* 1996; 38(6): p. 495-504.
39. Viry, E., et al. Antiproliferative effect of natural tetrasulfides in human breast cancer cells is mediated through the inhibition of the cell division cycle 25 phosphatases. *Int J Oncol* 2011; 38(4): p. 1103-11.
40. Ou, T.T., et al. Gallic acid induces G2/M phase cell cycle arrest via regulating 14-3-3beta release from Cdc25C and Chk2 activation in human bladder transitional carcinoma cells. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54(12): p. 1781-90.
41. Jin, Y., X. Zou, and X. Feng. 3,3'-Diindolylmethane negatively regulates Cdc25A and induces a G2/M arrest by modulation of microRNA 21 in human breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 2010; 21(9): p. 814-22.
42. Omata, Y., et al. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicol In Vitro* 2006; 20(6): p. 882-90.
43. Gromer, S., et al. Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* 1998; 273(32): p. 20096-101.
44. Rigobello, M.P., et al. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition by gold(I) compounds and concurrent stimulation of permeability transition and release of cytochrome c. *Biochem Pharmacol* 2004; 67(4): p. 689-96.
45. Myers, C.R. and J.M. Myers. The effects of acrolein on peroxiredoxins, thioredoxins, and thioredoxin reductase in human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2009; 257(1-2): p. 95-104.
46. Yang, X., et al. Effect of acrolein and glutathione depleting agents on thioredoxin. *Toxicology* 2004; 204(2-3): p. 209-18.

47. Szadkowski, A. and C.R. Myers. Acrolein oxidizes the cytosolic and mitochondrial thioredoxins in human endothelial cells. *Toxicology* 2008; 243(1-2): p. 164-76.
48. Park, Y.S., et al. Induction of thioredoxin reductase as an adaptive response to acrolein in human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(4): p. 1058-65.
49. Wood, Z.A., et al. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(1): p. 32-40.
50. Landriscina, M., et al. Adaptation to oxidative stress, chemoresistance, and cell survival. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(11): p. 2701-16.
51. Marzano, C., et al. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2007; 42(6): p. 872-81.
52. Kim, I.S., et al. Auranofin induces apoptosis and when combined with retinoic acid enhances differentiation of acute promyelocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Pharmacol* 2004; 142(4): p. 749-55.
53. Rigobello, M.P., et al. Gold(I) complexes determine apoptosis with limited oxidative stress in Jurkat T cells. *Eur J Pharmacol* 2008; 582(1-3): p. 26-34.
54. Casini, A., et al. Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem* 2008; 102(3): p. 564-75.
55. Cox, A.G., et al. The thioredoxin reductase inhibitor auranofin triggers apoptosis through a Bax/Bak-dependent process that involves peroxiredoxin 3 oxidation. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(9): p. 1097-109.
56. Ludeman, S.M. The chemistry of the metabolites of cyclophosphamide. *Curr Pharm Des* 1999; 5(8): p. 627-43.
57. Prast-Nielsen, S., et al. Noble metal targeting of thioredoxin reductase--covalent complexes with thioredoxin and thioredoxin-related protein of 14 kDa triggered by cisplatin. *Free Radic Biol Med* 2010; 49(11): p. 1765-78.
58. Watson, W.H., et al. Thioredoxin reductase-1 knock down does not result in thioredoxin-1 oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368(3): p. 832-6.
59. Rigobello, M.P., et al. Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radic Biol Med* 2009; 47(6): p. 710-21.
60. Brown, K.K., A.G. Cox, and M.B. Hampton. Mitochondrial respiratory chain involvement in peroxiredoxin 3 oxidation by phenethyl isothiocyanate and auranofin. *FEBS Lett* 2010; 584(6): p. 1257-62.
61. Go, Y.M., et al. Reactive aldehyde modification of thioredoxin-1 activates early steps of inflammation and cell adhesion. *Am J Pathol* 2007; 171(5): p. 1670-81.

62. Stevens, J.F. and C.S. Maier. Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(1): p. 7-25.
63. Voulgaridou, G.P., et al. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutat Res* 2011; 711(1-2): p. 13-27.
64. Laoukili, J., M. Stahl, and R.H. Medema. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775(1): p. 92-102.
65. Chua, P.J., G.W. Yip, and B.H. Bay. Cell cycle arrest induced by hydrogen peroxide is associated with modulation of oxidative stress related genes in breast cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(9): p. 1086-94.
66. Barnouin, K., et al. H₂O₂ induces a transient multi-phase cell cycle arrest in mouse fibroblasts through modulating cyclin D and p21Cip1 expression. *J Biol Chem* 2002; 277(16): p. 13761-70.
67. Natsuyama, S., et al. Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176(1-2): p. 90-4.
68. Vogt, A., et al. Antitumor imidazolyl disulfide IV-2 causes irreversible G₂/M cell cycle arrest without hyperphosphorylation of cyclin-dependent kinase Cdk1. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294(3): p. 1070-5.
69. Neumann, C.A., J. Cao, and Y. Manevich. Peroxiredoxin 1 and its role in cell signaling. *Cell Cycle* 2009; 8(24): p. 4072-8.
70. Cao, J., et al. Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity. *Embo J* 2009; 28(10): p. 1505-17.
71. Lowther, W.T. and A.C. Haynes. Reduction of Cysteine Sulfinic Acid in Eukaryotic, Typical 2-Cys Peroxiredoxins by Sulfiredoxin. *Antioxid Redox Signal* 2010.
72. Findlay, V.J., H. Tapiero, and D.M. Townsend. Sulfiredoxin: a potential therapeutic agent? *Biomed Pharmacother* 2005; 59(7): p. 374-9.
73. Rhee, S.G., et al. Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney Int Suppl* 2007(106): p. S3-8.
74. Findlay, V.J., et al. A novel role for human sulfiredoxin in the reversal of glutathionylation. *Cancer Res* 2006; 66(13): p. 6800-6.

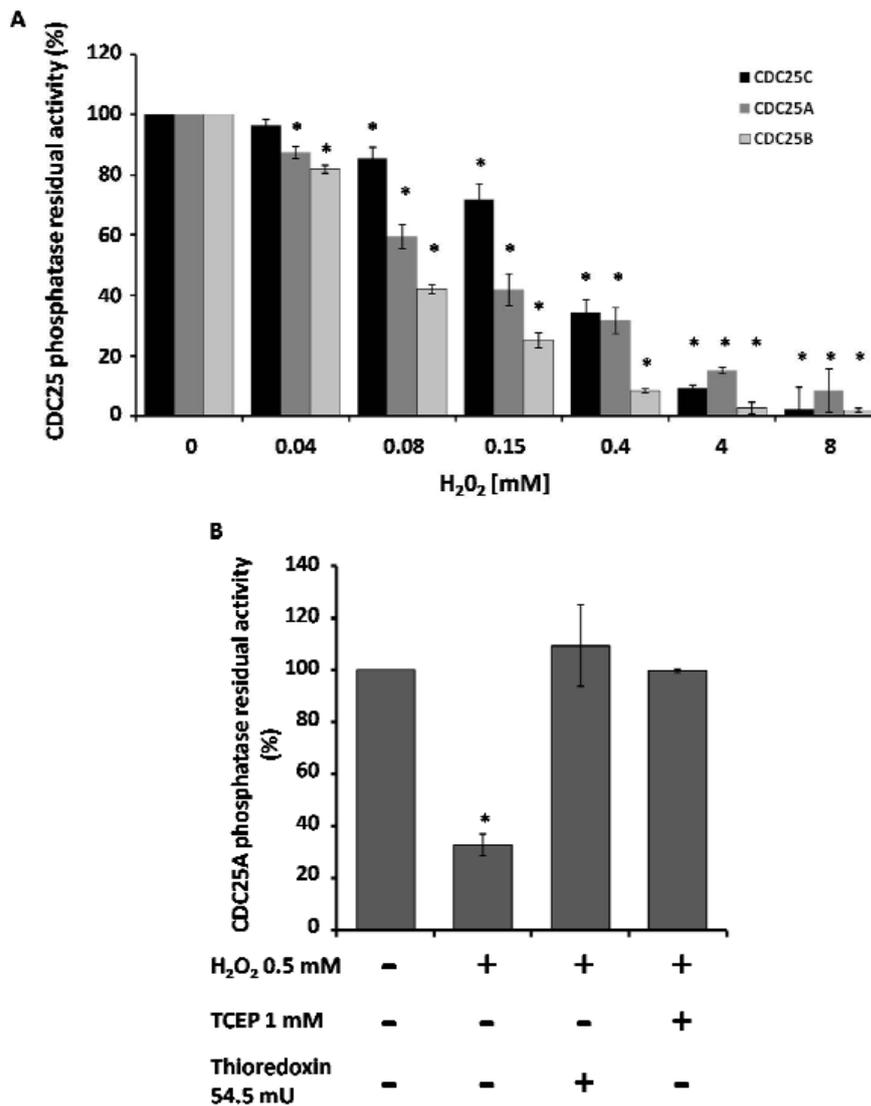


Figure 1: Inhibition of CDC25A, B and C phosphatase activities by H₂O₂ and reactivation by a reducing agent, TCEP and by the trx/trxR system. Phosphatase activity of CDC25 was assessed by measuring the hydrolysis of OMFP as described in materials and methods. **A.** Purified recombinant human GST-CDC25 phosphatases (A, B and C) were incubated with increasing concentrations of H₂O₂ (0-8 mM) for 2 min at 37°C. The excess of H₂O₂ was quenched by adding catalase (25U) in the reaction buffer. **B.** TCEP (1 mM) or trx/trxR (54,5 mU trx, 47.32 mU trxR, 12 mM NADPH) were added to the reaction buffer after H₂O₂ treatment (2 min, 0.5 mM) of CDC25A phosphatases. Data are means ± S.E.M of three independent experiments. *P <0.05, control vs treated cells.

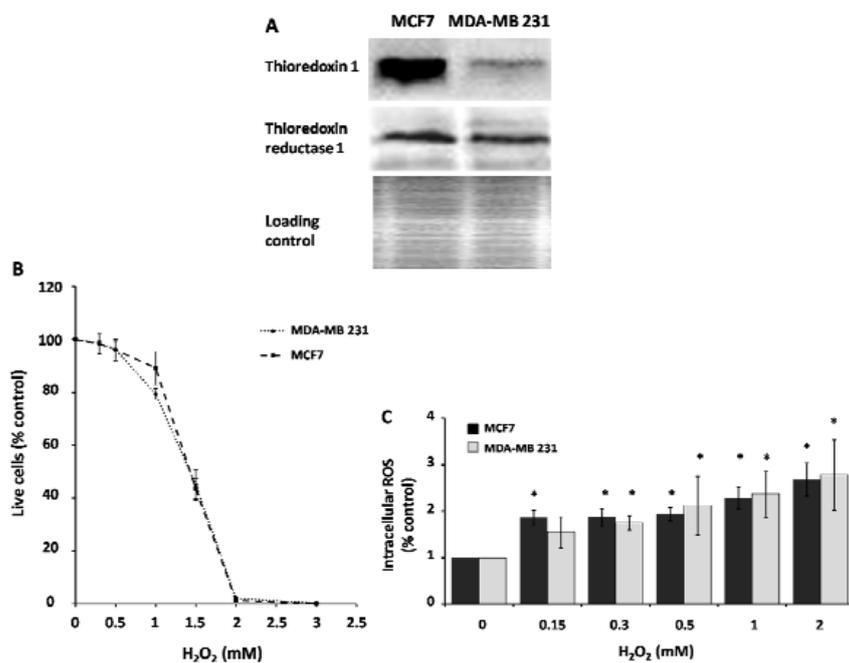


Figure 2: trx1/trxR expression level and effects of H₂O₂ on the viability and ROS production in MCF7 and MDA-MB 231 cells. **A.** Thioredoxin 1 and thioredoxin reductase 1 protein expression were evaluated by immunoblotting in MCF7 and MDA-MB 231 breast cancer cell lines. Red Ponceau staining is shown below as loading control. **B.** The effects of H₂O₂ on MCF7 and MDA-MB 231 cell viability were assessed by FACS analysis using PI incorporation and H₂DCFDA. Cells were treated with increasing concentrations of H₂O₂ (0-3 mM) for 24 h. **C.** The effects of H₂O₂ on ROS production were assessed by FACS using H₂DCFDA. Cells were treated with increasing concentrations of H₂O₂ (0-2 mM) for 15 min. Data are means ± S.E.M of three independent experiments. *P <0.05, control vs treated cells.

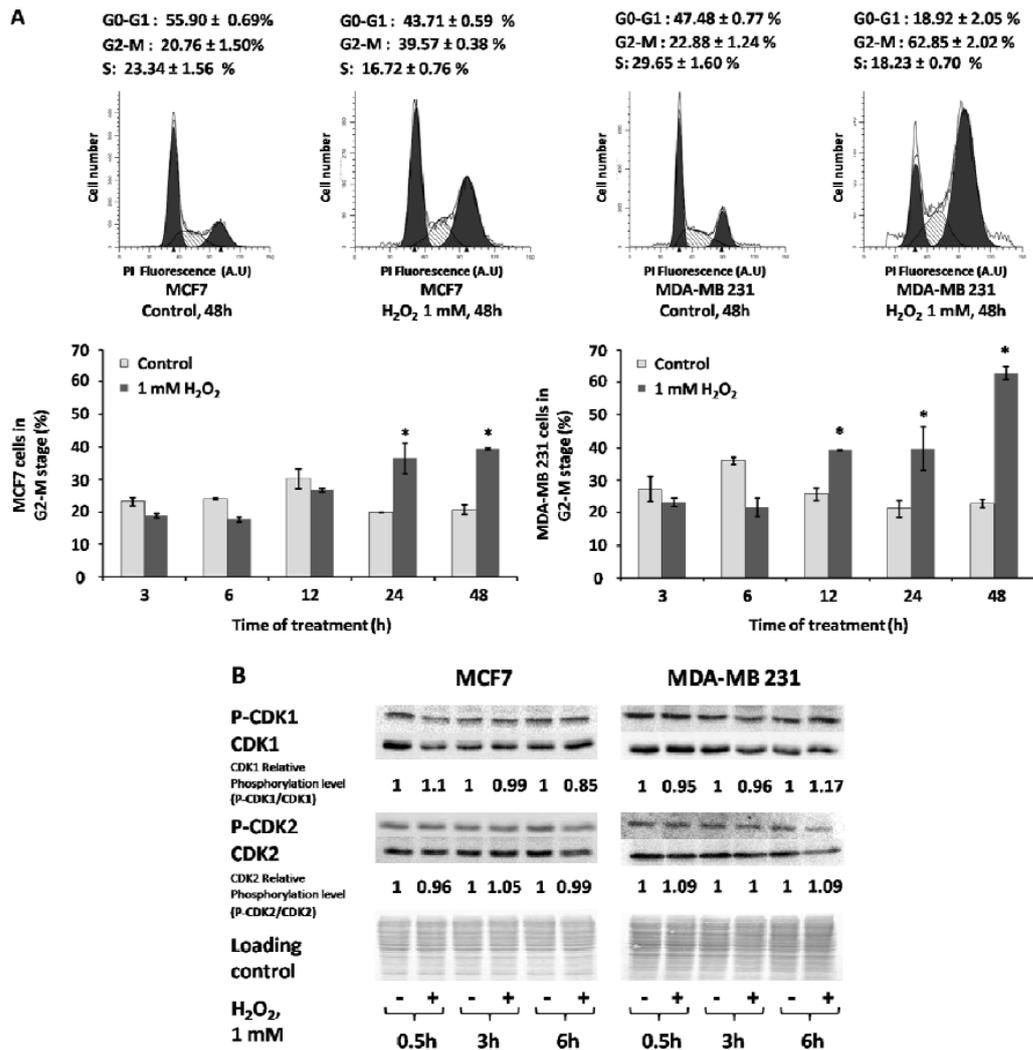


Figure 3: Effects of H₂O₂ on MCF7 and MDA-MB 231 cell cycle distribution and CDK1 and CDK2 tyrosine phosphorylation. **A:** MCF7 and MDA-MB 231 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 3, 6, 12, 24 and 48 h and their cell cycle phase distribution was assessed by PI incorporation and FACS analysis. The cell percentage in each stage (G0-G1, G2-M and S) was calculated with ModFit software. Results are shown as the average of 3 independent experiments ± S.E.M. *P <0.05 between control and treated cells. **B:** The cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 0.5, 3 or 6h. Phospho-CDK1 and phospho-CDK2 blots were stripped and reprobbed with total CDK1 and CDK2 respectively. Blots were analyzed using “quantity one” software. The relative quantifications of phospho-CDK1 and phospho-CDK2 were performed in comparison with total CDK1 or 2. The figures shown are representative of typical experiments out of at least 2 similar ones.

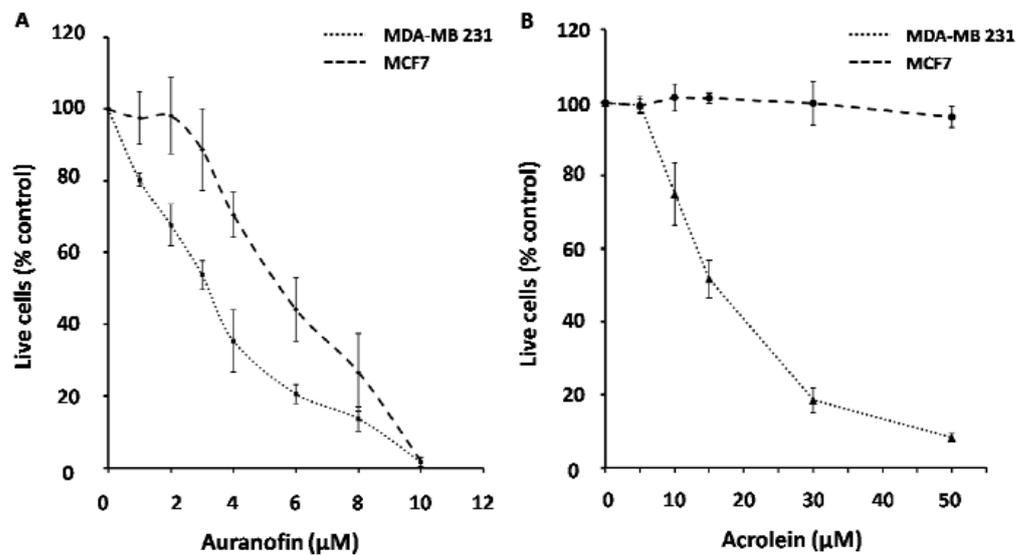


Figure 4: Cytotoxic effects of Auranofin and Acrolein in MCF7 and MDA-MB 231 cells. The effects of Auranofin and Acrolein on MCF7 and MDA-MB 231 cell viability were assessed by FACS analysis using PI incorporation and H₂DCFDA. Cells were treated with increasing concentrations of Auranofin (0-10 μM) (A) or Acrolein (0-50 μM) (B) for 24 h. Acrolein-treated cells and corresponding control cells were kept in HBSS medium for 30 min before treatment. Results are shown as the average of 3 independent experiments ± S.E.M.

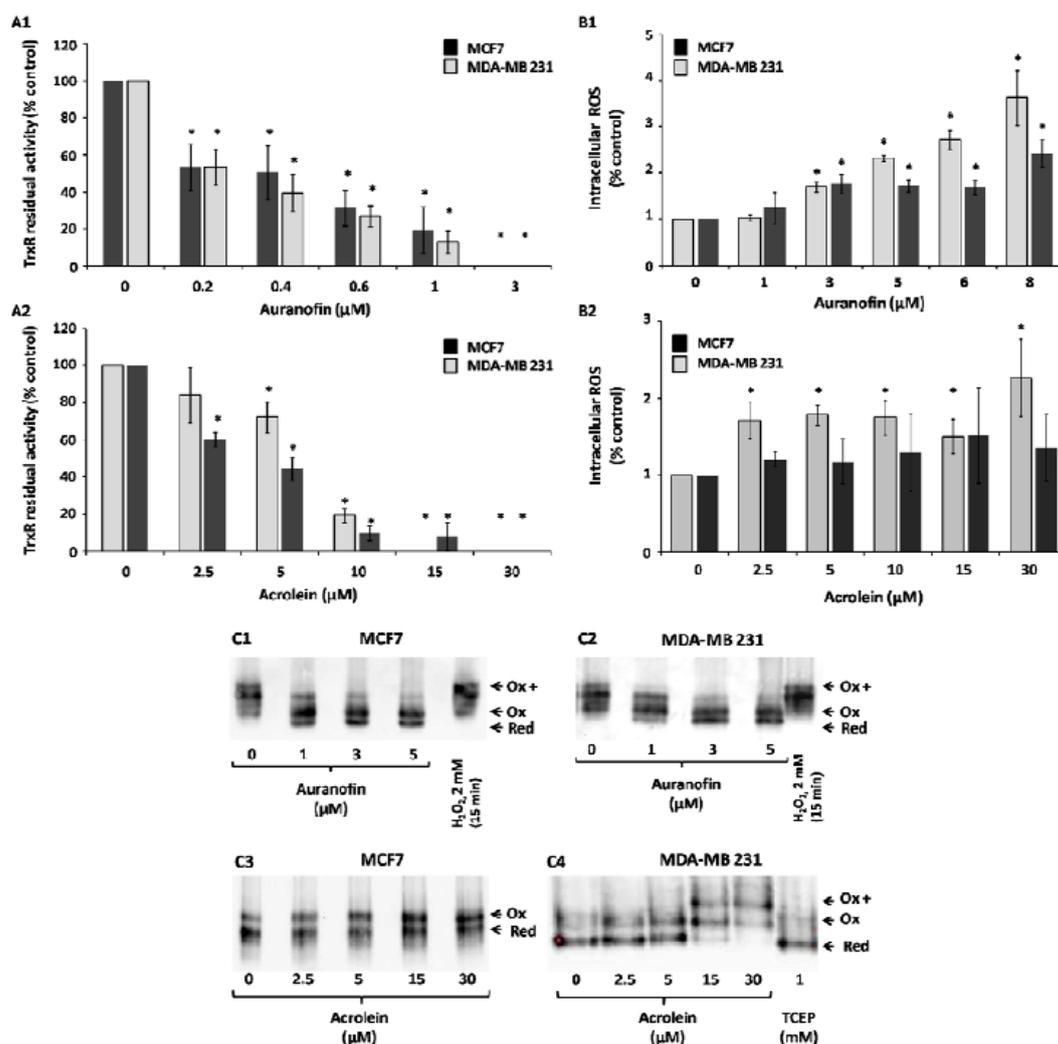


Figure 5: Effects of Auranofin and Acrolein on trx/trxR system and intracellular ROS quantity in MCF7 and MDA-MB 231 cells. Cells were treated with increasing concentrations of Auranofin or Acrolein for 30 min. **A1 and A2.** The trxR residual activity was assessed by DTNB reduction assay. **B1 and B2.** ROS production was assessed by FACS using H₂DCFDA. **C.** Cells were harvested in a Tris-guanidinium chloride buffer containing iodoacetic acid and trx1 redox status was assessed as described in material and methods. Redox forms of trx1 are indicated as follows : Red, reduced form; oxi, oxidized form (disulfide from the active site); the top oxi band represents the most oxidized form (disulfides in active site and outside the active site). In C3, only the fully reduced and the active site disulfide forms were observed. Treatment of MDA-MB 231 cell homogenate with 1 mM TCEP was used as a control of total trx1 reduction. Treatment of MDA-MB 231 cells with 1 mM H₂O₂ was used as a control of total trx1 oxydation.

The final DMSO concentration (0,2% v/v) was the same for all treatments with Auranofin and corresponding control. Acrolein-treated cells and corresponding control cells were grown in HBSS medium for 30 min. The data represents the mean \pm S.E.M of 3 independent experiments. *P<0.05, control vs treated cells

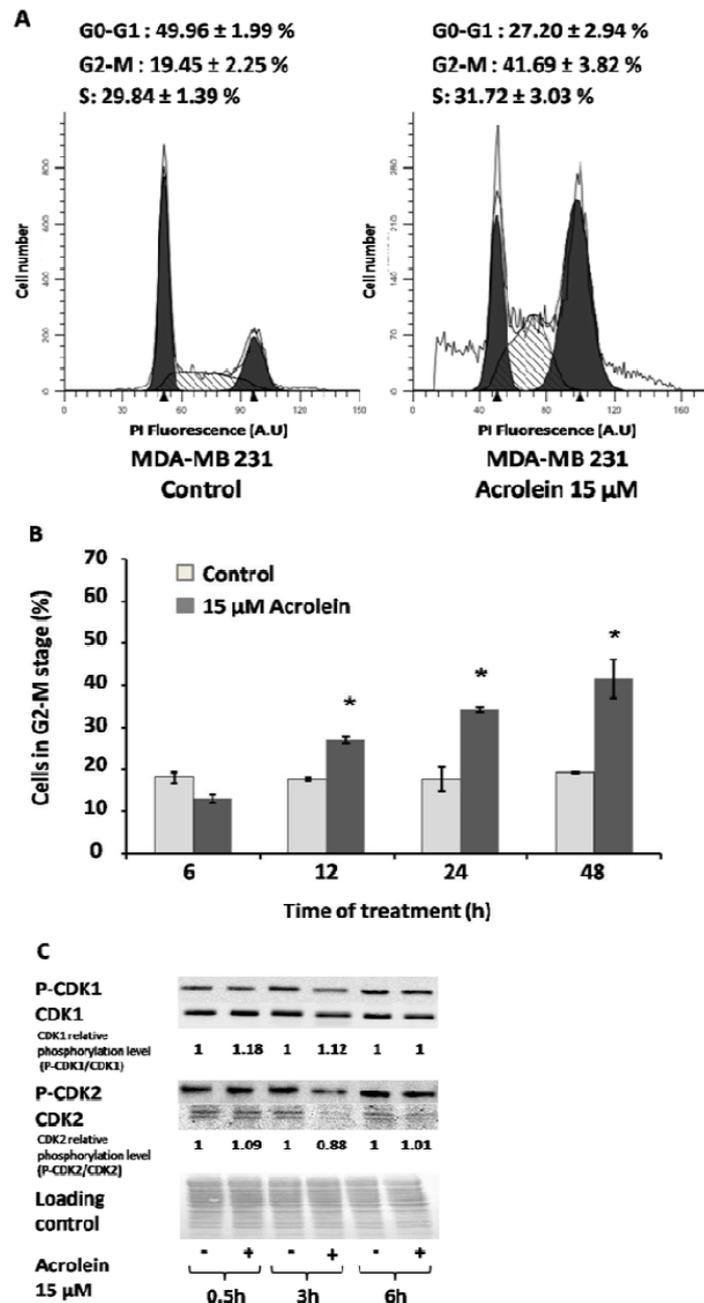


Figure 6: Effects of Acrolein on MDA-MB 231 cell cycle distribution and CDK1 and CDK2 tyrosine phosphorylation. **A and B.** MDA-MB 231 cells were treated with 15 μM Acrolein for 6, 12, 24 and 48 h and their cell cycle phase distribution was assessed using PI incorporation and FACS analysis. The cell percentage in each stage (G0-G1, G2-M and S) was calculated with ModFit software. Results are shown as the average of 3 independent experiments ± S.E.M. *P <0.05 , control vs treated cells. **C.** Cells were treated with 15 μM Acrolein for 0.5, 3 and 6h. Phospho-CDK1 and phospho-CDK2 blots were stripped and reprobed for total CDK1 and CDK2 respectively. Blots were analyzed using “quantity one” software. The relative quantifications of phospho-CDK1 and phospho-CDK2 were